

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA BOŽNIK

**PRIMERJAVA DVEH NAČINOV DOLOČANJA  
KONCENTRACIJ RIVAROKSABANA IN DABIGATRANA**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA BOŽNIK

**PRIMERJAVA DVEH NAČINOV DOLOČANJA  
KONCENTRACIJ RIVAROKSABANA IN DABIGATRANA**

**COMPARISON OF TWO ASSAYS FOR QUANTITATIVE  
DETERMINATION OF RIVAROXABAN AND DABIGATRAN**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Oddelku za laboratorijsko medicino v Splošni bolnišnici Celje pod mentorstvom doc. dr. Mojce Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biokem., in somentorstvom mag. Štefke Krivec, mag. farm., spec. med. biokem..

### **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Mojci Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biokem., za strokovno vodenje in nasvete pri ustvarjanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi somentorici mag. Štefki Krivec, mag. farm., spec. med. biokem., ki mi je s strokovnimi nasveti pomagala pri izbiri in obdelavi teme, me motivirala in omogočila izvedbo praktičnega dela naloge. Posebna zahvala gre tudi sodelavcem Oddelka za laboratorijsko medicino, ki so mi nesebično pomagali pri zbiranju vzorcev in mi stali ob strani, še posebej sodelavki Sonji Škorjanc, inž. kem. teh., ki mi je bila v veliko pomoč pri praktični izvedbi naloge. Prav tako se zahvaljujem ekipi v Antikoagulacijski ambulanti za pomoč pri zbiranju vzorcev.*

*Še posebej se zahvaljujem svojim najbližjim: staršem in sestri, ki so mi ves čas študija stali ob strani, me spodbujali in pomagali, partnerju in sinu pa za podporo, razumevanje in strpnost, ki sta mi jih namenjala med mojim študijem.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Mojce Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biokem., in somentorstvom mag. Štefke Krivec, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, september 2016

Anita Božnik

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin

## VSEBINA

<b>VSEBINA</b> .....	<b>I</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>KLJUČNE BESEDE</b> .....	<b>VII</b>
<b>KEYWORDS</b> .....	<b>VII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VIII</b>
<b>SEZNAM SLIK</b> .....	<b>X</b>
<b>SEZNAM PREGLEDNIC</b> .....	<b>XI</b>
<b>SEZNAM ENAČB</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. HEMOSTAZA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. ANTIKOAGULACIJSKO ZDRAVLJENJE</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. RIVAROKSABAN .....	6
1.2.2. DABIGATRAN.....	7
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>9</b>
<b>3. PREISKOVANCI IN METODE</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. PREISKOVANCI</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2. ODVZEM KRVI IN PRIPRAVA VZORCEV</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3. MERILNI INSTRUMENTI, METODE DOLOČANJA IN REAGENTI</b> .....	<b>11</b>
3.3.1. AVTOMATSKI KOAGULACIJSKI ANALIZATOR BCS XP .....	11
3.3.2. METODE DOLOČANJA.....	12
<b>3.4. STATISTIČNE METODE</b> .....	<b>18</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1. REZULTATI MERITEV – RIVAROKSABAN</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2. REZULTATI MERITEV – DABIGATRAN</b> .....	<b>24</b>
<b>5. RAZPRAVA</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1. RIVAROKSABAN</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2. DABIGATRAN</b> .....	<b>30</b>
<b>6. SKLEP</b> .....	<b>33</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>34</b>

<b>PRILOGA I.....</b>	<b>38</b>
<b>PRILOGA II .....</b>	<b>39</b>
<b>PRILOGA III.....</b>	<b>40</b>

## POVZETEK

Antikoagulacijsko (AK) zdravljenje je namenjeno preprečevanju tromboemboličnih dogodkov. Pri tem so ključna AK zdravila, ki zavirajo proces koagulacije v sistemu hemostaze. Zaradi pomanjkljivosti zdravljenja s kumarinskimi derivati so razvili nova peroralna AK zdravila. V Sloveniji so registrirana tri takšna: dabigatran (Pradaxa®), rivaroksaban (Xarelto®) in apiksaban (Eliquis®). Dabigatran je reverzibilni neposredni zaviralec trombina, rivaroksaban in apiksaban pa sta neposredna zaviralca faktorja Xa (FXa). Novejša AK zdravila imajo bolj predvidljiv AK učinek kot kumarinski derivati, zato zanje redni nadzor z laboratorijskimi testi ni potreben. Podatek o njihovem AK učinku postane ključen v kliničnih stanjih, ko je potrebno takojšnje ukrepanje. Za hitro kvalitativno oceno AK učinka dabigatrana in rivaroksabana je mogoče uporabiti klasične presejalne koagulacijske teste (protrombinski čas (PČ), trombinski čas (TČ) in aktivirani parcialni tromboplastinski čas (APTČ)), za njihovo kvantitativno določitev pa specifične teste, prilagojene za posamezno zdravilo. Na Oddelku za laboratorijsko medicino SB Celje smo začeli določati rivaroksaban z reagentom, ki je vseboval eksogeni antitrombin (AT). Ker le-ta lahko vpliva na rezultate meritev, smo opravili primerjalno testiranje z metodo brez dodanega AT. Za primerjalno testiranje dabigatrana z dvema metodama smo se odločili zato, da bi uporabili isti reagent za določanje TČ in dabigatrana, vendar z različnima protokoloma.

Vzorci krvi smo odvzeli 33 preiskovancem na terapiji z rivaroksabanom in 31 preiskovancem na terapiji z dabigatranom. Rivaroksaban smo merili s kromogeno metodo inhibicije FXa (anti-Xa) z dodanim AT in brez njega. Dabigatran smo merili s komercialno metodo Hemoclot in hišno prilagojeno metodo merjenja TČ. V vzorcih smo določili tudi PČ, TČ in APTČ.

Med koncentracijami rivaroksabana, izmerjenimi z obema metodama, je bila zelo visoka korelacija (Spearmanov koeficient korelacije  $r = 0,982$ ; regresijska premica  $y = 1,0179x + 0,78$ ), prav tako zelo visoka je bila korelacija med obema metodama za merjenje koncentracij dabigatrana ( $r = 0,919$ ; regresijska premica  $y = 1,040x - 2,18$ ). Z Bland-Altmanovim testom ujemanja med dvema metodama smo ugotovili, da so rezultati meritev rivaroksabana z dodanim AT v povprečju višji za  $2,6 \mu\text{g/L}$  od meritev, dobljenih z metodo brez AT, in tudi rezultati meritev dabigatrana z reagentom Hemoclot so bili v povprečju višji za  $2,6 \mu\text{g/L}$  od rezultatov, dobljenih s prilagojeno metodo merjenja TČ. Metoda

anti-Xa z dodanim AT se je zmerno povezovala s PČ ( $r = 0,575$ ), praktično nič s TČ ( $r = 0,136$ ) in močno z APTČ ( $r = 0,838$ ). Komercialna metoda Hemoclot se je močno povezovala s PČ ( $r = 0,892$ ) in APTČ ( $r = 0,865$ ) ter praktično nič s TČ ( $r = 0,239$ ).

Obe metodi določanja rivaroksabana dajeta primerljive rezultate, s čimer smo dokazali, da je reagent z dodanim eksogenim AT primeren za določanje rivaroksabana, čeprav njegovo dodajanje ni potrebno. Dobro primerljivi sta bili tudi obe metodi določanja dabigatrana (komercialna metoda Hemoclot in prilagojena metoda določanja TČ). Dokazali smo, da je prilagojena metoda določanja TČ, ki je cenejša in za uporabo bolj preprosta, primerena za rutinsko določanje dabigatrana.

## ABSTRACT

Anticoagulation (AC) therapy is indicated for prevention of thromboembolic events. The primary role in this type of therapy is achieved by anticoagulants (AC) that act as blood coagulation inhibitors in haemostasis. Due to the shortcomings observed with coumarin derivative treatment, new oral anticoagulants (NOAC) were developed. Three NOAC are registered in Slovenia: dabigatran (Pradaxa®), rivaroxaban (Xarelto®) and apixaban (Eliquis®). Dabigatran is a reversible direct thrombin inhibitor, whereas rivaroxaban and apixaban are direct factor Xa inhibitors. Compared to coumarin derivatives, a more predictable anticoagulant effect was observed with NOAC, which in turn do not require routine coagulation monitoring. Data on their anticoagulant effect becomes important in clinical conditions that require immediate action. Rapid qualitative assessment of anticoagulant effect of both dabigatran and rivaroxaban can be obtained by conventional coagulation screening tests (PT, TT, aPTT); whereas, quantitative assessment is performed by specific tests adjusted to individual drugs. At the Department of Laboratory Medicine, Celje General Hospital, the assessment of rivaroxaban was initially performed by adding a reagent containing exogenous antithrombin (AT), having the potential to influence the results; therefore, for comparative testing, we performed an assay without added AT. We used comparative testing of dabigatran with two assays that allowed us to use the same reagent but different protocols for TT and dabigatran assessment.

Blood samples were taken from 33 subjects treated with rivaroxaban and 31 subjects treated with dabigatran. A chromogenic assay with and without AT was used to measure the factor Xa inhibitory activity (anti-Xa) of rivaroxaban. For dabigatran, we used a commercial (Hemoclot) and an in-house adjusted TT assay. PT, TT and aPTT tests were also performed on the samples.

There is a high correlation between rivaroxaban concentrations measured with both assays (Spearman's correlation coefficient = 0.982; regression line  $y = 1.0179x + 0.78$ ); there was also a high correlation between both assays used to measure dabigatran concentrations ( $r = 0.919$ ; regression line  $y = 1.040x - 2.18$ ). The Bland-Altman plot analyzing the agreement between two different assays showed that rivaroxaban concentration was on average higher for 2.6  $\mu\text{g/L}$  when measured with the addition of AT, and that dabigatran concentration was on average higher for 2.6  $\mu\text{g/L}$  with Hemoclot. Anti-Xa activity moderately correlated with PT ( $r = 0.575$ ), did not correlate with TT ( $r = 0.136$ ) and highly

correlated with aPTT ( $r = 0.838$ ). Adjusted TT (Hemoclot reagent) highly correlated with aPTT ( $r = 0.892$ ) and did not correlate with TT ( $r = 0.239$ ).

Both rivaroxaban assessment assays (with or without AT addition) show comparable results, which led us to prove that reagent with the addition of exogenous AT can be used for rivaroxaban assessment, even though no such addition is needed. Both (commercially and in-house) adjusted TT values are well comparable. We have proven that the in-house adjusted TT, which is less expensive and more easy to use, can be used for routine dabigatran assessment.

## **KLJUČNE BESEDE**

Antikoagulacijsko zdravljenje; rivaroksaban; dabigatran; metode določanja

## **KEYWORDS**

Anticoagulation therapy; rivaroxaban; dabigatran; quantitative assays

## SEZNAM OKRAJŠAV

AK	antikoagulacijsk (i, o, ega)
anti-Xa	metoda inhibicije faktorja Xa
APTČ	aktivirani parcialni tromboplastinski čas
AT	antitrombin
CV	koeficient variacije (ang. coefficient of variation)
F(..)a	aktivirana oblika faktorja strjevanja
FI	faktor strjevanja I, fibrinogen
FII	faktor strjevanja II, protrombin
FIII	faktor strjevanja III, tkivni faktor, tkivni tromboplastin
FV	faktor strjevanja V, proakcelerin
FVII	faktor strjevanja VII, prokonvertin
FVIII	faktor strjevanja VIII, antihemofilni faktor A
FIX	faktor strjevanja IX, antihemofilni faktor B
FX	faktor strjevanja X, Stuart-Prowerjev faktor
FXI	faktor strjevanja XI, plazmatski predhodnik tromboplastina, antihemofilni faktor C, Rosenthalov faktor
FXII	faktor strjevanja XII, Hagemanov faktor
FXIII	faktor strjevanja XIII, faktor, ki stabilizira fibrin
IFCC	Mednarodno združenje za klinično kemijo (ang. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)
INR	mednarodno umerjeno razmerje (ang. international normalized ratio)
IU	interval ujemanja/meja ujemanja
IZ	interval zaupanja/meja zaupanja
LA	lupusni antikoagulanti
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (ang. liquid chromatography-tandem mass spectrometry)

LOB	meja slepega vzorca (ang. limit of blank)
LOD	meja zaznave (ang. limit of detection)
LOQ	meja kvantifikacije (ang. limit of quantification)
OZLM	Oddelek za laboratorijsko medicino
oGF	ocena glomerulne filtracije
PAF	faktor, ki aktivira trombocite (ang. platelet activating factor)
PAI-1	zaviralec aktivatorja plazminogena-1 (ang. plasminogen activator inhibitor-1)
PČ	protrombinski čas
PK	prekalikrein
SB	splošna bolnišnica
SD	standardni odklon
SHP	standardna humana plazma
TAFI	zaviralec fibrinolize, ki ga aktivira trombin (ang. thrombin activatable fibrinolysis inhibitor)
TČ	trombinski čas
TF	tkivni faktor
tPA	tkivni aktivator plazminogena
vWF	von Willebrandov faktor
$\bar{x}$	aritmetična sredina

## SEZNAM SLIK

<b>Slika 1:</b> Prikaz nastanka trombocitnega strdka .....	1
<b>Slika 2:</b> Koagulacijska kaskada.....	2
<b>Slika 3:</b> Struktura fibrinogena .....	3
<b>Slika 4:</b> Pretvorba fibrinogena v fibrin .....	4
<b>Slika 5:</b> Fibrinoliza.....	4
<b>Slika 6:</b> Vplivi antikoagulacijskih zdravil na proces strjevanja krvi .....	5
<b>Slika 7:</b> Kemijska struktura rivaroksabana .....	6
<b>Slika 8:</b> Pretvorba dabigatraneteksilata v dabigatran.....	7
<b>Slika 9:</b> Analizator BCS XP, Siemens Healthcare Diagnostics (Nemčija).....	12
<b>Slika 10:</b> Umeritveni krivulji za rivaroksaban z dodanim antitrombinom.....	13
<b>Slika 11:</b> Princip določanja dabigatrana z reagentom Hemoclot Thrombin Inhibitors.....	15
<b>Slika 12:</b> Umeritvena krivulja za dabigatran z reagentom Hemoclot.....	16
<b>Slika 13:</b> Regresijska premica za metodi določanja koncentracij rivaroksabana z dodanim AT in brez dodanega AT.....	22
<b>Slika 14:</b> Bland-Altmanov diagram razlik rezultatov določanja koncentracij rivaroksabana z dodanim AT in brez dodanega AT .....	23
<b>Slika 15:</b> Grafični prikaz koncentracij rivaroksabana v vzorcih v povezavi s PČ, TČ in APTČ .....	24
<b>Slika 16:</b> Regresijska premica za metodi določanja koncentracij dabigatrana z metodo Hemoclot in prilagojeno metodo merjenja TČ .....	25
<b>Slika 17:</b> Bland-Altmanov diagram razlik rezultatov določanja koncentracij dabigatrana z reagentom Hemoclot in s prilagojeno metodo merjenja TČ .....	26
<b>Slika 18:</b> Grafični prikaz koncentracij dabigatrana v vzorcih v povezavi s PČ, TČ in APTČ .....	27

