

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA PETRE

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA PETRE

VPLIV *ABCB1* POLIMORFIZMOV NA FARMAKOKINETIČNI PROFIL
RIVAROKSABANA TER POVEZAVA Z UČINKOVITOSTJO IN VARNOSTJO
ZDRAVLJENJA BOLNIKOV PO ARTROPLASTIKI KOLKA ALI KOLENA

ASSOCIATION OF *ABCB1* POLYMORPHISMS WITH PHARMACOKINETIC PROFILE
OF RIVAROXABAN, EFFICACY AND SAFETY IN PATIENTS AFTER HIP OR KNEE
ARTHROPLASTY

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Aleša Mrharja in somentorstvom prof. dr. Uroša Potočnika. Klinični del naloge sem izvedla na Oddelku za ortopedijo v Univerzitetnem kliničnem centru Maribor. Laboratorijska analiza vzorcev je potekala na Centru za transfuzijsko medicino Univerzitetnega kliničnega centra Maribor in v Centru za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko laboratorijskega centra Medicinske fakultete v Mariboru.

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof. dr. Alešu Mrharju za strokovno in organizacijsko pomoč ter potrpežljivost. Zahvaljujem se asist. dr. Mitji Pišlarju in izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju za pomoč pri statistični obdelavi podatkov ter izgradnji farmakokinetičnega modela. Iskrena hvala Centru za transfuzijsko medicino, še posebej pa Mariji Šega, za izvedbo meritev rivaroksabana ter vse nasvete in klepete. Izredno sem hvaležna tudi vsem zaposlenim na Oddelku za ortopedijo, še posebaj medicinskim sestram za vse odvzeme krvi. Za pomoč in nasvete pri obdelavi podatkov iz genetike se zahvaljujem asist. dr. Katji Repnik. Za potrpežljivost in vzpodbudo se zahvaljujem tudi svojim sodelavcem, še posebej Barbari Tašker za strokovne in prijateljske debate.

Izdelava te naloge bi bila izredno težka brez podpore in vzpodbude svoje družine. Zahvaljujem se možu Borisu za potrpežljivost pri izgubljenih trenutkih, ki jih nisva uspela preživeti skupaj, hkrati pa »vztrajno« vzpodbujanje ob nastajanju te naloge. Hvala mojima otrokomoma, Vidu in Luki, ki sta morala velikokrat potrpeti brez mame ob očetu ali mojih starših, katerim se prav tako iskreno zahvaljujem za vso podporo in pomoč na moji življenjski poti.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložno samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Aleša Mrharja in somentorstvom prof. dr. Uroša Potočnika.

Maja Petre

Ljubljana, julij 2016

Člani komisije za zagovor in oceno magistrske naloge:

Predsednik: Izr. prof. dr. Tomaž Vovk

Mentor: Prof. dr. Aleš Mrhar

Somentor: Prof. dr. Uroš Potočnik

Član: Izr. prof. dr. Barbara Ostanek

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD	1
1.1 ARTROPLASTIKA KOLKA IN KOLENA.....	1
1.2 ZAPLETI PO ARTROPLASTIKI KOLENA ALI KOLKA.....	1
1.2.1 Venska tromboembolija.....	1
1.2.2 Kravavitve.....	3
1.3 ZDRAVILA ZA PREPREČEVANJE VENSKE TROMBOEMBOLIJE.....	6
1.3.1 Nizkomolekularni heparini.....	6
1.3.2 Varfarin.....	8
1.3.3 Fondaparinuks	8
1.3.4 Novi direktni peroralni antikoagulantri.....	9
1.4 RIVAROKSABAN.....	10
1.4.1 Mehanizem delovanja.....	10
1.4.2 Farmakodinamika.....	11
1.4.3 Farmakokinetika	12
1.4.4 Raziskave populacijske farmakokinetike in farmakodinamike	14
1.4.5 Raziskave rivaroksabana pri ortopedski tromboprofilaksi	15
1.5 TRANSMEMBRANSKI PRENAŠALEC ABCB1.....	18
1.5.1 Struktura proteina.....	18
1.5.2 Mehanizem delovanja proteina	18
1.5.3 Fiziološka vloga proteina.....	19
1.5.4 Polimorfizmi gena <i>ABCB1</i>	20
2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	23
3. MATERIALI IN METODE	25
3.1 BOLNIKI	25
3.2 ZBIRANJE PODATKOV	26
3.3 ODVZEMI KRVI	26
3.4 DOLOČANJE PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ RIVAROKSABANA	27
3.5 IZOLACIJA DNA IN RNA IZ KRVI	27
3.6 GENOTIPIZACIJA IZBRANIH POLIMORFIZMOV	29
3.7 MERJENJE IZRAŽANJA GENA <i>ABCB1</i>	30
3.8 ASOCIACIJSKE ANALIZE	32
3.9 NONMEM model	32
3.9.1. Farmakokinetična analiza plazemskih podatkov	32
3.9.2. Osnovni model	33
3.9.3. Model sočasnih spremenljivk	33
3.9.4. Analiza ustreznosti modela	34
3.10. STATISTIČNA ANALIZA.....	34

4. REZULTATI	35
4.1. BOLNIKI	35
4.2. IZIDI UČINKOVITOSTI ZDRAVLJENJA	38
4.3. NEŽELENI UČINKI	39
4.4. FREKVENCE GENOTIPOV, ALELOV IN HAPLOTIPOV IZBRANIH POLIMORFIZMOV	41
4.5. IZRAŽANJE GENA ABCB1.....	43
4.6. POVEZAVA MED IZBRANIMI POLIMORFIZMI IN IZIDI ZDRAVLJENJA	45
4.7. POVEZAVE MED HAPLOTIPI IN IZIDI ZDRAVLJENJA	47
4.8. FARMAKOKINETIČNI MODEL RIVAROKSABANA.....	48
4.8.1. Podatki o vključenih bolnikih.....	48
4.8.2. Koncentracije rivaroksabana.....	48
4.8.3. Razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela	51
5. RAZPRAVA.....	55
5.1. UČINKOVITOST IN VARNOST TROMBOPROFILAKSE MED TREMI RAZLIČNIMI REŽIMI ZDRAVLJENJA.....	55
5.2. NEŽELENI UČINKI MED TREMI RAZLIČNIMI REŽIMI ZDRAVLJENJA	57
5.3. VPLIV GENETSKIH DEJAVNIKOV NA UČINKOVITOST IN VARNOST RIVAROKSABANA	58
5.4. FARMAKOKINETIČNI MODEL RIVAROKSABANA.....	62
6. SKLEPI	66
7. LITERATURA	67

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Pentasaharidno zaporedje heparina</i>	7
<i>Slika 2: Kemijska struktura rivaroksabana.....</i>	10
<i>Slika 3: Mehanizem delovanja protitrombotičnih zdravil (razen varfarina) v koagulacijski kaskadi.</i>	10
<i>Slika 4: Hipotetični model humanega ABCB1 (54)</i>	19
<i>Slika 5: Nanašanje mešanice krvi in pufra PBS na reagent Lympholyte®-H</i>	28
<i>Slika 6: Plasti različnih tipov celic krvi po centrifugiraju krvi na Lympholyte®-H.....</i>	28
<i>Slika 7: Haplotipski blok med SNP-jema rs1045642 in rs4148738.</i>	42
<i>Slika 8: Izražanje gena ABCB1 pred terapijo in po 5 dneh terapije.</i>	43
<i>Slika 9: Povprečna spremembra v izražanju ABCB1 pred operacijo in 5. dni po njej glede na to, ali so bolniki po operaciji prejeli ZPČ</i>	44
<i>Slika 10: Razlika v povprečnem izražanju ABCB1 pred operacijo in 5 dni po njem , glede na to, ali so bolniki že doma prejemali ZPČ</i>	44
<i>Slika 11: Odvisnost PČ od koncentracije rivaroksabana</i>	50
<i>Slika 12: Odvisnost aPTČ od koncentracije rivaroksabana.</i>	50
<i>Slika 13: Odvisnost očistka rivaroksabana od izražanja gena ABCB1</i>	53

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Dodatni dejavniki tveganja za VTE</i>	2
<i>Preglednica 2: Klasifikacija krvavitev</i>	5
<i>Preglednica 3: Pregled NMH glede na molekulska maso in aktivnost.....</i>	6
<i>Preglednica 4: Pregled študij populacijske PK in PD rivaroksabana</i>	15
<i>Preglednica 5: Pregled raziskav ortopedske tromboprofilakse, kjer so primerjali rivaroksaban v odmerku 10 mg dnevno z nizkomolekularnimi heparini.....</i>	17
<i>Preglednica 6: Alelne frekvence najpogostejših kodirajočih polimorfizmov pri Kavkazijskih in primerjava z ostalimi etičnimi skupinami.....</i>	20
<i>Preglednica 7: Zaporedja začetnih oligonukelotidov, uporabljenih za genotipizacijo izbranih SNP-jev.</i>	30
<i>Preglednica 8: Sestava reakcijske mešanice za PCR reakcijo</i>	30
<i>Preglednica 9: Sestava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo</i>	31
<i>Preglednica 10: Zaporedje in količine začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri qPCR reakciji.</i>	31
<i>Preglednica 11: Napačno predpisane sheme</i>	35
<i>Preglednica 12: Osnovne značilnosti vključenih bolnikov po skupinah.....</i>	36
<i>Preglednica 13: Osnovne značilnosti bolnikov po skupinah vezane na operativni poseg ..</i>	37
<i>Preglednica 14: Primerjava laboratorijskih vrednosti bolnikov med skupinami</i>	38
<i>Preglednica 15: Izidi zdravljenja med skupinami med obdobji</i>	39
<i>Preglednica 16: Pregled neželenih učinkov med skupinami.....</i>	40
<i>Preglednica 17: Analiza SNP-ja rs1045642.....</i>	42
<i>Preglednica 18: Analiza SNP-ja rs4148738.....</i>	42
<i>Preglednica 19: Primerjava povezav med genotipi in izidi poznih učinkov krvavitev s pomočjo dominantnega in recesivnega modela</i>	45
<i>Preglednica 20: Alelna asociacijska analiza SNP rs1045642 in rs4148738 na pozne izide krvavitev</i>	47
<i>Preglednica 21: Primerjava alelnih blokov glede na pozne znake krvavitev</i>	48
<i>Preglednica 22: Izmerjene plazemske koncentracije rivaroksabana v petih točkah</i>	49
<i>Preglednica 23: Povprečne koncentracije rivaroksabana in standardne deviacije v petih točkah meritev.</i>	49
<i>Preglednica 24: Parametri osnovnega farmakokinetičnega modela</i>	51
<i>Preglednica 25: Vpliv sočasnih spremenljivk na očistek (CL) in volumen porazdelitve (Vd) rivaroksabana</i>	52
<i>Preglednica 26: Odvisnost očistka rivaroksabana od izražanja gena ABCB1 za posameznega bolnika.....</i>	54

POVZETEK

Popolne artroplastike kolka in kolena so operacije z visokim tveganjem za venske tromboembolije (VTE), zato je priporočena tromboprofilaktična zaščita. Namen raziskave je bil ugotavljanje učinkovitosti in varnosti treh različnih režimov tromboprofilakse.