## SEZNAM PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Stabilnost pripravljenih reagentov Berichrom Heparin (Siemens, Nemčija) .....	14
<b>Preglednica II:</b> Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod v seriji za rivaroksaban, izračunani iz razlike parov meritev .....	21
<b>Preglednica III:</b> Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod med serijami za rivaroksaban, izračunani iz povprečja parov meritev .....	21
<b>Preglednica IV:</b> Rezultati vrednotenja točnosti metode za rivaroksaban .....	21
<b>Preglednica V:</b> Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod v seriji za dabigatran, izračunani iz razlik parov meritev .....	24
<b>Preglednica VI:</b> Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod med serijami za dabigatran, izračunani iz povprečja parov meritev .....	24
<b>Preglednica VII:</b> Rezultati vrednotenja točnosti metode za dabigatran.....	25

## SEZNAM ENAČB

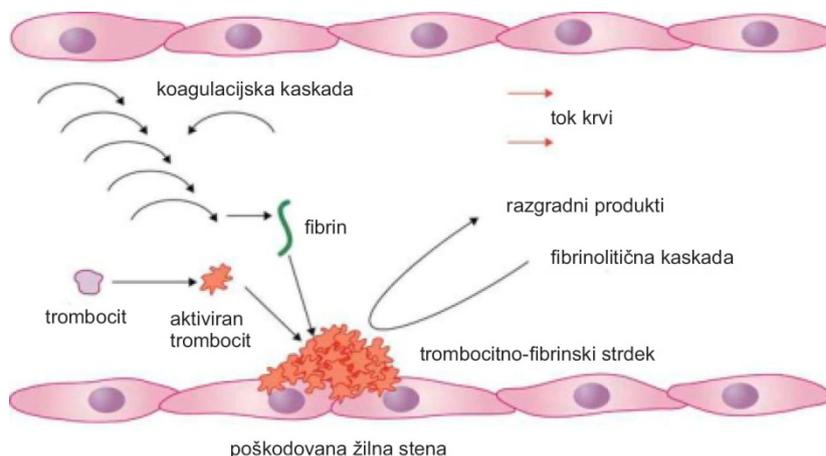
<b>Enačba 1:</b> Princip merjenja rivaroksabana z dodanim antitrombinom.....	12
<b>Enačba 2:</b> Princip merjenja rivaroksabana brez dodanega antitrombina.....	13
<b>Enačba 3:</b> Enačba za izračun SD parov meritev.....	19
<b>Enačba 4:</b> Enačba za izračun ponovljivosti meritev v seriji.....	19
<b>Enačba 5:</b> Enačba za izračun točnosti .....	19

# 1. UVOD

## 1.1. HEMOSTAZA

Hemostaza je fiziološki proces, ki z različnimi mehanizmi omogoča človeškemu telesu ohranjati kri v tekočem stanju, zaustavitev krvavitve pri poškodbi žile, sočasno pa aktivira fibrinolizo in razgradnjo strdka. Posledice motnje hemostaze so embolije, tromboze in krvavitve (1). V procesu hemostaze sodelujejo celični elementi žilne stene (endotelijske celice, celice gladkih mišic), celice krvi (trombociti) in številne krvne beljakovine (faktorji koagulacije in fibrinolize, kofaktorji ter njihovi zaviralci). Hemostazo delimo na primarno in sekundarno (2).

**Primarna hemostaza** je proces, pri katerem ob poškodbi žilne stene nastane trombocitni strdek. Pri tem sta potrebna tako normalno število trombocitov kot njihova normalna funkcija. Na poškodovano žilno steno se na subendotelij prilepijo trombociti (adhezija trombocitov). Trombociti se aktivirajo, pri čemer spremenijo obliko in sprostijo snovi iz svojih zrc, ti. agoniste (npr. ADP), ki sprožijo aktiviranje drugih trombocitov. Trombociti se zlepijo med seboj (agregacija trombocitov). S tem nastane trombocitni strdek (Slika 1).

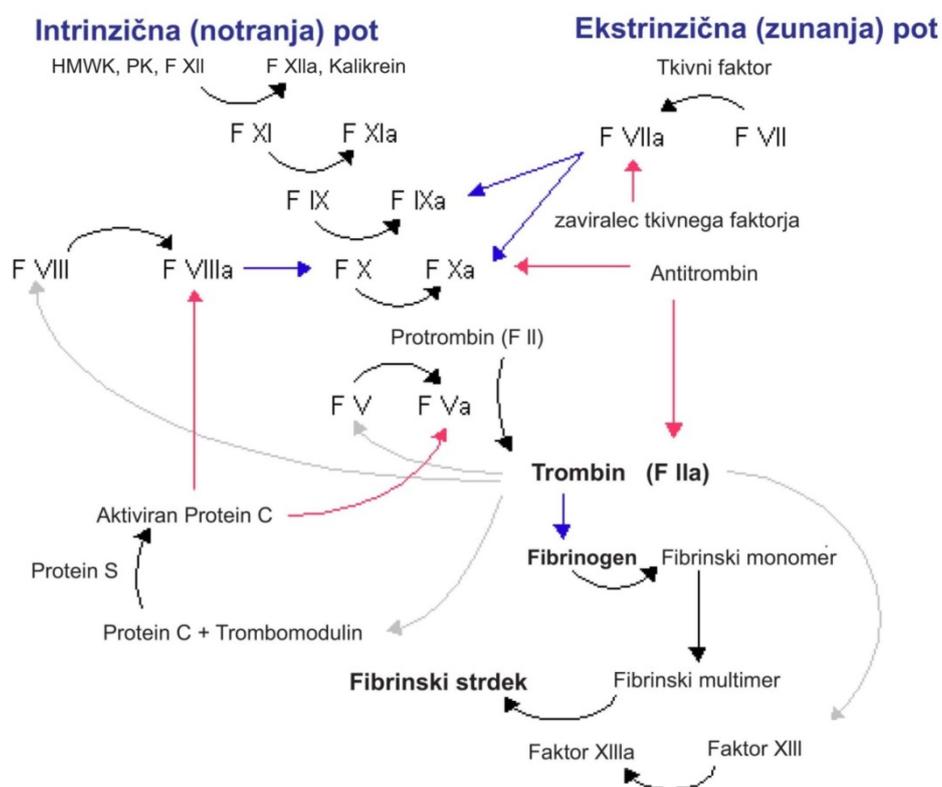


Slika 1: Prikaz nastanka trombocitnega strdka  
(prirejeno po viru 3)

**Sekundarna hemostaza** je zaporedje encimskih reakcij (koagulacija krvi), pri katerih se topni fibrinogen pretvori v netopni fibrin. Koagulacijski sistem sestavljajo beljakovine

(glikoproteini), imenovane koagulacijski faktorji, ki so sestavina krvi, razen tkivnega faktorja (TF), ki je sestavina celične membrane in ni v stiku s krvjo. Koagulacijski faktorji so v krvi v obliki proencimov (neaktivna oblika) ali kofaktorjev. V svojo aktivno obliko (encimi –serinske proteaze) se pretvorijo med koagulacijo krvi, ko se s pomočjo kofaktorjev (FV, FVIII) proencimi (FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII) pretvorijo v encime. Kofaktorji omogočajo, da encim prepozna substrat, zvečajo učinkovitost encima, omogočajo njegovo specifičnost in zagotavljajo, da reakcija poteka na površini celice. Celotno zaporedje reakcij koagulacije krvi delimo zaradi lažjega razumevanja na intrinzično in ekstrinzično pot (Slika 2) (1, 2).

Koagulacija se verjetno sproži, ko se TF pojavi na površini poškodovane celice oz. se ta sprosti iz endotelijskih celic v subendotelij.



Slika 2: Koagulacijska kaskada

(prirejeno po viru 4)

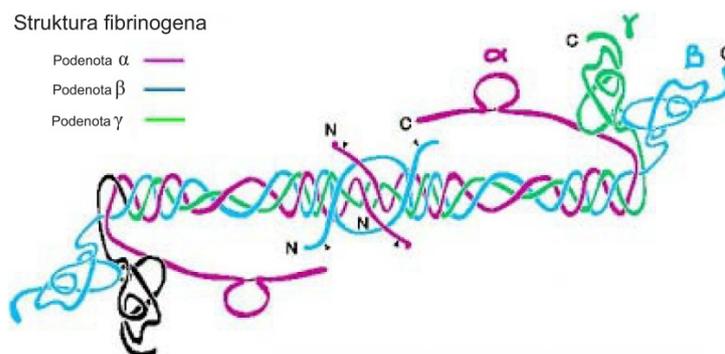
*Ekstrinzična ali zunanja pot koagulacije* se začne z vezavo FVII na TF (kofaktor), ki se tako aktivira v FVIIa. FVIIa nato aktivira FIX in FX. FXa skupaj s FVa, fosfolipidi in kalcijem predstavlja *protrombinazni kompleks* (encimski kofaktorski kompleks), ki

pretvarja protrombin (FII) v trombin (FIIa). FXa deluje le na površini celice, ker ga v krvi inaktivira antitrombin (1, 2).

*Intrinzična ali notranja pot koagulacije* se začne z aktiviranjem FXII in FXI na subendoteliju žile – kontaktna aktivacija. Je mehanizem za pospeševanje koagulacije in je bistven za normalno hemostazo. Za reakcijo sta potrebna kalikrein in visokomolekularni kininogen (HMWK). Ostali faktorji (FXII, FXI, FIX in FX) se aktivirajo drug za drugim. Aktivacijo FX v FXa pospeši FVIIIa skupaj s fosfolipidi in kalcijem. V tej reakciji sodelujeta FIXa kot encim in FVIIIa kot kofaktor (FVIIIa dobi kofaktorsko lastnost, ko ga trombin pretvori v aktivno obliko) (1, 2).

Osrednja molekula *skupne poti koagulacije* je trombin, ki pretvori fibrinogen v fibrin.

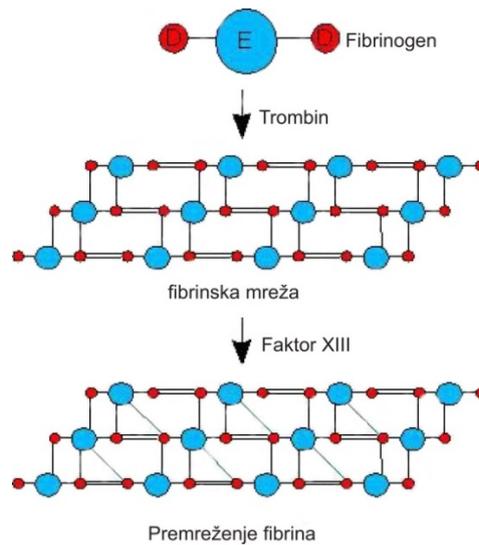
Fibrinogen je molekula, ki se sintetizira v jetrih. Kemijsko je kovalentno vezan dimer in je sestavljen iz treh parov polipeptidnih verig (alfa, beta in gama) (Slika 3).



Slika 3: Struktura fibrinogena

(prirejeno po viru 5)

Trombin odcepi iz verige alfa fibrinopeptid A, nato iz verige beta fibrinopeptid B. Tako nastane *topni fibrin*. Ob odcepitvi fibrinopeptida A nastane konformacijska sprememba, ki omogoča polimerizacijo z ostalimi fibrinskimi monomeri v *netopni fibrin*. Polimerizacijo oz. premreženje fibrinskih monomerov (kovalentna vezava med dvema verigama alfa ali gama dveh sosednjih molekul) omogoča aktivirani FXIII (Slika 4) (1, 2).

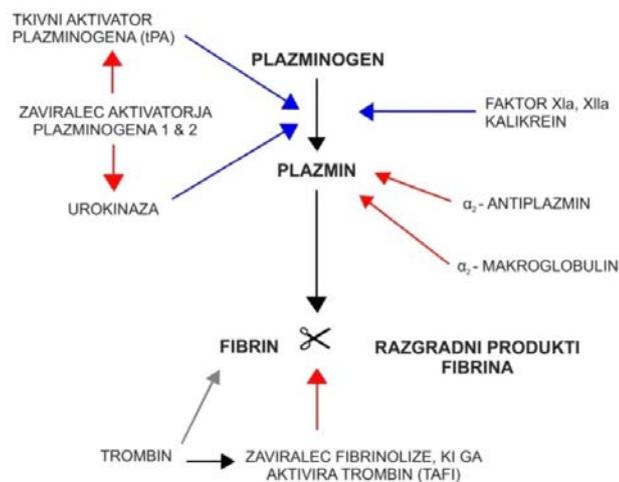


Slika 4: Pretvorba fibrinogena v fibrin  
(prirejeno po viru 6)

**Fibrinoliza** je fiziološki proces, ki razgrajuje fibrinske strdke in preprečuje njihovo širjenje po zaustavitvi krvavitve. Aktivira se sočasno s koagulacijo in poteka po dveh poteh: s kontaktno aktivacijo (intrinzična aktivacija) in aktivacijo plazminogena (ekstrinzična aktivacija) (1, 2).

Endotelijske celice sprostijo tkivni aktivator plazminogena (tPA), ki aktivira plazmin v plazminogen. Ta hidrolizira fibrin v topne razgradne produkte (1).

Fibrinolitični sistem regulirata tudi dva pomembna inhibitorja: *PAI-1*, ki posredno prek inhibicije tPA zavira aktivacijo plazminogena ter  $\alpha_2$ -*antiplazmin*, ki zavira delovanje plazmina (Slika 5) (1).



Slika 5: Fibrinoliza  
(prirejeno po viru 7)

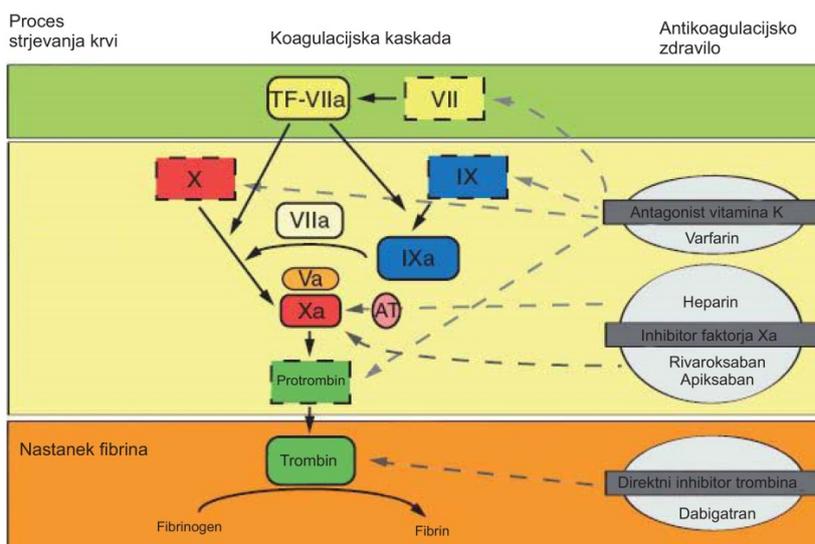
## 1.2. ANTIKOAGULACIJSKO ZDRAVLJENJE

Cilj antikoagulacijskega (AK) zdravljenja je z AK zdravili vplivati na koagulacijski sistem, da se upočasni strjevanje krvi (8).

Začetki AK zdravljenja segajo v začetek 20. stoletja; najprej z uporabo hirudina, izoliranega iz medicinskih pijavk. Pomemben mejnik v zgodovini AK zdravljenja je bilo odkritje AK učinkov heparina in kumarina, ki sta bili več kot 60 let temeljni sredstvi AK zdravljenja (9).

Za peroralno AK zdravljenje so več kot pol stoletja uporabljali izključno kumarinske derivate, med njimi najpogosteje varfarin. Kljub izjemni učinkovitosti ima zdravljenje z varfarinom številne pomanjkljivosti: ozko terapevtsko okno, dolgo razpolovno dobo, interakcije s številnimi zdravili in hrano, redno laboratorijsko spremljanje. Posledično so bile v zadnjih letih raziskave usmerjene k iskanju ustrežnejših peroralnih AK zdravil. V Sloveniji so trenutno dostopna tri takšna: rivaroksaban (Xarelto®), dabigatran (Pradaxa®) in apiksaban (Eliquis®) (10). Njihove prednosti so: kratka razpolovna doba, malo interakcij z drugimi zdravili in hrano ter manjša potreba po laboratorijskem nadzoru (10).

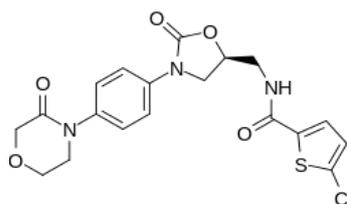
Rivaroksaban in dabigatran se uporabljata za preprečevanje venske tromboze in pljučne embolije pri bolnikih z velikimi kirurškimi posegi na spodnjih okončinah (10) ter za preprečevanje tromboemboličnih dogodkov pri bolnikih z atrijsko fibrilacijo in bolnikih po preboleli venski trombozi in pljučni emboliji (Slika 6) (10, 11).



Slika 6: Vplivi antikoagulacijskih zdravil na proces strjevanja krvi  
(prirejeno po viru 12)

### 1.2.1. RIVAROKSABAN

Rivaroksaban je neposredni zaviralec koagulacijskega faktorja Xa in je na voljo v obliki filmsko obložene tablete po 2,5, 10, 15 in 20 mg (13). Je oksazolidinonski derivat (Slika 7), ki se veže na prosti in v protrombinazni kompleks vezani FXa. Tako neposredno reverzibilno zavira delovanje FXa ter prepreči nastanek trombina in s tem tvorbo strdka (10, 11, 13, 14).



Slika 7: Kemijska struktura rivaroksabana  
(prirejeno po viru 15)

Rivaroksaban se v črevesju hitro absorbira in doseže največjo koncentracijo v krvi po eni do treh urah po zaužitju in znaša 180–299 µg/L (10–20 mg zdravila) (10, 38). Hrana ne vpliva na biološko razpoložljivost zdravila in na njegovo maksimalno koncentracijo. Zdravilo se v 95 % veže na plazemske proteine (predvsem albumine); razpolovna doba je 8–13 ur (10). Približno dve tretjini uporabljenega odmerka se presnovi; polovica tega se izloči skozi ledvice, druga polovica pa skozi hepatobiliarni trakt. Ena tretjina uporabljenega odmerka se kot nespremenjena zdravilna učinkovina izloči v seču (11, 13). Zadržki pri zdravljenju z rivaroksabanom so podobni kot pri zdravljenju s kumarini: aktivna ali nedavna krvavitev, tveganje za veliko krvavitev, predviden ali nepredviden kirurški poseg, neurejena atrijska hipertenzija, huda anemija, trombocitopenija. Dodatni zadržki pa so še: ledvična okvara (oGF, manjša od 30 mL/min), zmerna ali huda jetrna okvara, sočasna uporaba močnih zaviralcev ali induktorjev glikoproteina P ali citokroma P450 3A4, sočasna uporaba dvotirnega antiagregacijskega zdravljenja, nosečnost in dojenje (10).

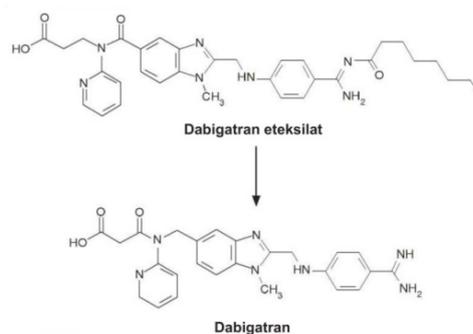
V začetku zdravljenja z rivaroksabanom zanj še ni bilo na voljo ustreznega antidota, sedaj pa je že v klinični uporabi andeksanet alfa.

Rivaroksaban ima predvidljiv AK učinek, zato ga ni treba redno laboratorijsko spremljati. Podatek o koncentraciji zdravila je pomemben, ko je potrebno hitro ukrepanje. Pri tem je

klasični presejalni koagulacijski test PČ (izražen v sekundah oz. v deležih) primeren samo za kvalitativno oceno AK učinka rivaroksabana, za kvantitativno določitev zdravila v plazmi pa uporabljamo specifični test določanja preostale aktivnosti faktorja X (anti-Xa). Nekateri, ne pa vse metode anti-Xa, imajo dodan eksogeni AT, ki bi lahko povzročil lažno zvišane izmerjene vrednosti rivaroksabana (38).

### 1.2.2. DABIGATRAN

Dabigatraneteksilat je zdravilo v obliki trde kapsule po 75, 110 in 150 mg (16). Je brez farmakološkega učinka. Po zaužitju se hitro absorbira, nato esteraza odcepi ester in karbamat, kar pretvori molekulo eteksilata v aktivno učinkovino dabigatran (Slika 8) (16, 17).



Slika 8: Pretvorba dabigatraneteksilata v dabigatran

(prirejeno po viru 18)

Dabigatran je kompetitivni, reverzibilni, neposredni zaviralec trombina, zato posredno onemogoči nastanek fibrina in fibrinskega strdka. Dabigatran zavira prosti trombin, na fibrin vezani trombin in agregacijo trombocitov, ki jo povzroča trombin (16). Največjo koncentracijo v krvi doseže v eni do treh urah po zaužitju in znaša 82–161  $\mu\text{g/L}$  (100–200 mg zdravila) (10, 19).

Hrana ne vpliva na biološko uporabnost dabigatraneteksilata, vendar za dve uri podaljša čas do dosega maksimalne koncentracije v plazmi (16). Okoli 35 % zdravila je vezanega na plazemske beljakovine; razpolovna doba je 14–17 ur. Izločanje poteka pretežno skozi ledvice (85 %), nekaj pa z blatom (6 %) (10, 16).

Zadržki pri zdravljenju z dabigatranom so podobni kot pri zdravljenju z rivaroksabanom. Tudi pri dabigatranu na začetku njegove uporabe zanj še ni bilo na voljo antidota, sedaj pa se že klinično uporablja idarucizumab (20).

Dabigatran ima predvidljiv AK učinek, zato redno laboratorijsko spremljanje ni potrebno. Podatek o koncentraciji zdravila je pomemben, ko je potrebno hitro ukrepanje. Pri tem sta klasična presejalna koagulacijski testa APTČ in TČ primerna samo za kvalitativno oceno AK učinka dabigatrana, za kvantitativno določitev zdravila v plazmi pa uporabljamo specifični, za dabigatran posebej prilagojeni trombinski čas. Ker pri nas uporabljana komercialna metoda (Hemoclot) temelji na trombinskem času, smo želeli meriti koncentracije dabigatrana z lastno prilagojeno metodo merjenja TČ.

## 2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge bo določiti koncentracijo rivaroksabana in dabigatrana pri bolnikih na AK zdravljenju, ki jih obravnavajo v Antikoagulacijski ambulanti v SB Celje.

V okviru naloge bomo:

- vzorce analizirali z metodo anti-Xa z dodanim AT, ki je metoda določanja rivaroksabana na Oddelku za laboratorijsko medicino (OZLM) SB Celje, in jo primerjali z metodo brez dodanega AT. Tako bomo ugotovili vpliv eksogenega AT na določitev koncentracij rivaroksabana;
- vzorce analizirali s komercialno metodo Hemoclot, ki je rutinska metoda določanja dabigatrana na OZLM SB Celje, in jo primerjali s hišno prilagojeno metodo določanja TČ z uporabo reagenta, ki je v laboratoriju namenjen določanju TČ;
- preiskovancem, ki so na terapiji z rivaroksabanom ali dabigatranom, določili klasične presejalne koagulacijske teste (PČ, TČ in APTČ), ki so primerni le za kvalitativno oceno AK učinka obeh zdravil;
- določili orientacijski referenčni interval za rivaroksaban in dabigatran. V ta namen bomo analizirali krvne vzorce preiskovancev, ki ne prejema AK zdravil, s testi, ki jih uporabljamo na OZLM SB Celje v vsakdanji praksi.

### **3. PREISKOVANCI IN METODE**

#### **3.1. PREISKOVANCI**

Vzorci za določitev koncentracij rivaroksabana smo odvzeli 33 pacientom na AK terapiji z rivaroksabanom, 17 ženskam in 16 moškim, s povprečno starostjo 68 let. Petnajst jih je prejelo 15-miligramski odmerek zdravila, 17 pa 20-miligramskega. Za enega pacienta nismo pridobili podatka o odmerku prejetega zdravila. Od zadnjega zaužitja zdravila do odvzema krvi je poteklo 2 do 27 ur. V 32 vzorcih smo izmerili tudi PČ, TČ in APTČ. Vse meritve smo opravili s svežo plazmo. V vseh 33 vzorcih (21 iz sveže plazme in 12 iz zamrznjene) smo določili koncentracijo rivaroksabana z dodanim AT in brez njega.

Vzorci za določitev koncentracij dabigatrana smo odvzeli 31 pacientom na AK terapiji z dabigatranom, 13 ženskam in 18 moškim, s povprečno starostjo 71 let. Trinajst jih je prejelo 110-miligramski odmerek zdravila, 16 pa 150-miligramskega. Za dva pacienta nismo pridobili podatka o odmerku prejetega zdravila. Od zadnjega zaužitja zdravila do odvzema krvi je poteklo 2 do 14 ur. V vseh vzorcih smo izmerili PČ, TČ in APTČ. Vse meritve so bile opravljene v vzorcih sveže plazme. Vsem vzorcem smo določili koncentracije dabigatrana z dvema različnima reagentoma: z reagentom Hemoclot in prilagojeno metodo merjenja TČ z reagentom BC Thrombin. Petnajst meritev smo opravili v vzorcih sveže, 16 pa v vzorcih zamrznjene plazme.

Vzorci za določitev orientacijskega referenčnega intervala rivaroksabana in dabigatrana smo odvzeli 31 pacientom, ki niso prejeli AK zdravil in so bili navidezno zdravi; 17 je bilo žensk, 14 moških, povprečno so bili stari 44 let. V vsakem vzorcu smo izmerili koncentraciji rivaroksabana in dabigatrana. Vse meritve smo opravili s svežo plazmo.

Vsi preiskovanci so bili vnaprej seznanjeni z namenom raziskave in so pisno privolili v sodelovanje. Raziskavo je odobrila tudi Etična komisija SB Celje.

#### **3.2. ODVZEM KRVI IN PRIPRAVA VZORCEV**

Vse krvne vzorce so po priporočenih standardnih postopkih odvzele strokovno usposobljene osebe v Enoti za odvzem krvi OZLM SB Celje. Vensko kri so odvzele v vakuumске epruvete (1,8 mL) z dodatkom 0,105 M natrijevega citrata proizvajalca

Beckton Dickinson. Po sprejemu vzorcev v laboratorij smo preverili njihovo homogenost in ustreznost razmerja med krvjo in dodanim antikoagulantom. Vzorce smo takoj centrifugirali 20 minut pri 2500xg. Meritve koncentracij zdravil in klasične presejalne teste smo izvedli v sveže pripravljeni plazmi v roku štirih ur ali pa smo plazmo takoj zamrznili na temperaturo pod  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in meritve opravili kasneje.

Vzorci plazme za analizo rivaroksabana so stabilni štiri ure pri sobni temperaturi oz. 3 mesece zamrznjeni pri temperaturi pod  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (21). Vzorci plazme za analizo dabigatrana so stabilni štiri ure pri sobni temperaturi in 2 meseca pri temperaturi pod  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (22). Vse zamrznjene vzorce smo pred analizo za 15 minut izpostavili temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vzdrževani s termostatom. Analizo smo opravili najkasneje v štirih urah po odmrznitvi. V nobenem primeru vzorci plazem niso bili hemolizirani ali lipemični (22).

### **3.3. MERILNI INSTRUMENTI, METODE DOLOČANJA IN REAGENTI**

Vse analize smo opravili v Koagulacijskem laboratoriju OZLM SB Celje na analizatorju BCS XP proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics, Nemčija. Za določitev rivaroksabana smo uporabljali reagente in potrošni material proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics (Nemčija), kalibratorje in kontrole pa proizvajalca Technoclone (Avstrija). Za določitev dabigatrana smo uporabljali reagente, kalibratorje in kontrole proizvajalca Hyphen BioMed (Francija). Pripravo reagentov in ostalega materiala smo izvedli po navodilih proizvajalca.

#### **3.3.1. AVTOMATSKI KOAGULACIJSKI ANALIZATOR BCS XP**

Analizator BCS XP je koagulometer, na katerem izvajamo teste hemostaze z optično, kromogeno ali imunološko metodo (Slika 9). Za merjenje PČ, TČ, APTČ in koncentracijo dabigatrana smo uporabljali optično metodo s principom merjenja časa nastanka strdka. Koncentracijo rivaroksabana smo merili s kromogeno metodo (23).