V prospektivno randomizirano raziskavo smo vključili 293 bolnikov. Po izključitvi 49. bolnikov, smo v nadaljno analizo vključili 244 bolnikov. Bolnike smo razporedili v 3 skupine. V 1. skupini so prejemali dalteparin 5000 ie/24 ur s.c., v 2. skupini so najprej prejemali dalteparin 5000 ie/24 ur s.c., po odpustu iz bolnišnice so prešli na rivaroksaban 10 mg/24 ur per os, v 3. skupini so ves čas prejemali rivaroksaban 10 mg/24 ur per os. Vse skupine so prejele prvi odmerek zdravila 6 ur po operaciji. Zdravljenje je potekalo do 35. dne po operaciji. Bolnike smo spremljali še 90 dni po operaciji. S stališča učinkovitosti smo spremljali pojav VTE, s stališča varnosti pa pojav krvavitev.

Rivaroksaban je substrat za protein ABCB1. V skupini 3 smo zato preučiti vpliv dveh polimorfizmov (rs1045642, rs4148738) tega gena na izide zdravljenja. Znotraj skupine 3 smo naključno izbranim 17. bolnikom iz izoliranih limfocitov izmerili izražanje gena *ABCB1* pred operacijo in 5 dni po njej. Izmerili smo plazemske koncentracije rivaroksabana, s pomočjo katerih smo postavili populacijski farmakokinetični model z orodjem NONMEM in proučevali vplive sočasnih spremenljivk na farmakokinetične parametre rivaroksabana.

Tromboprofilaktična zaščita je bila v vseh treh skupinah enako učinkovita in varna. Pogostejo pojavnost hematoma ter sekrecije iz rane ali mesta vstavljenih drenov še 5. pooperativni dan smo odkrili pri bolnikih z genotipom TT ter pri nosilcih alela T za SNP rs1045642. Ugotovili smo nižjo frekvenco haplotipa CA izračunanega iz genotipov polimorfizmov rs1045642 in rs4148738 pri obeh omenjenih kliničnih parametrih ter višjo frekvenco haplotipa TA pri bolnikih s prisotnim hematomom. Z razvojem farmakokinetičnega modela smo dokazali statistično značilno povezavo med očistkom rivaroksabana in spremembo v izražanju gena *ABCB1*, ki se je po 5. dneh zdravljenja z rivaroksabanom statistično pomembno znižala.

Zaključimo lahko, da so bili vsi trije načini tromboprofilakse enako učinkoviti in varni. Nosilci genotipa TT in nosilci alela T za polimorfizem rs1045642 ter nosilci haplotipa TA polimorfizmov rs1045642 in rs4148738 so bili povezani z večjo pojavnostjo, nosilci haplotipa CA pa z manjšo pojavnostjo klinično pomembnih ne-velikih krvavitev. Z

vključitvijo spremembe izražanja *ABCB1* v model smo pojasnili 14,7% začetne variabilnosti med posamezniki za očistek rivaroksabana.

ABSTRACT

Complete hip and knee replacements are high-risk surgical procedures for venous thromboembolism (VTE), therefore thromboprophylaxis is recommended. The purpose of the study was to establish the effectiveness and safety of three different regimes of thromboprophylaxis.

The prospective randomized study included 293 patients. After exclusion of 49 patients, 244 patients were included in further analysis. The patients were divided in 3 groups. The first group of patients received dalteparin 5000 IE/24 h sc; the second group first received dalteparin 5000 IE/24 h sc and then after discharge rivaroxaban 10 mg/24 h orally; third group received only rivaroxaban 10 mg/24 h orally. All three groups received the first dose of the drug 6 hours after the surgery. The therapy was administered until day 35 after the surgery. They were followed up for additional 90 days after the surgery. From the perspective of effectiveness we monitored the occurrence of VTE and from the perspective of safety the incidence of bleeding.

Rivaroxaban is a known substrate for the *ABCB1* protein. In group 3 we studied the impact of two polymorphisms (rs1045642, rs4148738) of this gene on the outcomes of this treatment. Within group 3 we randomly selected 17 patients to measure *ABCB1* gene expression from isolated lymphocytes prior to surgery and 5 days after the surgery. We measured the plasma concentrations of rivaroxaban to set up a population pharmacokinetic model of rivaroxaban using NONMEM tool and to study the effects of concomitant variables on the rivaroxaban pharmacokinetic parameters.

Thromboprophylaxis was equally effective and safe in all three groups. A more frequent incidence of hematoma and secretion from the wound or from the site of inserted drains on day 5 postoperatively were detected in patients with the genotype TT and in carriers of allele T of SNP rs1045642. By analysing the haplotypes of polymorphisms rs1045642 and rs4148738 we established a lower frequency of CA haplotype in both mentioned parameters and a higher frequency of TA haplotype in patients with a hematoma. Having developed the pharmacokinetic model of rivaroxaban we proved a relation between the

rivaroxaban clearance and the change in the *ABCB1* gene expression, which decreased after 5 days of treatment with rivaroxaban.

In conclusion, all three regimens were equally effective and safe. The carriers of genotype TT and T allele for polymorphism rs1045642, and carriers of TA haplotype for polymorphisms rs1045642 and rs4148738 were associated with more, and the carriers of CA haplotype with less, clinically significant non-major bleeding. Including change in *ABCB1* gene expression into the basic model, we were able to explain 14.7% of inter-individual variability in rivaroxaban clearance.

KLJUČNE BESEDE: rivaroksaban, *ABCB1* gen, ortopedска tromboprofilaksa, polimorfizmi, NONMEM

KEY WORDS: rivaroxaban, *ABCB1* gene, orthopedic thromboprophylaxis, polymorphisms, NONMEM

SEZNAM OKRAJŠAV

ANH	akutna normovolemična hemodilucija
aPTČ	aktiviran parcialni protrombinski čas
AT	avtotransfuzija
AUC	površina pod plazemsko krivuljo (ang. area under curve)
Cl	očistek
Cl _{CR}	očistek kreatinina
Cmax	maksimalna plazemska koncentracija
DNA	deoksinukleinska kislina
EMA	Evropska agencija za zdravila
GF	glomerulna filtracija
GVT	globoka venska tromboza
HIT	s heparinom sprožena trombocitopenija
HWE	Hardy-Weinbergerjevo ravnotežje
IIV	interindividualna variabilnost
INR	internacionalno mednarodno razmerje
IOAT	intraoperativna avtotransfuzija
ITM	indeks telesne mase
Ka	konstanta absorpcije
NICE	National Institute for Health and Care Excellence
NONMEM	NONlinear Mixed Effects Modeling
NMH	nizkomolekularni heparin
OFV	objektivna vrednost funkcije
OP	operacija
PAT	predoperativna avtotransfuzija
PČ	protrombinski čas
PE	pljučna embolija
POAT	pooperativna avtotransfuzija
RNA	ribonukleinska kislina
RV	rezidualna variabilnost
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
SSRI	selektivni inhibitorji prevzema serotonina
TEP	totalna endoproteza

THA	popolna artroplastika kolka (ang. total hip arthroplasty)
TKA	popolna artroplastika kolena (ang. total knee arthroplasty)
Vd	volumen porazdelitve
VT	venska tromboza
VTE	venska tromboembolija
ZPČ	zaviralec protonske črpalke

1. UVOD

1.1 ARTROPLASTIKA KOLKA IN KOLENA

Endoproteza kolena ali kolka je umetni vsadek, ki nadomesti okvarjene prizadete dele kolenskega ali kolčnega sklepa. Osnovna indikacija za vstavitev umetnega kolenskega ali kolčnega sklepa je vztrajna, huda bolečina, kjub jemanju analgetikov, ki izvira iz obrabljenega sklepa. Spremlja jo omejena gibljivost in nestabilna hoja, težave pa jih močno omejujejo pri vsakodnevnih aktivnostih. Praviloma je potrebno najprej popolnoma izčrpati konzervativno terapijo, kamor uvrščamo jemanje analgetikov, razbremenjevanje in redukcijo telesne mase. Glavni vzrok za artroplastiko je artroza sklepa. Ko do artrotičnih sprememb pride zaradi neznanega vzroka, govorimo o primarni ali idiopatični artozi. Ko je vzrok poznan, govorimo o sekundarni artozi. Sekundarna artroza praviloma prizadene mlajše bolnike in je lahko posledica številnih obolenj ali poškodb v preteklosti. Totalne endoproteze delimo na primarne in revizijske. Primarne endoproteze se implantirajo pacientom z artrozo, medtem ko se revizijske implantirajo pacientom po razmajanih totalnih endoprotezah (1, 2).

1.2 ZAPLETI PO ARTROPLASTIKI KOLENA ALI KOLKA

Velike ortopediske operacije, kamor uvrščamo popolne endoproteze kolka in popolne endoproteze kolena so lahko povezane z določenimi zapleti. Zaplete v osnovi razdelimo na zgodnje, ki nastanejo ob ali tik po posegu in pozne, ki se pojavijo v kasnejšem obdobju. Razdelimo jih na:

- kirurške oziroma mehanske, povezane s samim posegom, npr. aseptično razmajanje, zlom ali izpah proteze in druge.
- internistične, npr. venske tromboembolije, maščobne embolije, krvavitve, miokardni infarkt, pljučnica, ileus, retenca urina in druge.
- okužbe vsadka (2, 3).

1.2.1 Venska tromboembolija

Velike ortopediske operacije, kamor uvrščamo artroplastike kolka in kolena so povezane z sistemsko aktivacijo koagulacije s potencialno resnimi, lahko tudi fatalnimi vaskularnimi zapleti, kot so miokardni infarkt, kap ali venska tromboembolija (VTE). Ker te operativne

posege potrebuje pretežno starejša populacijo, se ob pridruženih srčnih, pljučnih, cerebralnih ali ledvičnih obolenjih tveganje za pooperativne vaskularne zaplete še poveča. VTE je dobro poznan vzrok za podaljšane ali ponovne hospitalizacije ali celo smrtnost, ki naj bi prve tri mesece po operaciji znašala med 0,4 do 0,6% (4).

Pri ortopedskih operacijah za vstavitev endoprotez velikih sklepov vplivajo na nastanek VTE vsi trije dejavniki Virchowe triade: zastoj krvi v venah, spremembe v koncentraciji in delovanju faktorjev strjevanja krvi ter okvara endotelija (5).

VTE se lahko izrazi kot venska tromboza (VT) ali kot pljučna embolija (PE). Pri VT pride do nastanka krvnega strdka ali tromba v intrafascialnih globokih venah, najpogosteje spodnjih okončin. Takrat govorimo o globoki venski trombozi (GVT). Kri zastaja v žepkih venskih zaklopk, kjer je pritisk krvi nizek (6). Bolniki z GVT občutijo spontano topo bolečino ali bolečino na dotik, ki je lokalizirana v mišicah meč ali stegna (ne v stopalu, sklepih, sprednjem delu noge). Značilna je difuzna oteklina, ki sega na stopalo (7). GVT pogosto poteka asimptomatsko, posebej če je omejena na golenske vene (distalna GVT). Če se trombus nahaja v femoralni ali poplitealni veni, govorimo o proksimalni GVT. Približno ena tretjina bolnikov s simptomatsko GVT, predvsem proksimalno, razvije PE. Slednja se razvije, ko trombus razpade (nastane embolus). Embolus potuje po krvi skozi srce do pljučnih arterij, kjer lahko povzroči zmanjšano izmenjavo zraka v pljučih, kar se izrazi kot bolečina v prsih in težave z dihanjem. Pogosto je lahko PE tudi fatalna (6).

Dodatni dejavniki tveganja za razvoj VTE, ki so povezani s kliničnimi značilnostmi bolnika, so prikazani v preglednici 1(5).

Preglednica 1: Dodatni dejavniki tveganja za VTE

Dodatni dejavniki tveganja za VTE		
ITM>30kg/m ²	varikozne povrhnje vene s tromboflebitisom	pomembno zmanjšana pomičnost
predhodni VTE	kronične bolezni (srčno popuščanje, pljučne bolezni, vnetne bolezni, akutne infekcijske bolezni)	oralni kontraceptivi in hormonsko nadomestno zdravljenje
starost >60 let	prirojena ali pridobljena trombofilija	rak ali aktivno rakavo obolenje
dehidracija	nosečnost in poporodno obdobje	

Pojavnost VTE je bila po artroplastikah kolka (THA) pri bolnikih, ki niso prejemali ustrezne tromboprofilakse 40-60%, proksimalno GVT je utrpelo 20-40% bolnikov. Simptomatska VTE prizadene le 2-5%. Novejše študije dokazujojo incidenco fatalne PE od 0,2-0,7%. Tveganje za nastanek VTE ostane povečano še 3 mesece po operaciji.

Pojavnost VTE po artroplastikah kolena (TKA) je večja kakor po THA in znaša 40-80%, vendar bistveno redkeje (le v 5-20%) zajame proksimalne vene. Prav tako je pomembno manjše tveganje za nastanek simptomatske VTE po odpustu kot pri THA. Manjša je tudi incidenca PE (5).

Posamezni znaki in simptomi GVT imajo majhno občutljivost in specifičnost. Pri približno 25% bolnikov, pri katerih je bil postavljen sum na GVT brez sistematične ocene, se le ta potrdi z objektivno metodo.

Diagnostični algoritem pri sumu na GVT je naslednji:

1. Ocena klinične verjetnosti (uporaba Wellsovega modela) na veliko (85% tveganje), srednjo (17% tveganje) in majhno (3% tveganje).
2. Ob majhni klinični verjetnosti določimo D-dimer (razgradni produkt križno veznega fibrina). Vrednost D-dimera je zvečana pri številnih stanjih, npr. pri krvavitvah, vnetjih, poškodbah, malignomih, hematomih, nosečnosti. Če je negativen, lahko VT izključimo. Če je pozitiven, opravimo ultrazvočni pregled (UZ) ven, ki potrdi ali izključi VT.
3. Ob srednji ali veliki klinični verjetnosti za VT je obvezen UZ pregled femoralne in poplitealne vene, ki potrdi VT. Če pregled ne pokaže VT, se opravi določitev D-dimera. Če je negativen, lahko VT izključimo, če je pozitiven, se odločimo za ponovitev UZ preiskave (dvakrat v 2-7 dneh) ali za kakšno drugo preiskavo, odvisno od izkušenj medicinske ustanove (7).

Klinično verjetnost PE ocenujemo na osnovi simptomov (kolaps, dispnea, plevtrična bolečina, hemoptize, otekanje in bolečine v nogah), osnovnih laboratorijskih preiskav, EKG-ja, plinske analize arterijske krvi, D-dimera ter slikovnih preiskav, kjer v vsakdanji klinični praksi postaja prva metoda računalniška tomografska pljučna angiografija (CT angiografija). Ostale možne preiskave so še scintigrafija pljuč, rentgenogram prsnih organov, UZ prsnega koša.

1.2.2 Krvavitve

Bolniki izgubljajo kri med samim operativnim posegom, lahko pa tudi pooperativno zaradi tromboprofilaktične zaščite. Perioperativno krvavitev se lahko zmanjšuje z različnimi kirurškimi in anesteziološkimi tehnikami ter z uporabo krvi in zdravil:

- 1) Področna anestezija napram splošni anesteziji zaradi nižjega arterijskega in venskega krvnega tlaka zmanjša krvavitev med operacijo in potrebo po transfuziji krvi. Prav tako spontano dihanje in s tem negativen tlak v prsnem košu ugodno deluje na zmanjšanje perioperativne krvavitve.
- 2) Vzdrževanje normotermije med operacijo ugodno vpliva na strjevanje krvi. Pri temperaturi pod 35°C se oslabi funkcija trombocitov.
- 3) Nadzorovana hipotenzija lahko prispeva k manjši izgubi krvi, vendar lahko povzroči tudi ishemijo organov. Metoda je varna pri višjih vrednostih hemoglobina.
- 4) Optimalna uporaba kristaloidnih in koloidnih raztopin v pravilnem razmerju je pomembna metoda za nadomeščanje izgub krvi. Razredčitev ne sme biti previsoka prav tako je pomembno, da se uporablja kombinacija obeh raztopin.
- 5) Transfuzija krvi: kljub napredku pri uporabi anestezioloških in kirurških tehnik pa nekateri bolniki kljub vsemu potrebujejo transfuzijo krvi. Homologna (kri od tujega darovalca) transfuzija je zaradi znanih tveganj manj zaželena kot avtologna transfuzija oziroma avtotransfuzija (AT). Čeprav je AT najvarnejši način zdravljenja s krvjo, pa tudi pri AT ni mogoče preprečiti vseh tveganj zdravljenja s krvjo. Ne moremo popolnoma preprečiti administrativnih napak in z njimi povezanih hemolitičnih zapletov, volumske preobremenitve krvnega obtoka in bakterijske kontaminacije, niti zapletov, ki so povzročeni z metaboliti konzervirane krvi.

Metode zbiranja avtologne krvi:

- Predoperativna avtotransfuzija (PAT): predhodna donacija do 4. enot krvi. Za PAT je pod določenimi pogoji primeren vsak bolnik, ki je sposoben za operativni poseg.
- Intraoperativna avtotransfuzija (IOAT), kjer kri iz operativnega polja zbirajo, predelajo in nato vrnejo bolniku s pomočjo naprave (ang. cell saver)
- Akutna normovolemična hemodilucija (ANH) je postopek, pri katerem po indukciji v anestezijo odvzamejo bolniku določen volumen krvi in ga nadomestijo s kristaloidno raztopino v razmerju 1:3. Bolniku kri vrnejo ob koncu posega, ko je vzpostavljena zadostna hemostaza.
- Pooperativna avtotransfuzija (POAT), kjer se do 6 ur po operaciji zbera kri iz sterilne operativne rane v posebne zbiralnike, sledi reinfuzija krvi. Pretakanje krvi poteka skozi poseben filter, ki jo očisti fibrina, zato antikoagulanti niso potrebni.

6) Med zdravili se v praksi uporablja traneksamična kislina. Gre za antifibrinolitično zdravilo, sintetični analog aminokisline lizin. V človeškem telesu deluje tako, da se povratno veže na plazminogen in prepreči pretvorbo plazminogena v plazmin. Tako se učvrstijo fibrinske strukture, nastane čvrst krvni strdek in posledično se zmanjša krvavitev. Ob hudih neobvladljivih krvavitvah lahko posežemo po rekombinantnem fakturu VIIa, ki se običajno uporablja kot izhod v sili, ko drugi ukrepi odpovedo (8, 9).

Bolniki po THA in TKA potrebujejo tromboprofilakso zaradi visokega tveganja za VTE. Antikoagulanti so zelo učinkoviti, vendar lahko povzročajo krvavitve. Interpretacija krvavitev zaradi antikoagulantnega zdravljenja je zelo otežkočena zaradi neenotnega, nestandardiziranega načina poročanja o krvavitvah v kliničnih raziskavah. EMA (ang. European Medicine Agency) je v letu 2013 izdala dopolnjena priporočila o tem, kako v kliničnih raziskavah poročati o izidih tromboprofilaktičnega zdravljenja po operaciji z visokim tveganjem za VTE. Pri spremeljanju krvavitev priporoča delitev na **velike, klinično pomembne ne-velike krvavitve** in **ostale ne-velike krvavitve** (preglednica 2).

V primeru, da želimo izpostaviti resnost **velikih krvavitev**, se lahko uporabi dodatna podskupina življensko ogrožajočih velikih krvavitev, kamor uvrščamo usodne, ne-usodne intrakranialne krvavitve, takšne, ki povzročijo padec hemoglobina za 50 g/l, takšne, ki zahtevajo transfuzijo vsaj 4. enot krvi ob sočasni hipotenziji ter na takšne krvavitve, ki zahtevajo dodaten operativni poseg.

Klinično pomembne ne-velike krvavitve so tiste, ki ne zadostijo definiciji velike krvavitve, vseeno pa zahtevajo določeno medicinsko obravnavo ali spremembo antikoagulantne terapije.

Preglednica 2: Klasifikacija krvavitev

Velike krvavitve	Klinično pomembne ne-velike krvavitve
<ul style="list-style-type: none"> • Usodne krvavitve. • Kritična krvavitev (intrakranialna, intraokularna, intraspinalna, perikardialna, retroperitonealna, v neoperiran sklep, intramuskularna). • Klinično skrita krvavitev, ki povzroči padec hemoglobina za 20g/l glede na stanje pred randomizacijo. • Klinično skrita krvavitev, ki zahteva transfuzijo ≥ 2 enot krvi. • Krvavitev na mestu operacije, ki zahteva reoperacijo, punkcijo ali drenažo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Spontani hematom. • Intramuskularni hematom. • Makroskopska hematurija. • Epistaksia ali krvavitev iz dlesni, ki zahteva tamponado ali drugo intervencijo. • Krvavitev po venskem odvzemuhkrvi >5 min. • Hemoptiza. • Spontana rektalna krvavitev.

Ne-velike krvavitve so tiste, ki ne ustrezajo definicijam velike in klinično pomembne ne-velike krvavitve (npr. epistaksa, ki ne zahteva dodatnega ukrepanja).

Prav tako se priporoča spremljati laboratorijske parametre (npr. hemoglobin, hematokrit, eritrocite med zdravljenjem), medoperativno (npr. kri iz sukcij, teža tamponov..) in postoperativno izgubo krvi (s pomočjo kolektorjev, v katere se preko drenov zbira kri). Spremljanje teh parametrov mora biti čim bolj objektivno. Spremljati je potrebno delež bolnikov, ki so prejeli transfuzijo krvi, pri tem se priporoča podati rezultate ločeno za avtologno in homologno kri (10, 11).

1.3 ZDRAVILA ZA PREPREČEVANJE VENSKE TROMBOEMBOLIJE

Zaradi visokega tveganja za VTE po TKA in THA smernice priporočajo, da se vse bolnike ustrezno zaščiti s protitrombotičnimi zdravili. Najpogosteje se uporablja nizkomolekularne heparine (NMH) ter nove peroralne antikoagulannte- dabigatran, rivaroksaban in apiksaban. Ustrezno zaščito dosežemo tudi z uporabo nefrpcioniranega heparina, fondaparinuksa ali varfarina. Aspirin ni zadostna zaščita, zato se odsvetuje.

Tveganje za VTE je povečano še 3 mesece po operaciji. Dolžina zdravljenja po operaciji kolka traja 28-35 dni. Čas ogroženosti za VTE po operaciji kolena je krajši kot po operaciji kolka, zato nekateri priporočajo 10- do 14-dnevno zdravljenje z NMH. Ker se je tudi pri teh bolnikih podaljšano zdravljenje z NMH izkazalo kot varno in učinkovito, strokovnjaki vse pogosteje svetujejo podobno podaljšanje protitrombotičnega zdravljenja kot pri operacijah kolka (5).

1.3.1 Nizkomolekularni heparini

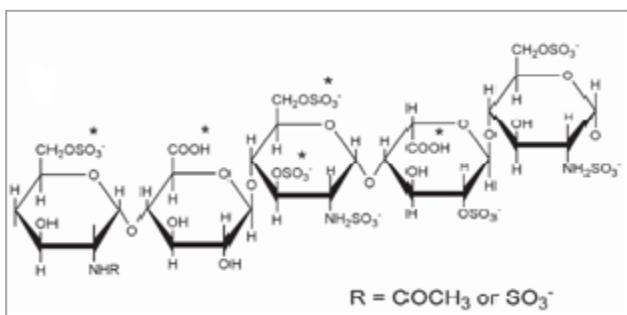
NMH so pri preprečevanju VTE najbolj preizkušena zdravila in zmanjšajo tveganje za VTE za dve tretjini (5). Z metodo depolarizacije jih pridobivajo iz nefrpcioniranega heparina, kar vodi do nastanka krajsih fragmentov z molekulsko maso običajno med 4000 in 6000 g/mol.