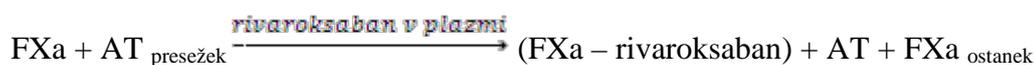
Slika 9: Analizator BCS XP, Siemens Healthcare Diagnostics (Nemčija)  
(prirejeno po viru 24)

### 3.3.2. METODE DOLOČANJA

#### **Določitev koncentracij rivaroksabana z dodanim antitrombinom in brez njega**

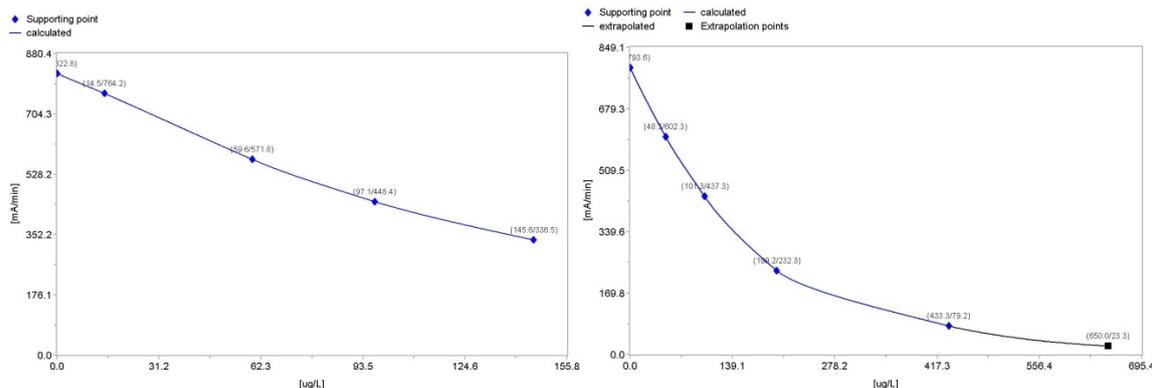
Koncentracijo rivaroksabana **z dodanim AT** smo merili z dvostopenjsko kromogeno metodo. Test temelji na inhibiciji FXa z rivaroksabanom v navzočnosti AT. V prvi stopnji analizator odpipetira 15  $\mu\text{L}$  vzorca (citratna plazma), 15  $\mu\text{L}$  AT in 150  $\mu\text{L}$  FXa. Med inkubacijo se rivaroksaban iz vzorca veže na FXa in ga inaktivira. Po inkubaciji analizator doda 30  $\mu\text{L}$  kromogenega substrata, ki reagira s preostalo aktivnostjo FXa. Nastane obarvani produkt, ki ga analizator izmeri spektrofotometrično s porastom absorbance pri 405 nm (Enačba 1). Porast absorbance je obratno sorazmeren s koncentracijo rivaroksabana v vzorcu, ki jo analizator odčita iz umeritvene krivulje (Slika 10) (25).

Enačba 1: Princip merjenja rivaroksabana z dodanim antitrombinom



Koncentracijo rivaroksabana **brez dodanega AT** smo merili s spremenjeno kromogeno metodo. Princip testa je isti kot pri merjenju rivaroksabana z dodanim AT; edina razlika je, da v prvi stopnji reakcije analizator ne doda AT (Enačba 2).

Enačba 2: Princip merjenja rivaroksabana brez dodanega antitrombina



Slika 10: Umeritveni krivulji za rivaroksaban z dodanim antitrombinom (umeritvena krivulja v nižjem območju koncentracij – slika levo; umeritvena krivulja v višjem območju koncentracij – slika desno)

Za merjenje koncentracij rivaroksabana z *dodanim AT* smo uporabili komplet reagentov Berichrom Heparin proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics (Nemčija), ki vsebuje:

- ✓ *FactorXa Reagent*: liofilizirana humana plazma,
- ✓ *Dextran Sulphate Reagent (diluent)*: liofilizirani dekstran sulfat,
- ✓ *AT III Reagent*: liofilizirani antitrombin humanega izvora,
- ✓ *Substrate Reagent*: liofilizirani substrat.

Za merjenje koncentracij rivaroksabana *brez dodanega AT* smo uporabili isti komplet reagentov, vendar brez reagenta AT III. Priprava reagentov, njihova stabilnost ter uporabljeni potrošni material so bili v obeh primerih isti.

**Priprava reagentov:** Pred uporabo smo reagente raztopili po navodilih proizvajalca, ustrezno premešali in pazili, da niso nastali zračni mehurčki (25).

Stabilnost pripravljenih reagentov je navedena v Preglednici I.

Preglednica I: Stabilnost pripravljenih reagentov Berichrom Heparin (Siemens, Nemčija)

Temperatura	Reagent FX	Reagent AT III	Substrat
37 °C	4 ure	-	1 teden
12–25 °C	3 dni	1 teden	2 tedna
2–8 °C	2 tedna	2 tedna	6 tednov
≤-20 °C	2 meseca	2 meseca	6 mesecev

Reagente smo v originalnih stekleničkah zamrznili največ trikrat. Datum priprave reagentov ter datum zamrznitve smo zapisali na stekleničke (25).

Kalibracijo rivaroksabana z dodanim AT in brez njega smo izvedli z dvema setoma kalibratorjev proizvajalca Technoclone (Avstrija). Oba seta vsebujeta liofilizirane humane kalibracijske plazme v petih različnih koncentracijah. Technoview Rivaroxaban Calibrator Set vsebuje kalibrator 1 brez dodanega rivaroksabana (0 µg/L), kalibratorji 2, 3, 4 in 5 pa imajo dodan rivaroksaban v koncentracijah 15, 60, 100 in 150 µg/L. Technoview Rivaroxaban Calibrator Set High vsebuje kalibrator 1 brez dodanega rivaroksabana (0 µg/L), kalibratorji 2, 3, 4 in 5 pa imajo dodan rivaroksaban v koncentracijah 50, 100, 200 in 500 µg/L. Primer umeritvenih krivulj rivaroksabana z dodanim AT je prikazan na Sliki 10 (26).

Koncentracijo rivaroksabana je analizator najprej odčital iz kalibracijske krivulje v nižjem območju koncentracij (0–150 µg/L), če pa je bila njena izmerjena vrednost nad 150 µg/L, jo je avtomatsko odčital iz kalibracijske krivulje višjega območja koncentracij (0–500 µg/L) (Slika 10) (26).

**Priprava kalibracijskih raztopin:** Pred uporabo smo vsebine stekleničk raztopili z 1 mL destilirane vode, dobro premešali in pustili stati na sobni temperaturi 10 minut. Raztopljeni kalibratorji so stabilni 48 ur pri sobni temperaturi, 7 dni pri 2–8 °C in 6 mesecev pri temperaturi pod -20 °C (26).

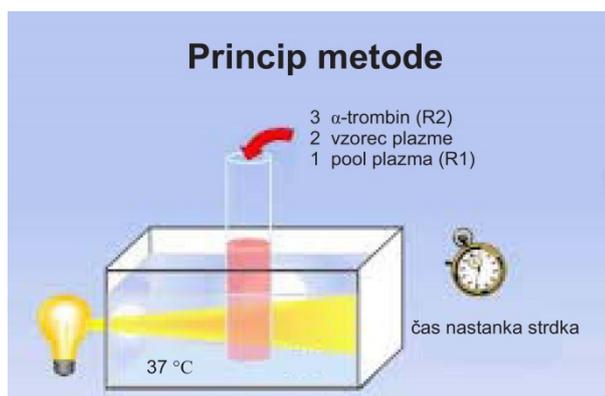
Za preverjanje analitičnega postopka in delovanja analizatorja smo pri obeh načinih določanja uporabili tri ravni komercialno pripravljenih kontrolnih vzorcev Technoview proizvajalca Technoclone (Avstrija). Vsi kontrolni vzorci so vsebovali liofilizirano humano plazmo z dodanim rivaroksabanom v okvirnih koncentracijah: 60 µg/L (CONT L), 150 µg/L (CONT M) in 300 µg/L (CONT H) (26).

Kontrolo kakovosti smo izvedli z vsemi tremi ravnmi kontrolnih vzorcev pred začetkom analize vzorcev, po menjavi reagentov, po kalibracijah in po servisnih posegih. Upoštevali smo kontrolne intervale, ki jih navaja proizvajalec (26).

**Priprava kontrolnih vzorcev:** Pred uporabo smo vsebino vsake stekleničke raztopili z 1 mL destilirane vode, dobro premešali in pustili stati na sobni temperaturi 10 minut. Raztopljeni kontrolni vzorci so stabilni 48 ur pri sobni temperaturi, 7 dni pri 2–8 °C in 6 mesecev pri temperaturi pod -20 °C (26).

### **Določitev koncentracij dabigatrana z metodo Hemoclot in s prilagojeno metodo merjenja TČ**

Koncentracijo dabigatrana smo merili v citratni plazmi z **metodo Hemoclot**, ki temelji na njegovi sposobnosti inhibicije trombina. Analizator v prvi fazi razredčenemu vzorcu doda humano normalno zmesno plazmo (reagent 1), v drugi fazi pa izmeri čas nastanka strdka po dodatku točno določene koncentracije  $\alpha$ -trombina (reagent 2) (Slika 11). Trombin pretvori fibrinogen v fibrin. Izmerjeni čas strjevanja je premo sorazmeren koncentraciji dabigatrana v vzorcu, ki ga analizator odčita iz umeritvene krivulje (Slika 12) (22).

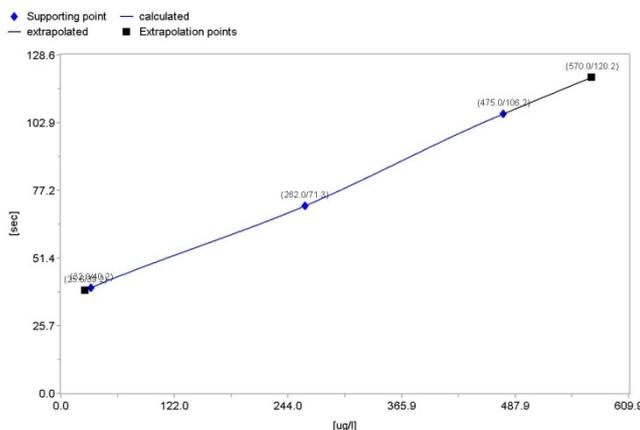


Slika 11: Princip določanja dabigatrana z reagentom Hemoclot Thrombin Inhibitors

(prirejeno po viru 27)

Koncentracijo dabigatrana v citratni plazmi smo določali tudi s **hišno prilagojeno metodo merjenja TČ** z reagentom BC Thrombin (Siemens, Nemčija), ki ga na OZLM uporabljamo za določanje TČ. Metodo merjenja TČ smo prilagodili tako, da je analizator vzorec razredčil z raztopino NaCl v razmerju 1 : 2 (5  $\mu$ L citratne plazme in 5  $\mu$ L raztopine NaCl). Analizator je odpipetiral 10  $\mu$ L razredčenega vzorca in mu dodal 100  $\mu$ L SHP, po inkubaciji (90 s) pa še 100  $\mu$ L BC Thrombina in izmeril čas nastanka strdka. Izmerjeni čas strjevanja je premo sorazmeren koncentraciji dabigatrana v vzorcu, ki ga analizator odčita

iz umeritvene krivulje (Slika 12). Spodnjo točko umeritvene krivulje ekstrapoliramo s faktorjem 0,8.



Slika 12: Umeritvena krivulja za dabigatran z reagentom Hemoclot

Za merjenje koncentracij dabigatrana z *metodo Hemoclot* smo uporabili komplet reagentov Hemoclot Thrombin Inhibitors proizvajalca Hyphen BioMed (Francija), ki vsebuje:

- ✓ Reagent 1: liofilizirana humana zmesna citratna plazma
- ✓ Reagent 2: liofilizirani visoko prečiščeni humani kalcijev trombin  $\alpha$

*Priprava reagentov:* Pred uporabo smo vsebino vsake stekleničke raztopili z 1 mL destilirane vode, dobro premešali in pustili stati na sobni temperaturi 15 minut.

Raztopljeni reagenti so stabilni 8 ur pri sobni temperaturi, 24 ur pri 2–8 °C in 2 meseca pri temperaturi pod -20 °C (22).

Za merjenje koncentracij dabigatrana s *prilagojeno metodo merjenja TČ* smo uporabili reagent BC Thrombin proizvajalca Siemens Healthcare Diagnostics (Nemčija), ki vsebuje:

- ✓ Reagent *BC Thrombin*: liofilizirana goveji trombin in goveji albumin
- ✓ Puferska raztopina za reagent *BC Thrombin*: HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sulfonska kislina), pH 7,4.

*Priprava reagentov:* Pred uporabo smo reagent *BC Thrombin* raztopili z 5 mL pufru, dobro premešali in pustili na sobni temperaturi 15 minut. Raztopljeni reagent je stabilen 8 ur pri 37 °C, 48 ur pri 15 °C, 7 dni pri 2–8 °C in 1 mesec pri temperaturi pod -20 °C. Diluent je po odprtju stabilen 12 tednov pri 2–25 °C (28).

Kalibracijo dabigatrana smo v obeh primerih izvedli s kompletom Dabigatran Plasma Calibrator proizvajalca Hyphen BioMed (Francija), ki vsebuje tri kalibratorje z liofilizirano humano plazmo z dodatkom 50, 250 in 500  $\mu\text{g/L}$  dabigatrana (29).

Merilno območje za določanje dabigatrana z reagentom Hemoclot je bilo 26–500  $\mu\text{g/L}$  in je razvidno iz umeritvene krivulje (Slika 12) (29).

**Priprava kalibracijskih raztopin:** Pred uporabo smo vsebino vsake stekleničke raztopili z 1 mL destilirane vode, dobro premešali in pustili stati na sobni temperaturi 30 minut.

Raztopljeni kalibratorji so stabilni 48 ur pri sobni temperaturi, 7 dni pri 2–8  $^{\circ}\text{C}$  in 6 mesecev pri temperaturi pod -20  $^{\circ}\text{C}$  (29).

Za preverjanje analitičnega postopka in delovanja analizatorja smo v obeh primerih določanja dabigatrana uporabili dva komercialno pripravljena kontrolna vzorca Dabigatran Control Plasma (CON1 in CON2) proizvajalca Hyphen BioMed (Francija). Kontrolni vsebujeta liofilizirano humano plazmo z okvirnimi vrednostmi dabigatrana: 50–200  $\mu\text{g/L}$  (CON1) in 200–400  $\mu\text{g/L}$  (CON2) (30).

Analizo obeh kontrolnih vzorcev smo opravili pred začetkom analize vzorcev, po menjavi reagentov, po kalibracijah in po servisnih posegih. Upoštevali smo kontrolne intervale, ki jih navaja proizvajalec.

**Priprava kontrolnih vzorcev:** Pred uporabo smo vsebino vsake stekleničke raztopili z

1 mL destilirane vode, dobro premešali in pustili na sobni temperaturi 30 minut. Raztopljene kontrolne plazme so stabilne 48 ur pri sobni temperaturi, 7 dni pri 2–8  $^{\circ}\text{C}$  in 6 mesecev pri temperaturi pod -20  $^{\circ}\text{C}$  (30).

**PČ** je presejalni test, s katerim ocenjujemo zunanjo in skupno pot koagulacije. Zajema faktorje koagulacije I, II, V, VII in X. Merili smo ga z reagentom Thromborel S® (Siemens, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Tkivni tromboplastin iz reagenta in kalcijevi ioni, dodani vzorcu plazme, povzročijo pretvorbo protrombina v trombin, le-ta pa pretvorbo fibrinogena v fibrin. Analizator izmeri čas do nastanka fibrina (strdka) (2, 31, 32). Orientacijska referenčna vrednost PČ v našem laboratoriju znaša 70–130 % oz. 9,8–12,1 s.

**TČ** je presejalni test, s katerim ocenjujemo pretvorbo fibrinogena v fibrin. Merili smo ga z reagentom BC Thrombin (Siemens, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Vzorcju plazme dodani trombin povzroči pretvorbo fibrinogena v fibrin. Analizator meri čas nastanka

strdka (2, 28, 32). Orientacijska referenčna vrednosti TČ v našem laboratoriju znaša 14–22 s. Zgornja meja merilnega območja je 150 s.

APTČ je presejalni test, s katerim ocenjujemo notranjo in skupno pot koagulacije. Zajema faktorje koagulacije XII, XI, IX, VIII, I, II, V in X. Merili smo ga z reagentom Pathromtin® SL (Siemens, Nemčija). Vzorec plazme se inkubira z optimalno količino fosfolipidov in površinskega aktivatorja, pri čemer se aktivirata FXII in FXI. Po dodatku kalcijevih ionov analizator meri čas nastanka strdka (2, 32, 33). Orientacijska referenčna vrednost APTČ v našem laboratoriju znaša 26–40 s. Zgornja meja merilnega območja je 160 s.

### 3.4. STATISTIČNE METODE

Rezultate smo statistično obdelali s programsko opremo Microsoft Office Excel 2007 podjetja Microsoft (ZDA) in statističnim programom MedCalc (MedCalc Software bvba, Belgija).

Mejo slepega vzorca (limit of blank, LOB) smo izračunali kot najvišjo navidezno koncentracijo analita v vzorcih brez analita.

Meja zaznave (limit of detection, LOD) je najnižja koncentracija analita, ki jo še lahko izmerimo s primerno statistično zanesljivostjo. Izračunali smo jo kot tri standardne odmike od povprečne vrednosti signala slepega vzorca (aritmetična sredina + 3 SD) (34).

Meja kvantifikacije (limit of quantification, LOQ) je najnižja koncentracija analita, ki ga še lahko kvantitativno določimo z zadovoljivo stopnjo natančnosti in zanesljivosti. Od LOQ naprej so rezultati analiz lahko kvantitativni. Meja kvantifikacije je običajno najnižja točka umeritvene krivulje oz. najnižja koncentracija standardne raztopine. Definirana je kot deset standardnih odmkov od povprečne vrednosti signala slepega vzorca (aritmetična sredina + 10 SD) (34).

Natančnost oz. ponovljivost metode nam opiše ujemanje rezultatov, ki so bili določeni v enakih okoliščinah (ista metoda, enak testni material, isti laboratorij ...) (34, 35).

Določili smo jo v seriji in med serijami meritev. Za izračun ponovljivosti v seriji smo za rivaroksaban izvedli 20 in za dabigatran 18 meritev kontrolnih vzorcev v dvojnikih in izračunali SD parov meritev po Enačbi 3.

Enačba 3: Enačba za izračun SD parov meritev

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - x_2)^2}{\text{število parov meritev}}}$$

Koeficient variacije smo izračunali s pomočjo Enačbe 4, kjer je SD standardni odmik razlik parov meritev,  $\bar{x}$  pa srednja vrednost srednjih vrednosti parov meritev.

Enačba 4: Enačba za izračun ponovljivosti meritev v seriji

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

Za izračun ponovljivosti med serijami smo za rivaroksaban izvedli 20 in za dabigatran 18 meritev kontrolnih vzorcev v dvojnikih in izračunali srednjo vrednost parov meritev.

Točnost metode nam pove, kako se izmerjene vrednosti ujemajo z dejanskimi vrednostmi. Pravo oz. dejansko vrednost dobimo z meritvami z referenčno metodo, ki nima sistemske napake. Čim manjša je razlika med pravo (dejansko) vrednostjo in povprečjem meritve naše metode, bolj je metoda točna (35). Za izračun točnosti smo izvedli 20 meritev kontrolnih vzorcev v dvojnikih. Za točno vrednost smo poenostavljeno upoštevali srednjo vrednost meritev kontrolnih vzorcev, ki jo navaja proizvajalec kontrolnega materiala. Točnost smo izračunali z Enačbo 5.

Enačba 5: Enačba za izračun točnosti

$$\text{Točnost} = \frac{\text{dejanska vrednost} - \text{izmerjena vrednost}}{\text{dejanska vrednost}} \times 100 (\%)$$

Za ugotavljanje porazdelitve meritev smo uporabili test Kolmogorov-Smirnov. Ker so se podatki razporejali nenormalno, smo za izračun korelacije med dvema metodama uporabili Spearmanov koeficient korelacije, primerjali pa smo ju tudi s pomočjo regresijskih premic. Bland-Altmanovo metodo (ali diagram razlik) smo uporabili za ocenjevanje ujemanja metod. V 32 vzorcih smo izmerili koncentracijo rivaroksabana in v 31 vzorcih koncentracijo dabigatrana z dvema različnima metodama. Za vsak parameter smo izračunali povprečno vrednost, razlike dobljenih vrednosti, povprečje parov meritev in

relativno razliko. Izračunali smo povprečje in standardni odmik razlik meritev ter povprečje in standardni odmik relativnih razlik (34, 35).

Moč povezave med klasičnimi presejalnimi koagulacijskimi testi (PČ, TČ in APTČ) in specifičnima testoma (anti-Xa z AT in metoda Hemoclot) smo opisali s Pearsonovim koeficientom korelacije.

Referenčni interval je interval med spodnjo in zgornjo referenčno mejo. Obe meji zajemata določen odstotni delež (običajno 95 % ali 2,5-ti in 97,5-ti percentil) razporeditve rezultatov (36, 37). Za določitev orientacijskega referenčnega intervala za rivaroksaban in dabigatran smo analizirali 31 vzorcev preiskovancev, ki niso prejeli AK terapije in so bili navidezno zdravi. Ker nas je zanimala samo zgornja referenčna meja, smo pri izračunu upoštevali 97,5-ti percentil razporeditve.

## 4. REZULTATI

### 4.1. REZULTATI MERITEV – RIVAROKSABAN

Za vrednotenje natančnosti oz. ponovljivosti v **seriji** in **med serijami** smo izvedli 20 meritev kontrolnih vzorcev treh ravni in jih analizirali v dvojniku (Preglednici II in III).

Preglednica II: Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod v **seriji** za rivaroksaban, izračunani iz razlike parov meritev

N = 20	<i>Metoda z AT</i>			<i>Metoda brez AT</i>		
	KON. L 63,80 µg/L	KON. M 144,30 µg/L	KON. H 315,60 µg/L	KON. L 63,80 µg/L	KON. M 144,30 µg/L	KON. H 315,60 µg/L
<b>SD</b>	2,8	4,0	9,7	3,2	4,0	12,9
$\bar{X}$	56,4	157,5	347,9	57,8	160,8	352,7
<b>CV</b>	5,0 %	2,5 %	2,8 %	5,6 %	2,5 %	3,7 %

Preglednica III: Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod **med serijami** za rivaroksaban, izračunani iz povprečja parov meritev

N = 20	<i>Metoda z AT</i>			<i>Metoda brez AT</i>		
	KON. L 63,80 µg/L	KON. M 144,30 µg/L	KON. H 315,60 µg/L	KON. L 63,80 µg/L	KON. M 144,30 µg/L	KON. H 315,60 µg/L
<b>SD</b>	5,5	5,4	9,9	3,7	5,4	12,5
$\bar{X}$	56,4	157,5	347,9	57,8	160,8	352,7
<b>CV</b>	9,8 %	3,4 %	2,9 %	6,5 %	3,3 %	3,5 %

Za vrednotenje točnosti smo opravili 20 meritev kontrolnih vzorcev treh ravni in jih analizirali v dvojniku (Preglednica IV).

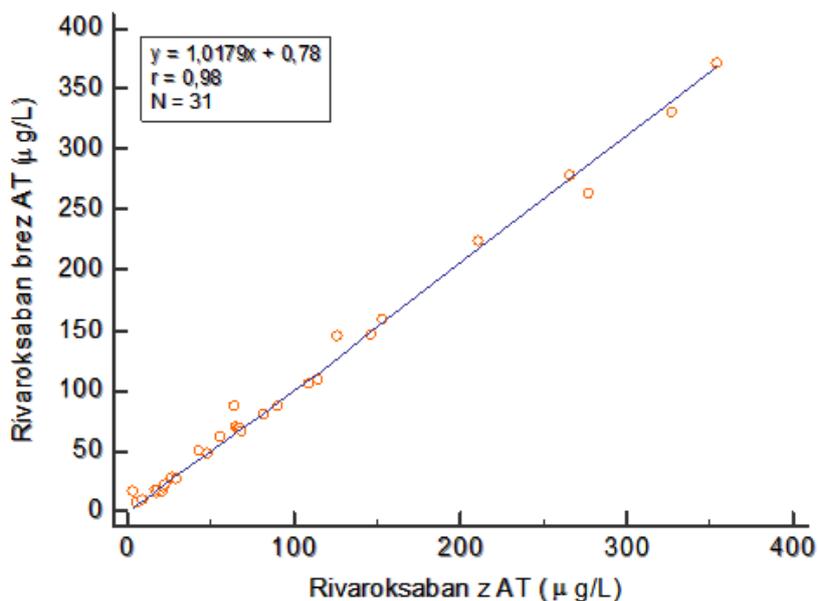
Preglednica IV: Rezultati vrednotenja **točnosti** metode za rivaroksaban

N = 20	KON. L 63,80 µg/L	KON. M 144,30 µg/L	KON. H 315,60 µg/L
<i>Metoda z AT</i>	11,6 %	-9,2 %	-10,2 %
<i>Metoda brez AT</i>	9,4 %	-11,4 %	-11,7 %

Pri zdravih preiskovanih, ki niso prejeli AK terapije, smo z metodo z dodanim AT izmerili vrednosti rivaroksabana 0–20 µg/L z aritmetično sredino 5,1 µg/L in SD 5,6. Rezultati meritev so v Prilogi I. LOB je znašal 20 µg/L, LOD 22 µg/L in LOQ 61 µg/L. Zgornja orientacijska referenčna meja (97,5-ti percentil) je znašala 19,2 µg/L. Z metodo anti-Xa brez dodanega AT je LOB znašal 23 µg/L, LOD 26 µg/L in LOQ

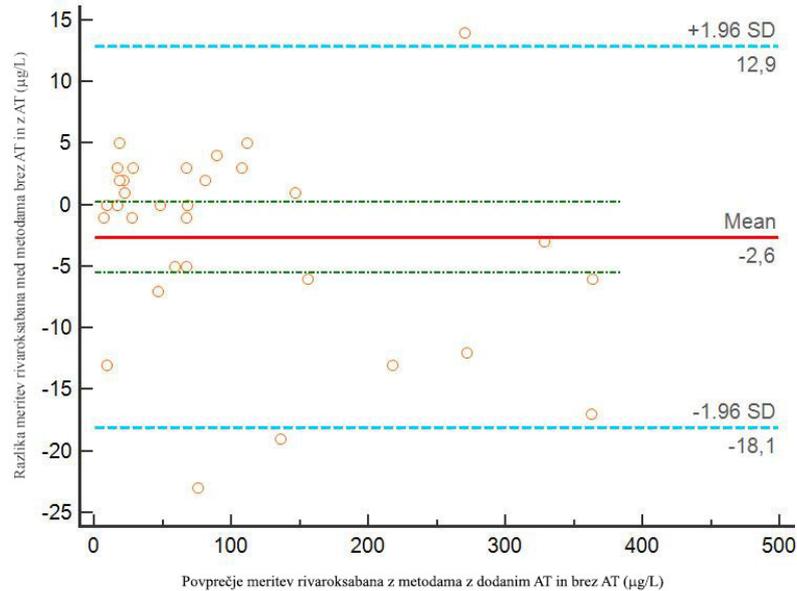
69  $\mu\text{g/L}$ .

Koncentracijo rivaroksabana smo izmerili v 33 vzorcih bolnikov. Vrednosti so znašale 3–371  $\mu\text{g/L}$  (3–360  $\mu\text{g/L}$  z AT in 7–371  $\mu\text{g/L}$  brez AT). Spearmanov koeficient korelacije med metodo anti-Xa z dodanim AT in brez njega je znašal 0,982 (Slika 13), regresijska premica pa je ustrezala enačbi  $y = 1,0179x + 0,78$ . Koncentracije na osi X so vrednosti rivaroksabana z dodanim AT, na osi Y pa vrednosti brez AT.



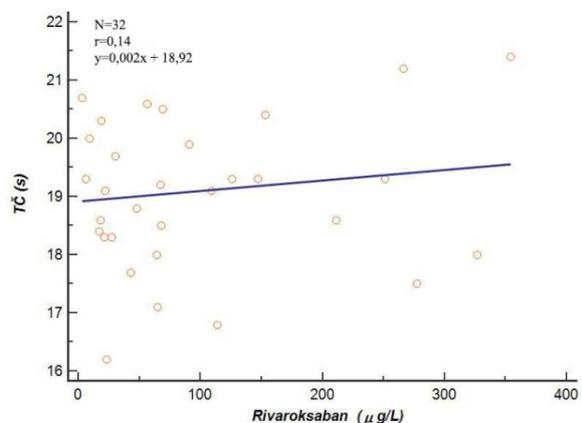
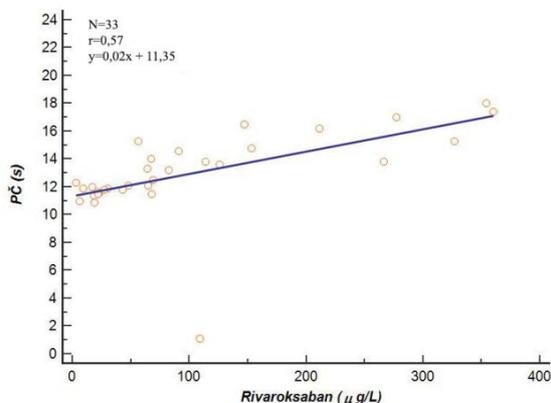
Slika 13: Regresijska premica za metodi določanja koncentracij rivaroksabana z dodanim AT in brez dodanega AT

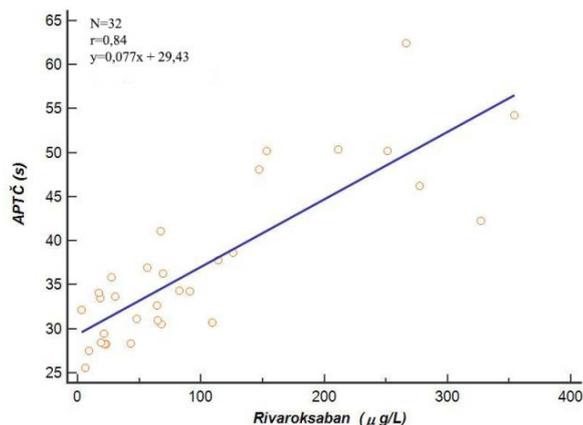
Ujemanje metod z dodanim AT in brez njega smo prikazali z Bland-Altmanovim diagramom (Slika 14). Povprečje razlik med metodama je bilo 2,6  $\mu\text{g/L}$  (-14–23  $\mu\text{g/L}$ ), 95-odstotna meja ujemanja je znašala od -18,1 do 12,9  $\mu\text{g/L}$  (modra prekinjena črta). Slučajna napaka, ki jo ocenimo s 95-odstotnim intervalom zaupanja, je znašala od -5,5 do 0,2  $\mu\text{g/L}$  (zeleno prekinjena črta) (Slika 14).