Preglednica 3: Pregled NMH glede na molekulsko maso in aktivnost

NMH	Molekulska masa (g/mol)	Razmerje anti-Xa/anti-IIa
dalteparin	6000	2,5
enoksaparin	4500	3,9
nadroparin	4300	3,3
reviparin	4400	4,2

Minimalna molekulska masa za anti-IIa aktivnost naj bi bila okoli 5000 g/mol (preglednica 3) (12).

Mehanizem delovanja: Heparin se veže na antitrombin, ki je primarni endogeni inhibitor koagulacijske kaskade. Za vezavo je ključno pentasaharidno zaporedje heparina (slika 1). Vezava sproži alosterično modifikacijo, kar pospeši interakcijo antitrombina s trombinom za 1000 krat, molekuli se povežeta preko kovalentne vezi. Antitrombin poleg trombina inhibira tudi faktorje IXa, Xa, XIa in XIIa. Heparin preko ionskih povezav direktno inhibira tudi trombin. Zato je potrebna zadostna dolžina molekule heparina, kar pa ne velja za faktor Xa. Iz tega sledi, da heparin inhibira trombin in faktor Xa, NMH pa zgolj faktor Xa. Heparin ima poleg učinka na koagulacijsko kaskado tudi druge učinke: poveča prepustnost kapilar, inhibira proliferacijo gladkih mišičnih celic, zavira osteoblaste in aktivira osteoklaste ter inducira inhibicijo trombocitov. Od tod izhajajo tudi najresnejši neželeni učinki heparinov: krvavitve, HIT (s heparinom sprožena trombocitopenija) in osteoporoz. Pri NMH je tveganje za naštete neželene učinke nekoliko manjše, saj se slabše veže na osteoblaste, posledično povzroči manjšo aktivacijo osteoklastov, manjša je vezava na trombocite in PF4 (trombocitni faktor 4), zato je nižja incidenca HIT (12, 13).



Slika 1: Pentasaharidno zaporedje heparina

Farmakokinetika: Biološka uporabnost NMH je približno 90%, razpolovni čas pa je skoraj 4-krat daljši kot pri nefrpcioniranem heparinu. NMH se najprej razgradijo v jetrih, nato pa se še vedno biološko aktivni izločajo skozi ledvica. Pri bolnikih z ledvično okvaro je zato razpolovni čas NMH pomembno podaljšan.

Odmerjanje in monitoriranje: Odmerjanje NMH je subkutano (sc). Odmerki so podani v mednarodnih enotah, ki odražajo obseg zaviranja faktorja Xa.

Običajni dnevni odmerki pri venski tromboprofilaksi po TKA in THA so:

- Dabigatran: 5000 IE

- Nadroparin:
 - o Telesna masa do 70 kg- prve 3 dni 2850 IE, od 4. dne dalje 3800 IE
 - o Telesna masa nad 70 kg: prve 3 dni 3800 IE, od 4. dne dalje 5700 IE
- Enoksaparin: 4000 IE

Priporočila NICE (National Institute for Health and Care Excellence) priporočajo začeti z NMH 6 do 12 ur po operaciji (14). Obstajajo tudi sheme, kjer s preventivnim odmerkom začnemo že pred operacijo, vendar ti načini povečajo tveganje za pooperativno krvavitev in otežijo izvedbo področne anestezije. NMH kažejo predvidljiv antikoagulantni učinek, zato rutinsko laboratorijsko spremeljanje ni potrebno. Izjemoma nadzorujemo zdravljenje z NMH z merjenjem aktivnosti anti Xa, npr. ob ledvični okvari. Zaradi tveganja za HIT se priporoča 5. dan zdravljenja kontrola trombocitov (5, 13, 15).

Antidot pri uporabi NMH je protamin sulfat, ki nevtralizira ves trombin in do 60% faktorja Xa. Okvirno 1mg protamina nevtralizira 100 IE aktivnega heparina (16).

1.3.2 Varfarin

Varfarin je ob izraženem antikoagulacijskem učinku podobno učinkovit kot NMH. Vendar pa ima ta oblika številne pomankljivosti: zapozneli učinek delovanja, večje tveganje za krvavitev, ozko terapevtsko okno, dolgo razpolovno dobo, številne interakcije z zdravili in hrano ter potrebno redno laboratorijsko spremeljanje. Iz navedenih razlogov se ga za preprečevanje VTE po ortopedski artroplastiki ne uporablja (5, 16, 17).

1.3.3 Fondaparinux

Fondaparinux je indirektni inhibitor fXa. Deluje preko antitrombina. Za razliko od heparinov gre pri fondaparinuxu za sintezno pridobljen pentasaharid velikosti 1728 Da. Pri preprečevanju VTE se je izkazal kot bolj učinkovit kot NMH, vendar pa ima pomembno večje tveganje za krvavitve. Potrebna je previdnost pri bolnikih z ledvično okvaro. Pomankljivi so podatki o izvedbi področne anestezije in kontinuirane analgezije. Iz navedenih razlogov se fondaparinux v klinični praksi za preprečevanje VTE po ortopedskih operacijah ne uporablja (17-19).

1.3.4 Novi direktni peroralni antikoagulanti

Glede na to, da trombin in faktor Xa igrata ključno vlogo v procesu nastanka strdka, so se raziskovalci pri odkrivanju novih učinkovin osredotočili na ti tarči v koagulacijski kaskadi.

Rivaroksaban je selektivni, direktni inhibitor aktiviranega faktorja X (fXa). Veže se na katalitično mesto serinske proteaze fXa neodvisno od antitrombina in inhibira prosto in protrombinazno vezan fXa. Rivaroksaban ne zavira delovanja trombina in ne deluje na trombocite. Ob kirurški zamenjavi kolka ali kolena se rivaroksaban uvede 6-10 ur po operaciji oziroma, ko je vzpostavljena hemostaza in nato dalje 10 mg dnevno do 35 dne po operaciji. Njegova učinkovitost in varnost je bila preizkušena v raziskavah RECORD 1,2,3 in 4. Raziskave so pokazale, da je rivaroksaban v primerjavi z enoksaparinom bolj učinkovit po THA in TKA, obenem ima podoben varnostni profil (20-24).

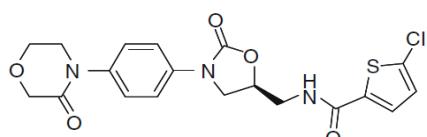
Apiksaban je prav tako selektivni in direktni reverzibilni inhibitor fXa. Deluje neodvisno od antitrombina. Zavira prosti in na strdek vezan fXa in aktivnost protrombinaze. Prav tako nima neposrednega učinka na agregacijo trombocitov. Ob kirurški zamenjavi kolka ali kolena se apiksaban uvede 12 do 24 ur po operaciji po režimu 2,5mg na 12ur. Njegova učinkovitost in varnost je bila preizkušena v raziskavah ADVANCE 1, 2 in 3 (25-28).

Dabigatran je močan, kompetitivni, reverzibilni direktni (neodvisno od antitrombina) zaviralec trombina in glavna učinkovina v plazmi. Zaviranje trombina prepreči pretvorbo fibrinogena v fibrin in s tem razvoj tromba. Zavira tudi prosti trombin, na fibrin vezan trombin in agregacijo trombocitov, ki jo povzroča trombin. Deluje torej antitrombotično in antikoagulacijsko. Ob kirurški zamenjavi kolka ali kolena se dabigatran uvede 2-4 ure po operaciji oziroma, ko je vzpostavljena hemostaza in sicer v polovičnem odmerku 110 mg. Po 24. urah se zdravljenje nadaljuje z odmerkom 220 mg enkrat na dan. Njegova učinkovitost in varnost je bila preizkušena v raziskavah RE-NOVATE, RE-NOVATE II, RE-MODEL in RE-MODILIZE (29-33).

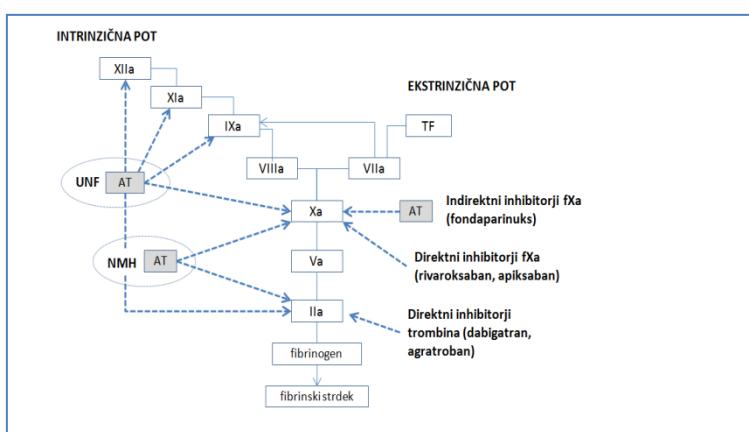
1.4 RIVAROKSABAN

1.4.1 Mehanizem delovanja

Rivaroksaban (5-kloro-N-[(5S)-2-okso-3-{4-(3-oksomorfolin-4-il)fenil}-1,3-oksozolidin-5-il]metil)tiofen-2-karboksamid) je peroralni, direktni, reverzibilni, kompetitivni, hiter in od odmerka odvisen selektiven inhibitor ($K_i=0,4\text{ nM}$, $IC_{50}=21\text{nM}$) fXa (34).



FXa katalizira reakcijo, ki pretvarja faktor II (protrombin) v faktor IIa (trombin). Ker fXa deluje na stičišču kontaktne aktivacije (intrinzična pot) in poti preko tkivnega faktorja (ekstrinzična pot), rivaroksaban kot inhibitor fXa zavira nastanek trombina preko obeh poti koagulacije (slika 3). Rivaroksaban inhibira fXa 100.000-krat bolj selektivno kot ostale biološko pomembne serinske proteaze: trombin, tripsin, plazmin, faktor VIIa, urokinaza, aktiviran protein C.



Slika 3: Mehanizem delovanja protitrombotičnih zdravil (razen varfarina) v koagulacijski kaskadi. UNF=nefrakcioniran heparin, AT=antitrombin, TF=tkivni faktor. Črtkane črte predstavljajo inhibicijo.

FXa katalizira aktivacijo protrombinaznega kompleksa, ki ga sestavljajo fXa, protrombin, fVa, kalcijevi ioni in fosfolipidi na površini aktiviranih trombocitov. V *in vitro* raziskavah so ugotovili, da rivaroksaban inhibira tudi fXa vezan na protrombinazni kompleks, kar bi lahko pomenilo, da inhibira tudi fXa vezan v strdek, kar ne velja za nefrakcioniran heparin, NMH in fondaparinuks (34, 35).

1.4.2 Farmakodinamika

Zaradi načina delovanja so številni specifični in splošno dostopni koagulacijski testi v različni meri občutljivi na rivaroksaban.

Od odmerka odvisen farmakodinamski antikoagulantni učinek rivaroksabana je bil prvič prikazan v randomizirani, s placebo kontrolirani raziskavi na 108. zdravih prostovoljcih starih med 19-45 let. Po enkratnem odmerku (odmerki od 1,25 mg do 80 mg) je rivaroksaban v odvisnosti od odmerka podaljšal protrombinski čas (PČ) in aktiviran parcialni protrombinski čas (aPTČ) (36). V ločeni raziskavi so potrdili tudi od odmerka odvisno inhibicijo faktorja Xa, podaljšanje PČ, aPTČ in Hep-testa po večkratnem odmerjanju pri zdravih prostovoljcih (37).

Inhibicija faktorja Xa

Inhibicija fXa dobro kolerira s plazemsko koncentracijo rivaroksabana. Z odmerkom 5 mg je inhibicija fXa v času maksimalne koncentracije (približno 3 ure po odmerku) 20%, pri odmerku 60-80 mg pa 60-75%. Inhibitorni učinek je prisoten še 8 do 12 ur in se pri odmerkih, ki so višji od 5 mg, tudi po 24 urah ne vrne popolnoma na začetno koncentracijo. To omogoča enkrat dnevno odmerjanje rivaroksabana.

PČ/INR

Učinek rivaroksabana na PČ je bil proučevan 14. raziskavah, le v 6. raziskavah je bil podan koeficient korelacije (R^2) za prikaz odnosa med koncentracijami rivaroksabana in PČ. Gibal se je med 0,47 in 1,00. Učinek PČ je bil skromen in variabilen, pri koncentracijah med 40-61 ng/ml se je PČ podaljšal za 6-19%, pri koncentracijah med 219-305 ng/ml pa med 50-135%. Znana je velika variabilnost glede občutljivosti testa v povezavi izbiro tromboplastinskega reagenta. Uporaba mednarodnega občutljivostnega indeksa ISI (ang. International sensitivity index) specifičnega za rivaroksaban bi lahko zmanjšala variabilnost testa, medtem ko pretvorba PČ v INR, ki se uporablja za monitoriranje antagonistov vitamina K zelo poveča variabilnost in posledično odzivnost na rivaroksaban. Iz navedenega sledi, da normalni PČ ne izključuje prisotnosti klinično značilnih koncentracij rivaroksabana, po drugi strani pa podaljšan PČ zagotovo izkazuje prisotnost rivaroksabana v krvi (38).

aPTČ

Učinek rivaroksabana na aPTČ je bil proučevan v 5 raziskavah. Čeprav je rivaroksaban podaljševal aPTČ v odvisnosti od odmerka, pa je bila ta povezava nelinearna. Tri raziskave so podale koeficient variacije, ki se je gibal med 0,75-1,00. Znana je značilna variabilnost zaradi uporabe različnih reagentov, prav tako je znana značilna variabilnost med različnimi laboratoriji (38).

Farmakodinamski parametri pri posebnih skipinah populacije

Pri starostnikih je bila inhibicija faktorja Xa in podaljšanje PČ večja kot pri mlajših bolnikih po zaužitju 10 mg odmerka. Kljub vsemu so se vrednosti po 24 urah vrnile na začetne vrednosti. Telesna masa, spol in etnična pripadnost niso imeli vpliva na farmakodinamske parametre. Pri blagi (Cl_{CR} 50-80 ml/min), zmerni (Cl_{CR} 30-49 ml/min) in hudi ledvični okvari (Cl_{CR} 15-29 ml/min) se je inhibicija faktorja Xa povečala za 1,5-, 1,9- in 2- kрат v primerjavi z osebami z normalno ledvično funkcijo. Podaljšan je bil tudi PČ. Pri bolnikih z zmerno jetrno okvaro je bila inhibicija faktorja Xa in podaljšanje PČ značilno večja kot pri zdravih osebah (34).

1.4.3 Farmakokinetika

Absorpcija

Rivaroksaban se hitro absorbira in doseže maksimalne plazemske koncentracije (Cmax) v krvi po 2-4. urah po enkratnem odmerku (1,25-80 mg) in po večkratnem odmerjanju (do 30 mg dvakrat dnevno). Po večkratnem odmerjanju ne pride do pomembne akumulacije. Biološka uporabnost 10 mg odmerka znaša 80-100% in je neodvisna od obroka hrane. Nasprotno pa se biološka uporabnost pri odmerku 20 mg zmanjša na 66%, če se zdravilo zaužije na tešče. Vrsta hrane (visoka vsebnost maščob ali visoka vsebnost ogljikovih hidratov) ne vpliva na farmakokinetiko rivaroksabana. Zdrobljena 20 mg tableta zaužita s hrano daje podobno površino pod plazemske krijujo (AUC) in Cmax kot cela tableta. Zdrobljena tableta, dispergirana v vodi in aplicirana preko nazogastrične sonde ob tekočem obroku daje podobne AUC in za 18% nižje Cmax kot nezdrobljena tableta (34).

Porazdeljevanje in vezava na plazemske proteine

Rivaroksaban se je pri podganah heterogeno porazdeljeval po tkivih in organih z zmerno afiniteto do tkiv, ob tem ni bistveno prehajal krvno možganske bariere. Zmerno je

penetriral skozi placento (AUC razmerje fetus/materina kri je 0,2). V materino mleko je prehajalo približno 2% zaužitega odmerka. Pri ljudeh je vezava na plazemske proteine (predvsem albumine) visoka (92-95% *in vitro*) in reverzibilna. Zaradi visoke vezave na plazemske proteine ga ni moč uspešno izločiti iz telesa s pomočjo hemodialize. Volumen porazdelitve (Vd) v stacionarnem stanju znaša približno 50 l (0,62 l/kg), kar kaže njegovo nizko do zmerno afiniteto do perifernega tkiva (34).

Metabolizem in izločanje

Približno ena tretjina (36%) odmerka se izloča nespremenjena skozi ledvica v urin, od tega 30% odmerka z renalno sekrecijo in 6% odmerka z glomerularno filtracijo. Prenašalca, ki sta vpletena v aktivno renalno sekrecijo, sta P-glikoprotein in BCRP (ang. breast cancer resistance protein).

Ostali dve tretjini odmerka se metabolizirata v jetrih. Oksidativna biotransformacija poteka preko CYP3A4 (18%) in CYP2J2 (14%), del pa kot hidroliza amidnih vezi (14%). Nastali metaboliti se izločajo skozi ledvica (30%) in preko žolča v blato (21%). Približno 7% rivaroksabana se izloči preko blata v nespremenjeni obliki, ki se ni absorbiral.

Izločanje rivaroksabana iz plazme poteka z razpolovnim časom 5-9 h pri zdravih mladih osebah in 11-13 h pri starostnikih. Sistemski očistek po intravenski aplikaciji pri zdravi osebi znaša približno 10 l/h (0,14 l/h/kg) z zmerno interindividualno variabilnostjo, ki znaša 30-40% (34, 39).

Farmakokinetika pri specifičnih skupinah populacije

a) Starost

Raziskave 1. faze so pokazale, da imajo zdravi starostniki nad 75 let pri odmerku 10 mg enkrat dnevno za 41% višjo povprečno AUC kot mlajše zdrave osebe v starostni skupini med 18 in 45 let. Sama starost ni klinično pomembno vplivala na Cmax in čas za dosego Cmax. Navedene spremembe so posledica zmanjšanega očistka (renalnega in ne-renalnega) pri starostnikih (34).

b) Spol

Klinične raziskave niso pokazale značilno pomembnih razlik med spoloma v farmakokinetičnih parametrih, kot sta AUC in Cmax (34).

c) Telesna masa

Ekstremne vrednosti telesne mase (≤ 50 kg in > 120 kg) so imele majhen vpliv (<25%) na plazemske koncentracije rivaroksabana v primerjavi z osebami, ki so imele telesno maso med 70-80 kg (34).

d) Etnične skupine

Raziskave niso pokazale pomembnih razlik med etničnimi skupinami. Izstopala je le Japonska populacija, ki je imela za 20-40% višji AUC kot Kavkazijci. Večino vpliva pripisujejo manjši povprečni telesni masi Japoncev (34).

e) Ledvična okvara

Ker se približno ena tretjina rivaroksabana izloča nespremenjenega skozi ledvice je pričakovati, da bo ledvična insuficienca pomembno vplivala na farmakokinetične parametre. Za oceno ledvične funkcije so uporabili izračun očistka kreatinina (Cl_{CR}) s Cockcroft-Gault formulo. Pri blagi (Cl_{CR} 50-80 ml/min), zmerni (Cl_{CR} 30-49 ml/min) in hudi ledvični okvari (Cl_{CR} 15-29 ml/min) se je AUC povečal za 1,4-, 1,5- in 1,6- krat v primerjavi z osebami z normalno ledvično funkcijo. Ledvični očistek se je zmanjšal iz 2,4 L/h pri zdravih osebah na 0,5 L/h pri osebah z hudo ledvično okvaro. Za bolnike, ki imajo $Cl_{CR} < 15$ ml/min podatki ne obstajajo, zato se uporaba ne priporoča (34).

f) Jetrna okvara

Bolniki z blago jetrno okvaro (klasificirani kot Child-Pugh A) so imeli v povprečju za 1,2-krat povečan AUC v primerjavi z zdravimi osebami. Bolniki z zmerno jetrno okvaro (klasificirani kot Child-Pugh B) so imeli povečan AUC za 2,3-krat in Cmax za 1,3-krat v primerjavi z kontrolno skupino. Zmanjšal se je tako ledvični kot jetrni očistek. Zmanjšan ledvični očistek je bil neodvisen od ledvične funkcije. Obstajala je značilna povezava med nevezano frakcijo rivaroksabana v plazmi in serumskim albuminom. Rivaroksaban je kontraindiciran pri bolnikih z jetrno okvaro in sočasno koagulopatijo ali tveganjem za klinično pomembno krvavitev, vključno z bolniki s cirozo, klasificiranimi kot Child-Pugh B ali C (34).

1.4.4 Raziskave populacijske farmakokinetike in farmakodinamike

Objavljenje so populacijske in farmakodinamske raziskave rivaroksabana za področje ortopedske tromboprofilakse, zdravljenja akutne venske tromboze, atrijske fibrilacije in akutnega koronarnega sindroma.

V vseh raziskavah so farmakokinetiko rivaroksabana opisali s peroralnim enoprostornim modelom. Primerjava raziskav, vključno z ocenjeno konstanto absorpcije, navideznim očistkom ter volumnom porazdelitve, interindividualno variabilnostjo (IIV) ter rezidualno napako je povzeta v preglednici 4 (40-43).

Preglednica 4: Pregled študij populacijske PK in PD rivaroksabana(40-43)

Parametri		ACS	AF	GVT	OTP
Število bolnikov		2290	161	870	758
Ka(1/h)	ocenjena vrednost (%SE)	1,24 (3,3)	1,16 (14,1)	1,23 (5,0)	0,047 (24,2)*
Cl/F (L/h)	ocenjena vrednost (%SE)	6,48 (2,2)	6,1 (3,9)	5,67 (3,7)	5,5 (8,7)*
IIV Cl/F	%CV (%SE)	31 (4,72)	35,2 (14,3)	39,9 (7,6)	38,2 (10,0)
Vd/F (L)	ocenjena vrednost (%SE)	57,9	79,7	54,4 (3,8)	58,2 (4,9)
IIV Vd/F	%CV (%SE)	10%	18%	28,8 (11,4)	32,4 (23,0)
Ocenjena vrednost RV	%CV (%SE)	59,0(1,09)	47,9 (6,2)	40,7 (3,2)	52,6 (3,0)

Okrajšave: ACS: akutni koronarni sindrom; AF: atrijska fibrilacija; GVT: globoka venska tromboza; OTP: ortopedска tromboprofilaksa; IIV: interindividualna variabilnost; RV: rezidualna variabilnost; %CV: koeficient variacije; %SE: relativna standardna napaka; Ka: konstanta absorpcije , Cl/F: navidezni očistek; Vd/F: navidezni volumen porazdelitve * podatek velja za 2. dan po operaciji.