Slika 14: Bland-Altmanov diagram razlik rezultatov določanja koncentracij rivaroksabana z dodanim AT in brez dodanega AT

V 33 vzorcih smo določili tudi PČ, v 32 pa TČ in APTČ. Vrednosti PČ so znašale 48–115 % (10,9–18,0 s), vrednosti TČ 16,2–21,4 s in vrednosti APTČ 25,6–62,5 s. Povezavo med klasičnimi presejalnimi testi in metodo anti-Xa z dodanim AT smo opisali s Pearsonovim koeficientom korelacije. Med koncentracijami rivaroksabana in PČ je bila povezanost srednja (zmerna) ( $r = 0,575$ ); med rivaroksabanom in TČ neznatna ( $r = 0,136$ ), med rivaroksabanom in APTČ pa visoka ( $r = 0,838$ ). Rezultati meritev so v Prilogi II, grafični prikazi koncentracij rivaroksabana v povezavi s PČ, TČ in APTČ so na Sliki 15.





Slika 15: Grafični prikaz koncentracij rivaroksabana v vzorcih v povezavi s PČ, TČ in APTČ

## 4.2. REZULTATI MERITEV – DABIGATRAN

Za vrednotenje natančnosti oz. ponovljivosti **v seriji** in **med serijami** smo izvedli 18 meritev kontrolnih vzorcev dveh ravni in jih analizirali v dvojniku (Preglednici V in VI).

Preglednica V: Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod **v seriji** za dabigatran, izračunani iz razlik parov meritev

	<i>Reagent Hemoclot</i>		<i>Prilagojeni TČ</i>	
	<b>KON. 1</b> <i>119 µg/L</i>	<b>KON. 2</b> <i>303 µg/L</i>	<b>KON. 1</b> <i>119 µg/L</i>	<b>KON. 2</b> <i>303 µg/L</i>
N = 18				
<b>SD</b>	7,0	10,5	6,6	14,5
$\bar{X}$	110,1	283,0	105,3	284,8
<b>CV</b>	6,4 %	3,7%	6,3 %	5,1 %

Preglednica VI: Rezultati vrednotenja natančnosti dveh metod **med serijami** za dabigatran, izračunani iz povprečja parov meritev

	<i>Reagent Hemoclot</i>		<i>Prilagojeni TČ</i>	
	<b>KON. 1</b> <i>119 µg/L</i>	<b>KON. 2</b> <i>303 µg/L</i>	<b>KON. 1</b> <i>119 µg/L</i>	<b>KON. 2</b> <i>303 µg/L</i>
N = 18				
<b>SD</b>	11,6	17,2	7,4	17,8
$\bar{X}$	110,1	283,0	105,3	284,8
<b>CV</b>	10,5 %	6,1 %	7,1 %	6,2 %

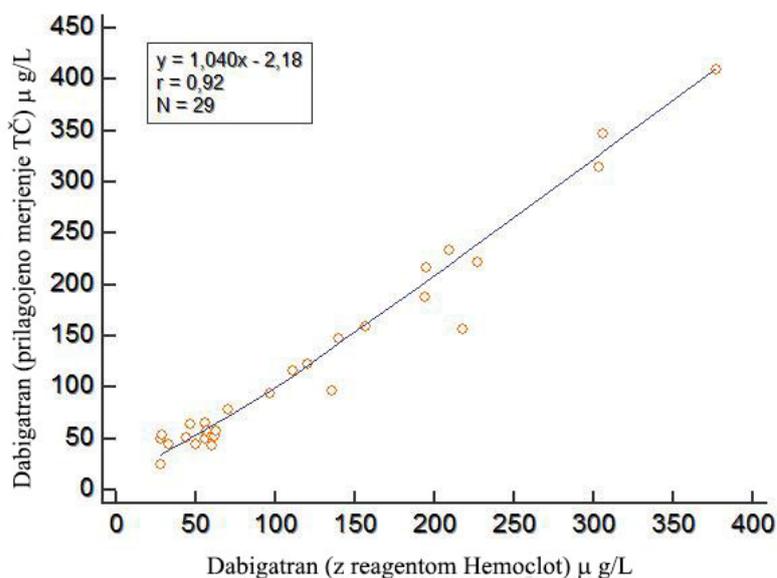
Za vrednotenje **točnosti** smo izvedli 18 meritev kontrolnih vzorcev dveh ravni in jih analizirali v dvojniku (Preglednica VII).

Preglednica VII: Rezultati vrednotenja **točnosti** metode za dabigatran

N = 18	<b>KON. 1</b> 119 µg/L	<b>KON. 2</b> 303 µg/L
<i>Reagent Hemoclot</i>	7,5 %	6,6 %
<i>Prilagojeni TČ</i>	11,5 %	6,0 %

Analizirali smo 31 vzorcev preiskovancev, ki niso prejeli AK terapije. Vse vrednosti dabigatrana, izmerjene z metodo Hemoclot, so bile pod 26 µg/L. (Za namen statistične obdelave smo vrednost pod 26 µg/L zapisali kot vrednost 26 µg/L.) Rezultati meritev so v Prilogi I. LOB, LOD in LOQ so znašale 26 µg/L. Zgornja orientacijska referenčna meja (97,5-ti percentil) je bila 26 µg/L.

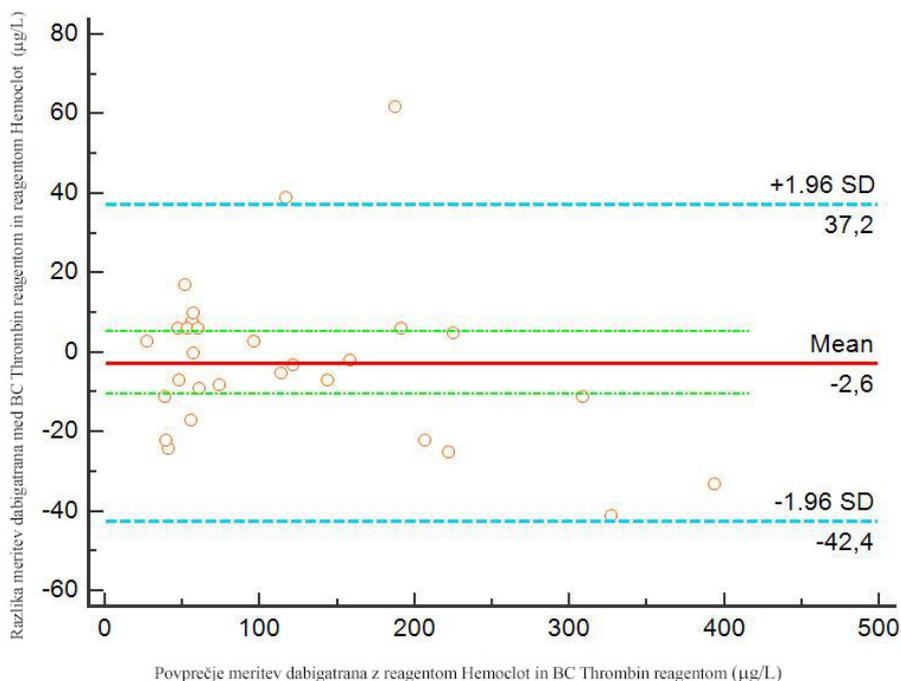
Pri prilagojeni metodi merjenja TČ je LOB znašal 12 µg/L, LOD 11 µg/L in LOQ 22 µg/L. Spearmanov koeficient korelacije med metodo Hemoclot in prilagojeno metodo merjenja TČ je znašal 0,919 ( $r = 0,919$ ), kar pomeni zelo visoko povezanost (Slika 16). Regresijska premica je ustrezala enačbi  $y = 1,040x - 2,18$ . Koncentracije na osi X so vrednosti dabigatrana z reagentom Hemoclot, na osi Y pa vrednosti s prilagojeno metodo merjenja TČ.



Slika 16: Regresijska premica za metodi določanja koncentracij dabigatrana z metodo Hemoclot in prilagojeno metodo merjenja TČ

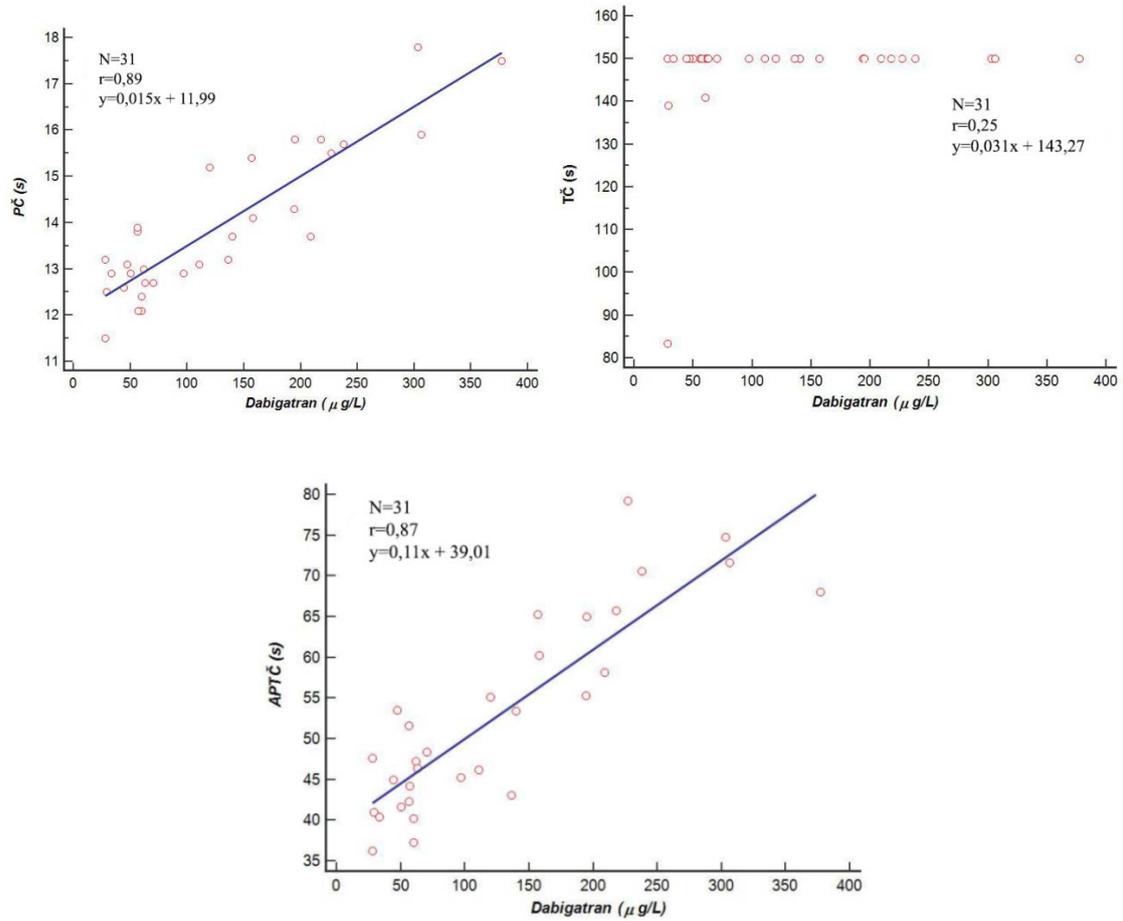
Ujemanje med metodama smo prikazali z Bland-Altmanovim diagramom (Slika 17).

Povprečje razlik je bilo  $-2,6 \mu\text{g/L}$  ( $-62$ – $41 \mu\text{g/L}$ ), 95-odstotna meja ujemanja je znašala od  $-42,4$  do  $37,2 \mu\text{g/L}$  (modra prekinjena črta). Slučajna napaka, ki jo ocenimo s 95-odstotnim intervalom zaupanja, je znašala od  $-10,3$  do  $5,1 \mu\text{g/L}$  (zelena prekinjena črta) (Slika 17).



Slika 17: Bland-Altmanov diagram razlik rezultatov določanja koncentracij dabigatrana z reagentom Hemoclot in s prilagojeno metodo merjenja TČ

V 31 vzorcih smo določili PČ, TČ in APTČ. Vrednosti PČ so znašale 49–106 % (12,1–17,8 s), vrednosti TČ od 83,4 do  $>150$  s in vrednosti APTČ 36,2–79,2 s. Povezavo med klasičnimi presejalnimi testi in metodo Hemoclot smo opisali s Pearsonovim koeficientom korelacije. Med koncentracijami dabigatrana in PČ je obstajala visoka povezanost ( $r = 0,892$ ), med dabigatranom in TČ nizka ( $r = 0,239$ ), med dabigatranom in APTČ pa spet visoka povezanost ( $r = 0,865$ ). Rezultati meritev so v Prilogi III. Koncentracije dabigatrana v povezavi s PČ, TČ in APTČ so prikazane na Sliki 18. (V namen statistične obdelave smo pri vrednostih nad  $150 \mu\text{g/L}$  in pod  $28 \mu\text{g/L}$ , uporabili vrednosti  $150 \mu\text{g/L}$  in  $28 \mu\text{g/L}$ .)



Slika 18: Grafični prikaz koncentracij dabigatrana v vzorcih v povezavi s PČ, TČ in APTČ

## 5. RAZPRAVA

V raziskavi smo 33 bolnikom na AK terapiji z rivaroksabanom določili njegovo koncentracijo z metodo anti-Xa z dodanim AT in brez njega. Ugotovili smo, da obe metodi dajeta primerljive rezultate. V vseh vzorcih smo izmerili tudi PČ, TČ in APTČ. Ugotovili smo, da sta za kvalitativno oceno AK učinka rivaroksabana primerna PČ in APTČ, kajti med metodo anti-Xa z dodanim AT in PČ je povezanost srednja, z APTČ visoka, medtem ko je s TČ ni. Določili smo spodnjo orientacijsko referenčno mejo za rivaroksaban z metodo anti-Xa (z AT), ki znaša 19,2 µg/L.

Enaintridesetim vzorcem bolnikov na AK terapiji z dabigatranom smo določili njegovo koncentracijo s komercialno metodo Hemoclot in prilagojeno metodo določanja TČ. Ugotovili smo, da sta obe metodi primerljivi. V vseh vzorcih smo izmerili tudi PČ, TČ in APTČ. Za kvalitativno oceno AK učinka dabigatrana sta primerna PČ in APTČ, saj je med njima in metodo Hemoclot povezava močna, medtem ko je s TČ ni. Zgprnja orientacijska referenčna meja za dabigatran z metodo Hemoclot znaša 26,0 µg/L.