Pri testiranju sočasnih spremenljiv na očistek in volumen porazdelitve so v vseh študijah dokazali značilen vpliv starosti in serumskega kreatinina na očistek rivaroksabana ter vpliv starosti in puste telesne mase na volumen porazdelitve rivaroksabana. V raziskavi ortopedske tromboprofilakse so dokazali tudi značilen vpliv dneva operacije, serumskega albumina in hematokrita na očistek rivaroksabana (40-43).

V raziskavi bolnikov po ortopedski artroplastiki kolka je izstopala variabilna farnakokinetika prva dva pooperativna dneva, predsem pri konstanti absorpcije, ki je drugi dan znašala $0,047 \text{ h}^{-1}$, na dan 3 ali 4 je znašala $0,222 \text{ h}^{-1}$ in po 4. dnevu $1,49 \text{ h}^{-1}$. V nekoliko manjši meri je naraščala povprečna ocena očistka rivaroksabana, ki je na dan 2 znašala 5,46 l/h, na dan 3 in 4 6,91 l/h in po 4. dnevu 7,51 l/h (40).

V vseh raziskavah so ugotavljali linearno korelacijo med koncentracijo rivaroksabana in podaljšanjem PČ (40-43). V študiji z ortopedsko tromboprofilakso so ugotavljali, da je pri bolnikih začetni PČ podaljšan še 2 do 3 dni po operaciji (to so opazili tudi pri enoksaparinu, ki sicer ne vpliva na PČ), zato so to upoštevali v samem farmakodinamskem modelu. Zanimava razlika je bila še pri naklonu linearne krivulje med enkrat dnevnim (0,8 s/100 µg/l) in dvakrat dnevnim odmerjanjem (3,2 s/100 µg/l) (40).

1.4.5 Raziskave rivaroksabana pri ortopedski tromboprofilaksi

Številne raziskave so proučevale koristi in tveganja rivaroksabana pri bolnikih po artroplastiki kolka ali kolena. Vse raziskave so kot primerjalno zdravilo uporabljale NMH

enoksaparin po različnih shemah. Prva razlika je bila, da so nekateri bolniki dobili prvi odmerek enoksaparina že pred operacijo, drugi pa šele po operaciji. Naslednja razlika je bila enkrat ali dvakrat dnevno odmerjanje enoksaparina. Raziskave so se razlikovale tudi v dolžini zdravljenja, ter zadnja razlika v času spremeljanja bolnikov po vključitvi v raziskavo.

Povzetek vseh raziskav, kjer so rivaroksaban uporabili v odmerku 10 mg enkrat dnevno je prikazan v preglednici 5. Vključeni so tudi parametri, s katerimi so vrednotili učinkovitost in varnost zdravljenja (21-24, 44).

Meta-analiza, ki je v analizo vključila vseh osem raziskav v preglednici 4 in dodatno še raziskavi, kjer je primerjala rivaroksaban, odmerjen dvakrat dnevno v različnih odmerkih (od 2x2,5 mg do 2x30 mg) z enoksaparinom je pokazala, da je rivaroksaban v primerjavi z enoksaparinom statistično značilno zmanjšal številno simptomatskih VTE (**RR 0,44** (95% IZ:0,29-0,67); **p=0,0001**) in število simptomatskih GVT (**RR 0,36** (95% IZ:0,21-0,61); **p=0,0001**). Zmanjšal je število simptomatskih pljučnih embolij, vendar ne statistično značilno (**RR 0,79** (95% IZ:0,35-1,79); **p=0,57**). Pri rivaroksabalu je bilo statistično pomembno več velikih krvavitev kot pri enoksaparunu (**RR 1,37** (95% IZ:1,05-1,78); **p=0,02**) (45).

Nobena od velikih kliničnih raziskav ni proučevala prehoda iz NMH na rivaroksaban med zdravljenjem. Shema prehoda je zanimiva, saj po-operativna slabost in bruhanje tik po operaciji velikokrat otežuje jemanje peroralnih zdravil, po drugi strani pa zakasnitev tromboprofilakse predstavlja povečano tveganje za VTE. Ta pristop zato omogoča, da je z subkutano aplikacijo antikoagulanta takoj po operaciji bolnik ustrezno zaščiten, hkrati pa dovoljuje bolniku enostavnejše jemanje peroralnega antikoagulanta v kasnejših dneh po operaciji, nato pa doma, vključno do 35 dne po operaciji.

Objavljena je ena odprta, multicentrična raziskava, ki je vključila 52 bolnikov in vrednotila vpliv prehoda iz enoksaparina na rivaroksaban preko spremembe anti-Xa aktivnosti, spremembe AUC rivaroksabana ter povprečnega PČ na dan 1 in 3 po spremembi terapije. Od dneva 1 do 3 se je blago, vendar značilno povišal anti-Xa in AUC rivaroksabana. Povprečen PČ je bil blago podaljšan na dan 1 v primerjavi z dnevom 3, kar kaže na minimalen, vendar zaznan rezidualni učinek enoksaparina na dan prehoda. V raziskavi ni bilo primera VTE, krvavitev ali nepričakovanih neželenih učinkov (46).

Preglednica 5: Pregled raziskav ortopedske tromboprofilakse, kjer so primerjali rivaroksaban v odmerku 10 mg dnevno z nizkomolekularimi heparini. R=rivaroksaban, E=enoksaparin; VTE=venska tromboembolija; GVT=globoka venska tromboza; START=začetek tromboprofilaktičnega zdravljenja; vs=v primerjavi z; SD=standardna deviacija (21-24, 44, 47)

Avtor//leto raziskave/ naziv raziskave	Operiran sklep	Št. bolnikov(E/R) (po protokolu)	INTERVENCIJA		Izidi- varnost in učinkovitost (Rivaroksaban vs Enoksaparin)
Erriksson, Borris 2006 ODIXa-HIP	kolk	107/113 (511)	enoksaparin 40 mg/dan START: večer pred OP, nato 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:5-9 dni	rivaroksaban 5 mg/dan; 10 mg/dan; 20 mg/dan, 30 mg/dan; 40 mg/dan START: 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:5-9 dni	R 10 mg/dan vs E 40 mg SPREMLJANJE: 35-69 dni Velike krvavitve: 0,7% vs 1,9% Delež bolnikov, ki je prejelo transfuzijo: 59,9% vs 59,2% Izguba krvi preko drenov (ml±SD): 491±442 vs 454±441 VTE: 2,7% vs 2,8% GVT: 10,6% vs 25,2% proksimalna GVT: 2,7% vs 2,8%
Erriksson, Borris 2008 RECORD 1	kolk	1678/1686	40 mg/dan START: 12 h pred OP, nato 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:35 dni	10 mg/dan START: 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:35 dni	SPREMLJANJE: 66-71 dni Velike krvavitve: 0,3% vs 0,1% Delež bolnikov, ki je prejelo transfuzijo: 54,8% vs 56,2% Izguba preko drenov (ml (razpon)): 540 (6-5180) vs 530 (2-3490) VTE: 0,2% vs 2,0% GVT: 0,8% vs 3,4% proksimalna GVT: 0,1% vs 2%
Kakkar, Brenner 2009 RECORD 2	kolk	803/812	40mg/dan START: 12 pred OP, nato 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:31-39 dni+ sočasno placebo inj s.c. start 12h pred OP, nato 6-8 ur po zaprtju rane, obdobje 10-14 dni.	10 mg/dan START: 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:35 dni+ sočasno placebo inj s.c. start 12h pred OP, nato 6-8 ur po zaprtju rane, obdobje 10-14 dni.	SPREMLJANJE: 62-75 dni Velike krvavitve: <0,1% vs <0,1% Delež bolnikov, ki je prejelo transfuzijo: 39,5% vs 41,8% Izguba preko drenov (ml (razpon)): 470 (2-2700) vs 441 (20-2680) VTE: 0,6% vs 5,1% DVT: 1,6% vs 8,2% proksimalna DVT: 0,6% vs 5,1%
Lassen 2008 RECORD 3	koleno	838/793	40 mg/dan START: 12 h pred OP, nato 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:10-14 dni	10 mg/dan START: 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:10-14 dni	SPREMLJANJE: 41-50 dni Velike krvavitve: 0,6% vs 0,5% Delež bolnikov, ki je prejelo transfuzijo: 50,7% vs 46,4% Izguba preko drenov (ml (razpon)): 600 (13-3429) vs 600 (10-3072) VTE: 1% vs 2,6% GVT: 9,6% vs 18,2% proksimalna GVT: 1,1% vs 2,3%
Turpie 2009 RECORD 4	koleno	878/864	30 mg/2 x dan START: 12-24 h po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:10-14 dni	10 mg/dan START: 6-8 ur po zaprtju rane ČAS TERAPIJE:10-14 dni	SPREMLJANJE: 40-49 dni Velike krvavitve: 0,7% vs 0,3% Delež bolnikov, ki je prejelo transfuzijo: 41,2% vs 39,6% Izguba preko drenov (ml±SD): 604±404 vs 625±403 VTE: 1,1% vs 1,5% (do 17 dne) GVT: 6,3% vs 9,0% proksimalna GVT: 0,3% vs 1,4%
Zou 2014	koleno	112/102	40 mg/dan START: 12 h po OP, ČAS TERAPIJE:14 dni	10 mg/dan START: 12 h po OP, ČAS TERAPIJE:14 dni	SPREMLJANJE: 28 dni GVT: 2,94% vs 12,5% dodatavna skupina: ASPIRIN 100 mg/dan, START: 12 h po OP, ČAS TERAPIJE: 14 dni,

1.5 TRANSMEMBRANSKI PRENAŠALEC ABCB1

1.5.1 Struktura proteina

Protein ABCB1, poimenovan tudi P-glikoprotein ali MDR1 (ang. Multi-drug Resistance gen 1) je bil prvič omenjen leta 1983 v povezavi z rezistenco na protitumorno zdravljenje. Spada v veliko družino prenašalnih transmembranskih proteinov ABC (ang. ATP binding cassette). Pri človeku poznamo 48 genov za prenašalce ABC, ki jih delimo v 7 podskupin (od A do G) glede na njihovo podobnost v nukleotidnem zaporedju.

Gre torej za ATP prenašalec vezalne kasete B1, ki ga najpogosteje povezujemo s pojavom multiple odpornosti na zdravila.

Protein ABCB1 je glikoziliran in fosforiliran protein z molekulsko maso 170 kDa in skupno 1280 aminokislin. Sestavljen je iz dveh homolognih polovic. Vsaka vsebuje šest hidrofobnih transmembranskih domen in znotrajcelično vezavno domeno za ATP.

Vezavne domene za ATP imajo naslednje motive: A-zanka, Walker A, Q-zanka, podpis (S), Walker B, D-zanka in H-zanka. Približno polovico molekule se nahaja v membrani in sicer na njeni apikalni strani. Hipotetični model predstavlja slika 4 (48-51).

1.5.2 Mehanizem delovanja proteina

Po trenutno sprejetem modelu delovanja je ABCB1 nekakšna »hidrofobna vakuumská črpalka«, ki prepozna substrat in ga izvrže v ekstracelularni prostor s pomočjo hidrolize ATP do ADP.