### 5.1. RIVAROKSABAN

Vedno več raziskav potrjuje, da je merjenje koncentracij rivaroksabana z metodo anti-Xa ustrezno (38, 39). Ugotovili so, da se rezultati linearno povezujejo z referenčno metodo (tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo – LC-MS/MS) in zajemajo široko območje koncentracij, tudi terapevtsko (39). Metoda anti-Xa, s katero smo v SB Celje merili koncentracijo rivaroksabana, je bila prvotno namenjena določanju koncentracij nizkomolekularnega heparina in vsebuje AT. V nekaterih raziskavah so ugotovili, da so vrednosti rivaroksabana, izmerjene z reagentom z dodanim eksogenim AT, lažno zvišane (38). V ta namen smo določili koncentracije rivaroksabana z dodanim AT in brez njega. Za oba načina določanja rivaroksabana smo preverili ponovljivost v seriji in med serijami treh ravni kontrolnih vzorcev. Vsi CV so bili manjši od 10 % in medsebojno zelo primerljivi (Preglednica II in III). Najvišji CV smo dosegli pri nizkih vrednostih kontrolnih vzorcev. Podobne ponovljivosti (CV 1–11,8 %) za obe metodi (z AT in brez njega) so opisali že drugi (38, 39). Prav tako so bile najvišje vrednosti opisane za kontrolne vzorce nizkih vrednosti (38). Točnost meritev za obe metodi je bila primerljiva in je znašala od -11,7

do 11,6 %. V raziskavi Asmisa s sodelavci so z reagentom Biophen Heparin 6 (z AT) vrednotili točnost metode anti-Xa in dobili CV od <0,1 do 14,6 % (odvisno od koncentracije rivaroksabana v vzorcu) (39).

Za metodo z dodanim AT smo izračunali višjo vrednost LOD (22 µg/L) in LOQ (61 µg/L) kot drugi raziskovalci: Mani s sodelavci (LOQ = 10 µg/L) (38), Douxfils s sodelavci (LOD = 10 µg/L; LOQ = 30 µg/L) (40) ter Samma s sodelavci (LOD = 10 µg/L; LOQ = 20 µg/L) (41). Vzrok je lahko različno število vzorcev, različni reagenti, vzorci (zdravi prostovoljci ali kalibratorji) in analizatorji.

Pri primerjavi z metodo anti-Xa z dodanim AT in brez njega je bila enačba premice  $y = 1,0179x + 0,78$ , vrednost Spearmanovega koeficienta korelacije pa 0,982, kar kaže na zelo visoko povezanost obeh metod. Obe metodi določanja rivaroksabana dajeta primerljive rezultate, s čimer smo dokazali, da je reagent z dodanim eksogenim AT primeren za določanje rivaroksabana, ni pa njegovo dodajanje potrebno.

Z Bland-Altmanovim diagramom smo prikazali, da so rezultati meritev z dodanim AT v povprečju višji za 2,6 µg/L. Izsledok je podoben navedbam iz literature (38). Zgornja meja razlik je bila 14 µg/L, spodnja pa -23 µg/L. Meji imata relativno širok razpon, kar je lahko problem pri nizkih koncentracijah zdravila, ki so pogosto ključnega pomena za paciente, ki se pripravljajo na kirurške posege in AK zdravljenje prekinejo. 95-odstotna meja ujemanja je znašala od -18,1 do 12,9 µg/L, kar pomeni, da je 95 % naših meritev znotraj tega intervala. Slučajno napako smo ocenili s 95-odstotnim intervalom zaupanja, ki je znašal od -5,5 do 0,2 µg/L.

V nalogi nas je zanimala tudi povezava med izmerjenimi koncentracijami rivaroksabana z metodo z dodanim AT in vrednostmi presejalnih koagulacijskih testov (PČ, TČ, APTČ). PČ, podan v odstotkih, je bil v linearnem odnosu s koncentracijo rivaroksabana. Občutljivost PČ je zelo odvisna od uporabljenega tromboplastina v reagentu. V literaturi je bil kot najbolj občutljiv opisan Neoplastin® Plus (tromboplastin, izoliran iz zajčjih možganov) (39). Tromboplastin, uporabljen v naši raziskavi, je opisan kot malo občutljiv (42), zato je bilo pričakovano, da bo imel manjši delež (24 %) bolnikov, ki prejemajo rivaroksaban, podaljšan PČ kot v raziskavah, v katerih so uporabili občutljivejši trombosplastin (42). Med koncentracijo rivaroksabana in PČ je bila povezanost srednja (zmerna), kajti koeficient korelacije je znašal 0,575 ( $r = 0,575$ ). Vzrok za precej nižji koeficient korelacije, kot ga navaja Douxfils s sodelavci ( $r = 0,99-1,00$ ) (42), je v vrsti tromboplastina in v različnih vzorcih (Douxfils je uporabil normalno zmesno plazmo, ki ji

je dodajal rivaroksaban, mi pa smo uporabili plazmo bolnikov). Mi smo uporabili Thromborel S® (humani placentarni tromboplastin), ki je slabše občutljiv na rivaroksaban, zato je bil PČ podaljšan šele pri koncentracijah rivaroksabana nad 150 µg/L.

Med koncentracijami rivaroksabana in TČ povezanosti ni bilo, vsi rezultati so bili v mejah referenčnih vrednosti. Rezultate potrjujejo podatki iz literature, ki navajajo, da koncentracije rivaroksabana v plazmi nimajo vpliva na TČ in je slednji vedno v mejah referenčnih vrednosti (43).

Med koncentracijami rivaroksabana in APTČ je obstajala visoka povezanost, saj je koeficient korelacije znašal 0,838 ( $r = 0,838$ ). V literaturi navajajo, da je PČ boljši kazalec AK učinka rivaroksabana kot APTČ, kar pa je odvisno od uporabljenega reagenta (43). APTČ ni dovolj občutljiv pri nizkih koncentracijah rivaroksabana (<50 µg/L) (43). V našem primeru je bil APTČ podaljšan šele pri koncentracijah rivaroksabana nad 100 µg/L. Zgornja orientacijska referenčna meja je znašala 19,2 µg/L in je precej višja od navedene v literaturi (<5 µg/L), ki je bila izmerjena z LC-MS/MS (10). Pri vrednostih pod 5 µg/L rivaroksabana, menda ni več mogoče zaznati vpliva AK zdravil (10). Ker je bilo ugotovljeno, da vrednosti rivaroksabana pod 30 µg/L, ne pomenijo večjega tveganja za krvavitve pri kirurških posegih (44), je sicer zgornja meja, določena z našo metodo, klinično sprejemljiva, je pa ne moremo natančno izmeriti, saj je LOQ metode kar 61 µg/L.

## 5.2. DABIGATRAN

V nekaj raziskavah so ugotovili, da se koncentracije dabigatrana, izmerjene z metodo Hemoclot, linearno povezujejo z referenčno metodo (LC-MS/MS). Slabšo povezavo so opisali pri nižjih vrednostih (<50 µg/L), ko metoda ni več dovolj natančna in rezultati niso zanesljivi (45). Pri koncentracijah dabigatrana, nižjih od 100 µg/L, je znašal koeficient korelacije med metodo Hemoclot in LC-MS/MS 0,94 (46) ali 0,95 (45). Pri koncentracijah dabigatrana pod 50 µg/L, pa je bil koeficient korelacije 0,79 (47).

Nekatere raziskave navajajo, da je merjenje koncentracij dabigatrana zanesljivejše s prilagojeno metodo merjenja TČ kot z metodo Hemoclot (45, 47). Oba seta reagentov vsebujeta trombin. Tako smo metodo merjenja TČ prilagodili do tolikšne mere, da je sprejemljiva za določanje dabigatrana. Najpomembnejši spremembi sta bili redčenje vzorca z NaCl in SHP ter podaljšanje časa meritve do 500 s. V ta namen smo 31 plazemskim vzorcem določili koncentracijo dabigatrana z obema reagentoma. Za obe

uporabljeni metodi je bila ponovljivost v seriji in med serijami dobra, saj so bili vsi CV  $\leq 10\%$  in primerljivi med seboj (Preglednica V, VI). Podobno so ugotovili Antović in sodelavci: CV za ponovljivost med serijami z istim reagentom je bil 7,3 % in 5,7 % (110 in 310  $\mu\text{g/L}$ ) (47). Prav tako Stangier in Feuring v svoji raziskavi navajata od 1,2 do 3,1-odstotno ponovljivost v seriji in od 4,0 do 10,0-odstotno ponovljivost med serijami (Hemoclot) (48).

Koeficienti variacij, izračunani za obe metodi, so bili primerljivi med seboj in so znašali pod 12,0 % (Preglednica VII), medtem ko sta Stangier in Feuring v svoji raziskavi za točnost uporabila dve koncentracijski območji vzorcev in dobila CV od -20,7 do 5,6 % (47,15  $\mu\text{g/L}$ ; 707,3  $\mu\text{g/L}$ ) (48).

Z metodo Hemoclot smo določili tudi LOB, LOD in LOQ. Vse vrednosti so znašale 26  $\mu\text{g/L}$  in so primerljive oziroma celo nekoliko boljše, kot jih navajajo v literaturi. Mi smo uporabili originalne kalibratorje proizvajalca. Spodnja meja kalibracijske krivulje je ekstrapolirana vrednost najnižjega kalibratorja. Douxfils s sodelavci je v svoji raziskavi z metodo Hemoclot® (Hyphen BioMed, Francija) dobil nižje vrednosti LOQ in LOD (53  $\mu\text{g/L}$ ; 22  $\mu\text{g/L}$ ), kot jih navaja proizvajalec (100  $\mu\text{g/L}$ ; 30  $\mu\text{g/L}$ ), vendar je pri tem uporabil lastne kalibratorje (45).

Enačba regresijske premice med metodo Hemoclot in prilagojeno metodo merjenja TČ je znašala  $y = 1,040x - 2,18$ , vrednost Spearmanovega koeficienta korelacije pa je 0,919, kar kaže na zelo visoko povezanost obeh metod. Obe metodi določanja dabigatrana dajeta primerljive rezultate, kar pomeni, da je prilagojena metoda določanja TČ, ki je cenejši in preprostejši test, primeren tudi za rutinsko določanje dabigatrana.

Z Bland-Altmanovim diagramom smo prikazali, da z metodo Hemoclot izmerimo v povprečju za 2,6  $\mu\text{g/L}$  višje vrednosti dabigatrana kot z metodo prilagojenega določanja TČ. Zgornja meja razlik je bila 41  $\mu\text{g/L}$ , spodnja pa -62  $\mu\text{g/L}$ . Meji imata dokaj širok razpon, kar je problem pri nizkih vrednostih dabigatrana v vzorcih; 95-odstotna meja ujemanja je znašala od -42,4 do 37,2  $\mu\text{g/L}$ . Slučajno napako smo ocenili s 95-odstotnim intervalom zaupanja, ki je znašal od -10,3 do 5,1  $\mu\text{g/L}$ .

Med koncentracijami dabigatrana in PČ ter APTČ je obstajala močna povezava ( $r = 0,892$ ; 0,865). Korelacijo smo primerjali z rezultati raziskave Antovića s sodelavci, ki je prav tako dobil močno povezavo med koncentracijami dabigatrana ter PČ (INR) in APTČ ( $r = 0,69$ ; 0,76) (47). Pri tem je koncentracijo dabigatrana v vzorcih meril z referenčno metodo LC-MS/MS. V drugi raziskavi so plazemske koncentracije dabigatrana z okvirnimi koncentracijami 50  $\mu\text{g/L}$  povzročile podaljšanje APTČ nad 40 s, medtem ko se je PČ

(izražen v INR) podaljšal šele pri 200 µg/L dabigatrana (49). Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi mi. Vrednosti APTČ so se podaljšale že pri koncentracijah dabigatrana nad 45 µg/L, vrednosti PČ (INR) pa pri nad 157 µg/L dabigatrana. Med koncentracijami dabigatrana in vrednostmi TČ je obstajala nizka povezanost ( $r = 0,239$ ), saj je reagent za določanje TČ preobčutljiv pri visokih koncentracijah dabigatrana (47). Tako smo skoraj pri vseh vrednostih dabigatrana nad 30 µg/L izmerili vrednosti TČ nad 150 s. Podaljšan TČ v vzorcu nam daje samo okvirno informacijo o navzočnosti dabigatrana, zaradi svoje visoke občutljivosti pa rezultat TČ v mejah referenčnih vrednosti zanesljivo izključi navzočnost dabigatrana (50).

Za določitev zgornje orientacijske referenčne meje smo analizirali 31 vzorcev posameznikov, ki niso prejeli dabigatrana in so bili navidezno zdravi. Vse analize so bile opravljene z metodo Hemoclot in v enakih okoliščinah, kot pri pacientih na AK terapiji (enak predanalitski postopek, ista kombinacija reagentov, kontrol, kalibratorjev, ista merilna oprema in metoda določanja). Meja detekcije določanja koncentracij dabigatrana z metodo Hemoclot je znašala 26 µg/L. V vseh vzorcih smo izmerili koncentracije dabigatrana pod 26 µg/L. Zgornja referenčna meja (97,5-ti percentil meritev primerjalne skupine), ki je klinično najpomembnejša, je v našem primeru znašala 26 µg/L in je primerljiva z navedeno v literaturi (<30 µg/L) (10). Pri vrednostih dabigatrana pod 30 µg/L, naj ne bi bilo zaznati vpliva AK zdravil (10). Tudi Pernod s sodelavci je v svoji raziskavi ugotovil, da vrednosti dabigatrana pod 30 µg/L ne zvečajo tveganja za krvavitve pri kirurških posegih (44).

## 6. SKLEP

1. Metodi določanja rivaroksabana z dodanim AT in brez njega dajeta primerljive rezultate, s čimer smo dokazali, da je reagent z dodanim eksogenim AT primeren za določanje rivaroksabana, čeprav njegovo dodajanje ni potrebno.
2. Za kvalitativno oceno antikoagulacijskega učinka rivaroksabana sta od klasičnih koagulacijskih testov primerna samo PČ (izražen v sekundah in deležih) in APTČ. Metoda anti-Xa se je zmerno povezovala s PČ, močno z APTČ in praktično nič s TČ, zato TČ ni primeren test zaznavanja antikoagulacijskega učinka rivaroksabana.
3. Zgornja orientacijska referenčna meja rivaroksabana izmerjena z metodo anti-Xa z dodanim AT na Oddelku za laboratorijsko medicino SB Celje znaša 19,2 µg/L.
4. Metodi določanja dabigatrana z reagentom Hemoclot in prilagojeno metodo določanja TČ dajeta primerljive rezultate, s čimer smo dokazali, da je prilagojena metoda določanja TČ, ki je cenejša in preprostejša, uporabna za rutinsko določanje.
5. Za kvalitativno oceno antikoagulacijskega učinka dabigatrana sta od klasičnih koagulacijskih testov primerna samo PČ in APTČ, saj je med njima in koncentracijo dabigatrana močna povezava. TČ ni primeren kazalec AK učinka dabigatrana, nam pa podaljšani TČ daje informacijo o prisotnosti dabigatrana v vzorcu.
6. Zgornja orientacijska referenčna meja dabigatrana izmerjena z reagentom Hemoclot na Oddelku za laboratorijsko medicino SB Celje znaša 26,0 µg/L.

## 7. LITERATURA

1. Andoljšek D. Interna medicina, 4. Izdaja. Slovensko medicinsko društvo Ljubljana 2011;1360-1389.
2. Stegnar M. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami, Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika. Klinični center Ljubljana 2005.
3. <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/hypercoagulable-states/>, dostopno 01.02.2016.
4. [http://usmlewiki.org/index.php?title=USMLE Wiki: Hemodynamic Disorders](http://usmlewiki.org/index.php?title=USMLE_Wiki:_Hemodynamic_Disorders), dostopno: 01.02.2016.
5. <http://sandwalk.blogspot.si/2007/04/blood-clotting-basics.html>, dostopno:20.02.2016.
6. [https://en.wikipedia.org/wiki/Factor\\_XIII](https://en.wikipedia.org/wiki/Factor_XIII), dostopno:20.02.2016.
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/Fibrinolysis>, dostopno:01.02.2016.
8. Toplišek J, Mavri A, Vene N. Priročnik za obravnavo bolnika v antikoagulacijski ambulanti, Sekcija za antikoagulacijsko zdravljenje in preprečevanje trombemboličnih bolezni. Slovensko zdravniško društvo Novo mesto 2007.
9. Gomez-Outes A, Suarez-Gea ML, Calvo-Rojas G, Lecumberri R, Rocha E, Pozo-Hernandez C, Terleira-Frernandez A, Vargas-Castrillon E. Discovery of anticoagulant drugs: a historical prespective. *Curr Drug Discov Technol.* 2012; 9(2); 83-104.
10. Mavri A. Priročnik za uporabo novih peroralnih antikoagulacijskih zdravil v klinični praksi, Sekcija za antikoagulacijsko zdravljenje in preprečevanje trombemboličnih bolezni pri Združenju za žilne bolezni. Slovensko zdravniško društvo Ljubljana 2012.
11. Dodatek I, Povzetek glavnih značilnosti zdravila Xarelto, Bayer d. o. o.  
Dostopno: <http://www.trombo.net/docs/SPCXarelto.pdf><04.09.2015.
12. <https://www.pinterest.com/pin/139611657173325241/>, dostopno:19.02.2016.
13. Xarelto, rivaroxaban. European medicines agency, Science medicines health, 2009  
Dostopno:  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/00944/human\\_med\\_001155.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/00944/human_med_001155.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)<23.09.2015.
14. Rivaroxaban, Wikipedia; Dostopno: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rivaroxaban>.

15. <https://en.wikipedia.org/wiki/Rivaroxaban>, dostopno:01.02.2016.
16. Dodatek I, Povzetek glavnih značilnosti zdravila Pradaxa. Boehringer Ingelheim RCV GmbH&Co KG  
Dostopno: [http://www.ema.europa.eu/docs/sl\\_SI/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000829/WC500041059.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf)<15.09.2015>.
17. Pradaxa, dabigatranetexilate. European medicines agency, Science medicines health, 2008 Dostopno:  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000829/human\\_med\\_000981.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000829/human_med_000981.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)<23.09.2015>.
18. <http://newdrugapprovals.org/2015/09/01/dabigatran/>, dostopno:01.02.2016.
19. Stangier J, Rathgen K, Stähle H, Gansser D, Roth W. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of dabigatran etexilate, a new oral direct thrombin inhibitor, in healthy male subject. British Journal of Clinical Pharmacology 2007; 292-303.
20. Charles VP, Reilly PA, Eikelboom J, Glund S, Erhamme P, Bernstein R, Dubiel R, Huisman M, Hylek E, Kamphuisen P, Kreuzer J, Levy J, Sellke F, Stangier J, Steiner T, Wang B, Kam CW, Weitz J. Idarucizumab for Dabigatran Reversal. The New England journal of medicine 2015; 373(6): 511-520.
21. Rivaroxaban (Xarekto) levels. Department of Pathology and Laboratory Medicine. 2013. Dostopno:  
[https://www.ucdmc.ucdavis.edu/pathology/services/clinical/change\\_of\\_service/CP/2013/Laboratory\\_Change\\_of\\_Service\\_20130520\\_Rivaroxaban.pdf](https://www.ucdmc.ucdavis.edu/pathology/services/clinical/change_of_service/CP/2013/Laboratory_Change_of_Service_20130520_Rivaroxaban.pdf) <08.08.2016>.
22. Priložena navodila proizvajalca reagentov: Hemoclot Thrombin Inhibitors proizvajalca Hyphen BioMed, marec 2015.
23. Navodila proizvajalca analizatorja BCS XP, Siemens.
24. <http://isequilab.com.mx/bcs-xp/>, dostopno:13.01.2016.
25. Priložena navodila proizvajalca reagentov: Siemens Berichrom Heparin, 2012.
26. Priložena navodila proizvajalca kalibtarorjev in kontrol: Technoview Rivaroxaban Calibrator Set in Technoview Rivaroxaban Control Plasma.
27. <http://www.aniara.com/pdf/SS-ANIARA-HowtotestforDabigatran.pdf>, dostopno:14.01.2016.
28. Priložena navodila proizvajalca reagentov: Siemens BC Thrombin, maj 2008.

29. Priložena navodila proizvajalca kalibratorjev: Dabigatran Plasma Calibrator proizvajalca Hyphen BioMed, junij 2014.
30. Priložena navodila proizvajalca kontrol: Dabigatran Control Plasma proizvajalca Hyphen BioMed, 2014.
31. Priložena navodila proizvajalca reagentov: Siemens Thromborel S, julij 2012.
32. Practical-Haemostasis.com; Dostopno <http://.practical-haemostasis.com> <18.11.2015>.
33. Priložena navodila proizvajalca reagentov: Siemens Pathromtin SL, junij 2010.
34. Zupan J. Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. Kemijski inštitut Ljubljana, Slovenija 2009.
35. Lajovic J. Ujemanje metod merjenja-praktični pristop. Revija ISIS 2010; 44-48.
36. Horowitz G, Altaie S, Boyd J, Ceriotti F, Garg U, Horn P, Pesce A, Sine H, Zakowski J. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory. IFCC 2008; 15-28.
37. Uljarević P, Fliser E. Določevanje referenčnih intervalov; Zbornik predavanj. Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino maj 2016.
38. Mani H, Rohde G, Stratmann G, Hesse C, Herth N, Schwers S, Perzborn E, Lindhoff-Last E. Accurate determination of rivaroxaban levels requires different calibrator sets but not addition of antithrombin. *Thrombosis and Haemostasis* 2012; 108.1: 191-198.
39. Samama M M, Contant G, Spiro T E, Perzborn E, Le Flem L, Guinet C, Yves Gourmelin Gabriele Rohde, Martinoli J-L. Laboratory assessment of rivaroxaban: a review. *Thrombosis Journal* 2013; 11:11.
40. Douxfils J, Tamigniau A, Chatelain B, Chatelain C, Wallemacq P, Dogne JM, Mullier F. Comparison of calibrated Chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban. *Thrombosis and Haemostasis* 2013; 110.4: 723-731.
41. Samama MM, Contatn G, Spiro TE, in sodelavci. Evaluation of the anti-factor Xa chromogenic assay for the measurement of rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls. *Thrombosis and Haemostasis* 2012; 107: 379-387.
42. Douxfils J, Mullier F, Loosen C, Chatelain C, Chatelain B, Dogne J-M. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: Laboratory recommendations

- for the monitoring of rivaroxaban and review of the literature. *Thrombosis Research* 2012; 956-966.
43. Mani H. Interpretation of coagulation test results under direct oral anticoagulants. *International Journal of Laboratory Hematology* 2014; 261-268.
44. Pernod G, Albaladejo P, Godier A, Samama C M, Susen S, Gruel Y, Blais N, Fontana P, Cohen A, Llau J V. Management of major bleeding complications and emergency surgery in patients on long-term treatment with direct oral anticoagulants, thrombin or factor-Xa inhibitors, Proposals of the Working Group on Perioperative Haemostasis (GIHP) – March 2013. *Archives of Cardiovascular Disease* 2013; 382-393.
45. Douxfils J, Dogné J-M, Mullier F, Chatelain B, Rönquist-Nii Y, Malmström R E, Hjemdahl P. Comparison of calibrated dilute thrombin time and aPTT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with dabigatran etexilate. *Thrombosis and Haemostasis* 2013; 110.3: 543-549.
46. Božič Mijovski M, Malmstrom R E, Malovrh P, Antovic J P, Vene N, Šinigoj P, Mavri A. Diluted thrombin time reliably measures low to intermediate plasma dabigatran concentrations. *Annals of Clinical Biochemistry* 2015; 1-6.
47. Antovic J P, Skeppholm M, Eintrei J, Eriksson Boija E, Söderblom L, Norberg E-M, Onelöv L, Rönquist-Nii Y, Pohanka A, Beck O, Hjemdahl P, Malmström E R. Evaluation of coagulation assays versus LC-MS/MS for determinations of dabigatran concentrations in plasma. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 1875–1881.
48. Stangier J, Feuring M. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012; 23(2): 138-43.
49. Lindahl L T, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Gustafsson K M, Stigendal L, Sten-Linder M, Strandberg K, Hillarp A. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thrombosis and Haemostasis* 2011; 105.2: 1-8.
50. Baglin T, Hillarp A, Tripodi A, Elalamy I, Buller H, Ageno W. Measuring Oral Direct Inhibitors (ODIs) of thrombin and factor Xa: A recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2013; 11:756-60.

**PRILOGA I****REZULTATI MERITEV DOLOČANJA RIVAROKSABANA IN DABIGATRANA PRI PRIMERJALNI SKUPINI PREISKOVANCEV**

Št. vzorca	Konc. rivaroksabana (z AT) (µg/L)	Konc. rivaroksabana (brez AT) (µg/L)	Konc. dabigatrana (reagent Hemoclot) (µg/L)	Konc. dabigatrana (prilagojena metoda merjenja TČ) (µg/L)
1	7	9	<26	7
2	12	15	<26	11
3	7	8	<26	6
4	12	16	<26	6
5	5	5	<26	7
6	0	1	<26	6
7	11	14	<26	7
8	0	2	<26	7
9	0	9	<26	7
10	11	14	<26	6
11	0	5	<26	7
12	0	0	<26	9
13	10	9	<26	7
14	6	7	<26	12
15	2	3	<26	7
16	0	0	<26	6
17	5	15	<26	6
18	0	9	<26	6
19	20	23	<26	9
20	0	2	<26	6
21	4	4	<26	7
22	0	1	<26	6
23	0	2	<26	7
24	4	8	<26	5
25	3	3	<26	6
26	1	1	<26	6
27	0	8	<26	7
28	5	12	<26	6
29	13	13	<26	6
30	17	20	<26	6
31	4	5	<26	6

\* V namen statistične obdelave smo za vrednosti pod 26, uporabili vrednost 26.

**PRILOGA II****REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ RIVAROKSABANA Z DODANIM AT IN  
BREZ AT**

Št. vzorca	PČ (%)	PČ (s)	PČ (INR)	TČ (s)	APTČ (s)	Konc. rivaroksabana (z AT) (µg/L)	Konc. rivaroksabana (brez AT) (µg/L)
1	50	17,4	1,5	-	-	360	366
2	107	11,6	0,98	16,2	28,3	23	22
3	63	15,3	1,31	20,6	37,0	56	61
4	106	11,6	0,99	18,3	29,5	21	16
5	109	11,4	0,97	18,6	33,5	18	15
6	83	13,3	1,13	18,0	32,7	64	87
7	75	14,0	1,19	19,2	41,1	67	68
8	97	12,3	1,03	20,7	32,2	3	16
9	92	12,5	1,06	20,5	36,3	69	66
10	78	13,6	1,15	19,3	38,7	126	145
11	67	14,8	1,26	20,4	50,2	153	159
12	99	12,0	1,02	18,4	34,1	17	17
13	97	12,1	1,03	18,8	31,2	48	48
14	67	14,6	1,25	19,9	34,3	91	87
15	105	11,5	0,89	18,5	30,6	68	68
16	48	18,0	1,53	21,4	54,3	354	371
17	75	13,8	1,18	16,8	37,8	114	109
18	100	11,9	1,01	19,7	33,7	30	27
19	102	11,8	1,00	18,3	35,9	27	28
20	92	11,9	1,05	20,0	27,5	9	9
21	103	11,8	1,00	17,7	28,4	43	50
22	50	16,2	1,48	18,6	50,4	211	224
23	53	/	1,41	19,3	50,2	251	/
24	72	13,2	1,20	21,0	34,4	82	80
25	94	11,5	1,05	19,1	28,3	22	20
26	103	10,9	0,99	20,3	28,5	19	17
27	66	13,8	1,25	21,2	62,5	266	278
28	52	17,0	1,16	17,5	46,3	277	263
29	63	15,3	1,31	18,0	42,3	327	330
30	86	11,2	1,38	19,1	30,7	109	106
31	99	12,1	1,03	17,1	31,0	65	70
32	115	11,0	0,93	19,3	25,6	6	7
33	55	16,5	1,41	19,3	48,1	147	146

\*Rezultati, zapisani zeleno, so bili pridobljeni z meritvami iz zamrznjene plazme.

**PRILOGA III****REZULTATI MERITEV KONCENTRACIJ DABIGATRANA Z REAGENTOM  
HEMOCLOT IN S PRILAGOJENO METODO MERJENJA TČ**

Št. vzorca	PČ (%)	PČ (s)	PČ (INR)	TČ (s)	APTČ (s)	Konc. dabigatrana (reagent Hemoclot) (µg/L)	Konc. dabigatrana (prilagojena metoda merjenja TČ) (µg/L)
1	87	12,9	1,09	>150	41,6	50	44
2	83	13,1	1,12	>150	53,5	47	64
3	76	13,7	1,17	>150	53,4	140	147
4	97	12,1	1,03	>150	40,2	60	52
5	92	12,5	1,06	139,0	41,0	29	53
6	49	17,8	1,52	>150	74,8	303	314
7	63	15,2	1,30	>150	55,1	120	123
8	87	12,9	1,09	>150	45,3	97	94
9	70	14,3	1,22	>150	55,3	194	188
10	61	15,5	1,32	>150	79,2	227	222
11	82	13,2	1,13	>150	47,6	<28	50
12	75	13,8	1,18	>150	42,3	56	50
13	83	12,9	1,13	>150	40,4	33	44
14	91	12,6	1,07	>150	45,0	44	51
15	77	13,7	1,16	>150	58,2	209	234
16	74	13,9	1,18	>150	51,6	56	65
17	72	14,1	1,20	>150	60,3	158	/
18	98	12,1	1,03	>150	44,2	57	57
19	59	15,8	1,35	>150	65,0	195	217
20	106	11,5	0,97	83,4	36,2	<28	25
21	91	12,7	1,08	>150	48,4	70	78
22	49	17,5	1,50	>150	68,0	377	410
23	86	13,0	1,11	>150	47,2	62	52
24	94	12,4	1,05	140,9	37,3	60	43
25	84	13,2	1,12	>150	43,1	136	97
26	59	15,8	1,36	>150	65,8	218	156
27	62	15,4	1,32	>150	65,3	157	159
28	78	12,7	1,15	>150	46,4	63	57
29	58	15,9	1,37	>150	71,6	306	347
30	85	13,1	1,12	>150	46,2	111	116
31	60	15,7	1,35	>150	70,6	238	/

\*Rezultati, zapisani zeleno, so bili pridobljeni z meritvami iz zamrznjene plazme.

\*\* V namen statistične obdelave smo za vrednosti nad 150 in pod 28, uporabili vrednosti 150 in 28.