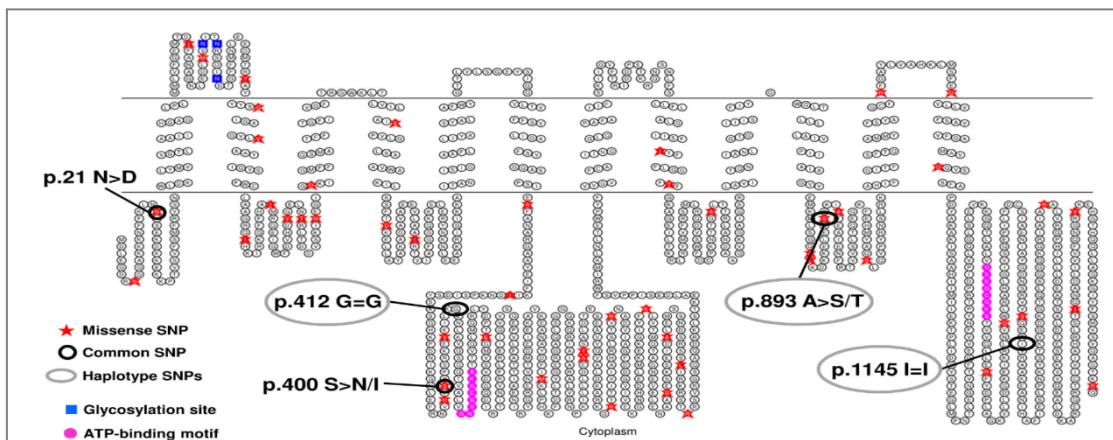
Učinkovine lahko delujejo kot inhibitorji (ovirajo s *ABCB1* posredovano prehajanje), induktorji (povečajo aktivnost ABCB1) ali pa so preprosto substrati (prehajajo membrano preko ABCB1).

ABCB1 substrati so kemijsko zelo raznoliki in pripadajo različnim terapevtskim skupinam. Običajno so blago amfifilni in relativno hidrofobni, pogosto imajo aromatske obroče in pozitivno nabit dušikov atom. Edina skupna lastnost je torej relativna hidrofobnost in amfifilni značaj. Mehanizem prepoznavne in vezave substrata je kompleksen proces. Znano je, da ABCB1 vsebuje velik vezavni žep za substrate. Ta vsebuje transmembranske domene (TM5, TM6, TM11, TM12), ki zaznamujejo specifičnost substrata za ABCB1.

Med antikoagulantnimi in antiagregacijskimi zdravili so substrati za ABCB1 apiksaban, dabigatran, rivaroksaban, varfarin, klopidogrel in tikagrelol. Inhibitorji za ABCB1 so

varfarin, dipiridamol in tikagrelol. Preliminarne raziskave pa kažejo, da je induktor za ABCB1 acetilsalicilna kislina (48, 50-52).

S pomočjo Caco-2 celičnih kultur in LLC-PK1 celic, ki prekomerno izražajo ABCB1 so dokazali, da je rivaroksaban izražal visoko stopnjo permeabilnosti za transport preko Caco-2 celičnih kultur. Prav tako so dokazali, da rivaroksaban ni inhibitor za ABCB1. Ketokonazol in ritonavir (znana močna inhibitorja ABCB1) sta značilno zmanjšala transport rivaroksabana, medtem, ko klaritromicin in eritromicin nista pomembno vplivala na transport rivaroksabana (53).



Slika 4: Hipotetični model humanega ABCB1 (54)

Krogci predstavljajo aminokislinske ostanke. Krogci roza barve označujejo ATP vezavi domeni, krogci modre barve pa glikozilacijska mesta. Rdeče zvezdice označujejo mutacije s spremenjenim pomenom, ki so bile znane do januarja 2015. Z črnimi krogci so označene najpogosteje pojavljajoče se SNP-je, z svimi krogci pa najbolj raziskan haplotip.

1.5.3 Fiziološka vloga proteina

Izražanje proteina ABCB1 je tkivno specifično, najdemo ga v normalnih in tumorskih celicah, najbolj izražen je v sekretornih organih. Najdemo ga v nadledvični žlezi, v ledvicah (na apikalni strani epitelija proksimalnih tubulov), v jetrih (na kanalikularni membrani hepatocitov), v tankem in debelem črevesju (na apikalni/luminalni strani enterocitov), v pankreasu, v kapilarnih endotelijskih celicah testisov, v pljučih ter v krvno možganski barieri ter barieri med krvjo in cerebrospinalno tekočino (na luminalni strani epitelnih celic). Najdemo ga tudi v placenti ter v endometriju nosečnic. Protein ABCB1 je izražen tudi v cirkulirajočih celicah, med drugim v limfocitih.

Izražanje ABCB1 na apikalni strani enterocitov preprečuje absorpcijo učinkovin v enterocite in posledično v krvni obtok. Izražanja ABCB1 na kanalikularni membrani hepatocitov ter na apikalni strani ledvičnih tubularnih celic poveča eliminacijo učinkovin v

žolč in urin. Iz navedenega lahko sklepamo, da je njegova fiziološka vloga zaščita organizma pred snovmi, ki so za človeško telo tuje.

Na krvno možganski barieri prenašalci ABCB1 preprečujejo delovanje zdravil na centralno živčni sistem. Odgovoren je tudi za povečano odpornost tumorskih celic (49, 50, 52).

1.5.4 Polimorfizmi gena *ABCB1*

Gen za ABCB1 se nahaja na kromosomu 7, na progi p21-21.1. Obsega približno 209,6 kb. Ima 29 eksonov, ki merijo med 49 bp in 587 bp. Pripadajoča mRNA obsega 4872 bp, vključno z 5'- nekodirajočo regijo (49). V podatkovni bazi NBCIdbSNP je trenutno znanih 10.723 polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP), od tega se jih večina nahaja v področju intronov. Objavljenih je 581 kodirajočih mutacij s spremenjenim pomenom ter 276 kodirajočih tihih mutacij. Podatek kaže na velik interes za raziskovanje tega gena.

Večina polimorfizmov se nahaja v znotrajcelični regiji. Nobene mutacije s spremenjenim pomenom ne najdemo v ATP vezavnih domenah. Alelne frekvence polimorfizmov se med etničnimi skupinami zelo razlikujejo, kar prikazuje preglednica 6 (54).

Preglednica 6: Alelne frekvence najpogostejših kodirajočih polimorfizmov pri Kavkazijcih in primerjava z ostalimi etičnimi skupinami (54).

SNP	rs številka	Učinek	Mutacija	Populacija (%)				
				Kavkazijci	Afroameričani	Azijci	Mehičani	Pacifik
61 A>G	rs9282564	Asn21Asp	spremenjen pomen spremenjen	8,00%	2,50%	1,70%	0,00%	0,00%
1199 G>A/T	rs2229109	Ser400Asn	pomen	2,50%	1,00%	0,00%	0,00%	0,00%
1236 C>T	rs1128503	Gly412Gly	tiha	45,90%	20,90%	68,50%	45,00%	57,10%
2677 T>G	rs2032582	Ala893Ser/Thr	spremenjen pomen	46,4%/3,6%	10%/0,5%	45%/6,7%	40%/0%	35%/35,7%
3435 C>T	rs1045642	Ile1145Ile	tiha	56,10%	20,20%	40,00%	50,00%	50,00%

Polimorfizem rs1045642 (3435 C>T)

Gre za prvi omenjen polimorfizem gena *ABCB1*, raziskava pa je proučevala vpliv na plazemske koncentracije digoksina. Polimorfizem se nahaja na eksonu 26. Mutacija, ki spremeni citozin v timin je tiha mutacija, ki se prepiše v aminokislino izoleucin (ATC→ATT). Kljub temu, da gre za tiho mutacijo, ki ne spremeni aminokisline obstajajo teorije, ki predpostavljajo, da bi lahko polimorfizem povzročil zmanjšano stabilnost mRNA, ali pa vplival na časovno komponento zvijanja in vstavljanja proteina v membrano, kar bi lahko vplivalo na specifičnost za substrate. SNP se nahaja na znotrajcelični strani proteina, med Q-zanko in podpisom (S). Povezano tega SNP-ja z 2-krat zmanjšano izražanje gena v duodenumu je prvič opisal Hoffmeyer in sodelavci leta

2000. Pomembna lastnost tega polimorfizma je, da se alelne frekvence med etničnimi skupinami zelo razlikujejo. V splošnem je alel C bolj pogost kot alel T, zato je označen kot divji alel.

Veliko raziskav je preučevalo vpliv SNP 3435 C>T na potek bolezni ali farmakokinetiko učinkovin. Tako so v meta-analizah polimorfizem povezali s povečanim tveganjem za ponovitev ishemičnega dogodka ob zdravljenju s klopidogrelom, povečanim tveganjem za raka dojke pri azijski populaciji pri nosilcih genotipa TT v primerjavi z nosilci genotipa CT in CC, povečanim tveganjem za rezistenco na antiepileptike pri Kavkazijcih, povečanim tveganjem za hematološko obliko raka, za rak dojke in ledvic. Bolniki s kronično mieloično levkemijo in genotipom TT so imeli slabši odziv na zdravljenje z imatinibom. Meta-analiza na azijski populaciji je pokazala, da bolniki po transplantaciji ledvic z genotipom CC potrebujejo značilno višje odmerke ciklosporina v primerjavi z bolniki z genotipom TT. Podobno povezavo so dokazali tudi pri bolnikih, ki so prejemali takrolimus po transplantaciji jeter ali ledvic (49, 51).

Številne raziskave, ki so proučevale vpliv polimorfizmov gena *ABCB1* so prišle do zaključka, da bi lahko z uporabo **haplotipov** (kombinacija alelov na istem kromosomu, ki se deduje vezano) lažje dokazali fenotipske povezave. Pri človeku najbolj pogost haplotip ABCB1, sestavljen iz treh polimorfizmov, ki med drugim vsebuje tudi polimorfizem 3435 C>T je: **1236T – 2677 T/A – 3435T**. Haplotip je v močnem vezavnem neravnovesju. Haplotip TTT je najmanj pogost pri afriški populaciji (okoli 6 %), pri azijski populaciji se frekvenca giblje okoli 35%, najbolj pogost pa je pri Kavkazijcih, okoli 40%. Vpliv haplotipa na izide zdravljenja so proučevale številne raziskave. Le ena meta-analiza na Kavkazijskih bolnikih z akutno mieloično levkemijo, zdravljenimi s citarabinom in antraciklini, je pokazala statistično pomembno večje preživetje bolnikov s haplotipom TTT (49, 51, 54).

Polimorfizem rs4148738

Polimorfizem se nahaja v intronski regiji gena *ABCB1*. V raziskavi RE-LY, ki je preverjala učinkovitost in varnost dabigatrana v primerjavi z varfarinom pri bolnikih s kronično nevalvularno atrijsko fibrilacijo, so z asociacijsko analizo celotnega genoma na 2944. bolnikih identificirali več SNP-jev, ki so bili povezani z vplivom na plazemske koncentracije dabigatrana. Bolniki, ki so bili nosilci alela G za SNP rs4148738, so imeli

12% višje prilagojene maksimalne plazemske koncentracije dabigatrana kot bolniki z aleлом A (1,12; 95% IZ:1,08-1,17; $p=8,2 \times 10^{-8}$). Prisotnost tega SNP-ja ni značilno vplivala na povečano število krvavitev ali ishemičnih dogodkov. Z modelom mešanih učinkov so ugotavljali tudi vpliv polimorfizma na farmakokinetične parametre. Tako so ugotovili, da statistično značilno poveča biološko uporabnost dabigatrana za 10,2% ($p=5,8 \times 10^{-8}$), ter zmanjša njegov očistek za 4,4% ($p=3,1 \times 10^{-5}$). Frekvenca alela G pri bolnikih v raziskavi je bila 0,45 (55).

2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Glavni hipotezi klinične raziskave bosta:

HIPOTEZA 1: Tromboprofilaksa z vsemi tremi režimi zdravljenja je enako učinkovita in varna.

Bolnike smo naključno razdelili v tri skupine. Prva skupina je ves čas prejemala dalteparin, druga skupina je med hospitalizacijo prejemala dalteparin, nato pa rivaroksaban. Tretja skupina je ves čas prejemala rivaroksaban.

Učinkovitost tromboprofilakse smo spremljali skupno 3 mesece po operaciji in sicer v treh časovnih obdobjih: med hospitalizacijo; od odpusta iz bolnišnice do 35. dneva po operaciji, ko je bolnik prekinil z jemanjem tromboprofilaktičnega zdravila; od 35. dneva po operaciji pa do 3 mesecev po operaciji.

Pri učinkovitosti zdravljenja smo spremljali pojavnost kliničnega suma za pljučno embolijo ali vensko trombozo ter z diagnostičnimi metodami potrjeno pljučno embolijo ali vensko trombozo.

Varnost tromboprofilakse smo med hospitalizacijo in do 35. dne po operaciji spremljali preko naslednjih kriterijev:

- v prvih 24 urah po operaciji smo spremljali izgubo krvi, količino reinfudirane krvi, padec hemoglobina in število prejetih enot krvi,
- v 24-48 urah po operaciji smo spremljali število prejetih enot krvi,
- po 48 urah od operacije do odpusta iz bolnišnice smo spremljali število prejetih enot krvi,
- skozi celotno hospitalizacijo ter po odpustu iz bolnišnice do 35. dneva po operaciji smo spremljali pojav sekrecije iz rane, pojav hematoma, pojav majhne krvavitve, klinično pomembne ne-velike krvavitve ter pojav velike krvavitve. Podatke po odpustu iz bolnišnice smo pridobili tako, da smo vstopili v stik z bolnikom (pisno ali telefonsko preko vprašalnika). Ves čas tromboprofilaktičnega zdravljenja smo spremljali pojav še ostalih možnih neželenih učinkov dalteparina ali rivaroksabana.

HIPOTEZA 2: Genetski dejavniki vplivajo na farmakokinetični profil rivaroksabana, hkrati pa so ti dejavniki povezani z učinkovitostjo in varnostjo rivaroksabana.

Pri vseh pacientih smo izvedli gensko tipizacijo dveh polimorfizmov SNP v genu *ABCB1*: **rs1045642** v eksonu 26 (3435 C>T) ter **rs4148738** na poziciji 87000985 v nekodirajoči regiji (intron), ter izračunali haplotipe z namenom, da ugotovimo prevalenco teh polimorfizmov v genu *MDR1/ABCB1*.

Znotraj skupine, ki je med hospitalizacijo prejemala rivaroksaban, smo naključno izbranim 25. pacientom določili farmakokinetični profil (5 meritev plazemskih koncentracij rivaroksabana v plazmi) in izražanje *P-GP (ABCB1)* pred in po uvedbi tromboprofilaktične terapije. Tako smo poskusili potrditi ali ovreči hipotezo o genetskem vplivu na farmakokinetiko rivaroksabana. Naš namen je torej poiskati povezavo med plazemskimi koncentracijami rivaroksabana, haplotipi in izražanjem *P-GP* v limfocitih.

Prav tako smo poskusili pokazati, ali so posamezni polimorfizmi povezani s pojmom večjega tveganja za krvavitve, s pojmom venske tromboze in pljučne embolije.

3. MATERIALI IN METODE

Klinični del prospektivne randomizirane raziskave smo izvedli na Kliniki za kirurgijo, Oddelek za ortopedijo v UKC Maribor.

3.1. BOLNIKI

V raziskavo so načrtovali vključitev 300 bolnikov, ki so bili sprejeti zaradi predvidene operacije popolne artroplastike kolena ali kolka. Sodelovanje bolnikov v raziskavi je bilo prostovoljno, kar so bolniki potrdili s podpisom izjave o zavestni in svobodni privolitvi v raziskavo. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka: 168/07/11).

Za izvedbo randomizacije smo uporabili na internetu dosegljiv program Research Randomizer (56). Uporabili smo enostavno randomizacijo, kjer je program naključno razporedil 300 števil od 1 do 3. Številka 1 predstavlja skupino 1, številka 2 skupino 2 in številka 3 skupino 3.

V skupini 3 smo izvedli dodatno randomizacijo, kjer je program naključno razporedil 100 števil od 1 do 4. Vse, ki smo jim dodelili številko 1, smo uvrstili v skupino 31 (25 pacientov). Tem pacientom smo določali farmakokinetični profil rivaroksabana. Ostali pacienti so se uvrstili v skupino 32, 33 in 34.

Bolniki skupine 1 so kot tromboprofilaktično terapijo prejeli med hospitalizacijo NMH dalteparin v odmerku 5000 IE/24 h, prvi odmerek so prejeli 6 h po operativnem posegu. Kot podaljšano profilakso po hospitalizaciji so nadaljevali z istim NMH v enakem odmerku do 35. dneva po operaciji.

Bolniki skupine 2 so kot tromboprofilaktično terapijo prejeli med hospitalizacijo NMH dalteparin v odmerku 5000 IE/24 h, prvi odmerek so prejeli 6 h po operativnem posegu. Kot podaljšano profilakso po hospitalizaciji so prejeli peroralni antikoagulantrivaroksaban v odmerku 10 mg/24 h, na tešče, do 35. dneva po operaciji. Preklop iz dalteparina na rivaroksaban je potekal tako, da so pacienti namesto dalteparina ob predvideni uri vzeli rivaroksaban.

Bolniki skupine 3 so kot tromboprofilaktično terapijo prejeli med hospitalizacijo peroralni antikoagulant rivaroksaban v odmerku 10 mg/24 h, na tešče, prvi odmerek so prejeli 6 h po operativnem posegu. Za podaljšano profilakso po hospitalizaciji so prejeli isti peroralni antikoagulant rivaroksaban v enakem odmerku na tešče do 35. dneva po operaciji.

Zdravljenje z ostalimi zdravili se med skupinami ni razlikovalo.

3.2. ZBIRANJE PODATKOV

Podatke, ki so pomembni za vključitev bolnika v raziskavo smo pridobili iz medicinske dokumentacije. Podatke o bolniku, diagnozi in predpisanih zdravilih smo pridobili iz bolnikove medicinske dokumentacije.

Učinkovitost in varnost tromboprofilakse smo spremljali skupno 3 mesece po operaciji in sicer v treh časovnih obdobjih: med hospitalizacijo; od odpusta iz bolnišnice do 35. dneva po operaciji, ko bolnik prekine z jemanjem tromboprofilaktičnega zdravila; od 36. dneva po operaciji pa do 3 mesecev po operaciji.

Učinkovitost tromboprofilakse smo vrednotili kot sum na GVT ali PE ter kot dokazano GVT in PE v vseh treh obdobjih ločeno. Sum na dogodek je bil postavljen, če so se pojavili klinični znaki GVT in/ali PE, ob tem pa so bile izpeljane potrebne diagnostične in laboratorijske preiskave za potrditev ali izključitev suma na GVT in/ali PE. Diagnostična preiskava ob sumu na GVT je bil ultrazvok ven spodnjih okončin, ob sumu na PE pa CTA pljuč. Praviloma je bil določen tudi D-dimer.

Varnost tromboprofilaktičnega zdravljenja smo spremljali z merjenjem izgub krvi preko drenov, s prisotnostjo sekrecije iz ran, s prisotnostjo hematomov, potrebo po aplikaciji transfuzije ter laboratorijsko preko hemoglobina. Spremljali smo tudi vse ostale vrste krvavitev- velike in ne-velike, klinično pomembne in klinično manj pomembne krvavitve.

3.3. ODVZEMI KRVI

Pacientom smo na dan pred operacijo v sklopu redne kontrole koagulacije dodatno odvzeli 12 ml krvi v epruveto z EDTA antikoagulantom, iz katere smo izolirali DNA in RNA. Na izoliranih vzorcih DNA smo izvedli analizo izbranih polimorfizmov v genu *MDR1/ABCB1* (vsi pacienti), na RNA pa določili izražanje *P-GP* (skupina 31).

Na dan operacije smo 25. pacientom iz skupine 31 odvzeli kri v epruveto s citratnim antikoagulantom. Pacientom smo odvzeli vzorec krvi za določitev PČ in aPTČ ter

plazemske koncentracije rivaroksabana 3 ure po prvem odmerku (c_{\max}), 12 h po odmerku in tik pred naslednjim odmerkom (c_{\min}).

3. dan, ko je bilo vzpostavljeno stacionarno stanje rivaroksabana v plazmi, smo istim pacientom iz skupine 31 odvzeli kri v epruveti s citratnim antikoagulantom. Pacientom smo odvzeli vzorec krvi za določitev PČ, aPTČ in plazemske koncentracije rivaroksabana 3 ure po tretjem odmerku rivaroksabana ($c_P^{SS \max}$).

5. dan smo ponovno istim pacientom iz skupine 31 odvzeli kri v epruveto s citratnim antikoagulantom. Pacientom smo odvzeli vzorec krvi za določitev PČ, aPTČ in plazemske koncentracije rivaroksabana 3 ure po petem odmerku rivaroksabana ($c_P^{SS \max}$).

Istim pacientom iz skupine 31 smo odvzeli tudi kri (12 ml) v epruvete z EDTA antikoagulantom za določitev izražanja *P-GP*.

3.4. DOLOČANJE PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ RIVAROKSABANA

Uporabili smo TECHOCHROM® anti-Xa kromogeni test za določanje koncentracije rivaroksabana v humani citratni plazmi na BCS analizatorju (Siemens). Test temelji na inhibiciji aktiviranega faktorja Xa z direktnim inhibitorjem faktorja Xa, merjeno z kromogenim substratom. Količino preostalega faktorja Xa določimo glede na obarvanje po encimskem cepljenju kromogenega substrata spektrofotometrično pri 405 nm. Intenziteta barve je obratno sorazmerna s količino rivaroksabana prisotnega v vzorcu.

Test je umerjen na rivaroksaban s pomočjo kalibracijske krivulje v petih točkah. Za kalibracijo bomo uporabili TECHNOVIEW® Rivaroxaban Calibrator set, ki omogoča linearno povezavo na razponu koncentracij rivaroksabana med 0 do 150 ng/ml. Predvidena koncentracija rivaroksabana 3 ure po zadnjem 10 mg odmerku rivaroksabana naj bi znašala približno 150 ng/ml.

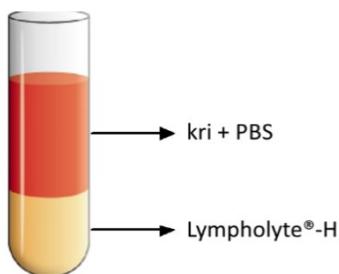
Po kalibraciji in pred testiranjem so se vedno izvedle notranje kontrole s kontrolnimi plazmami Control LOW (\approx 60 ng/ml) in Control MEDIUM (\approx 150 ng/ml). Test smo izvajali na Centru za transfuzijsko medicino UKC Maribor.

3.5. IZOLACIJA DNA IN RNA IZ KRVI

Za izolacijo RNA in DNA iz periferne venske krvi smo najprej z reagentom Lympholyte®-H (Cedarlane) izolirali limfocite ter nadalje iz limfocitov, z uporabo TRI-reagenta (Sigma-Aldrich) po navodilih proizvajalca izolirali RNA in DNA.

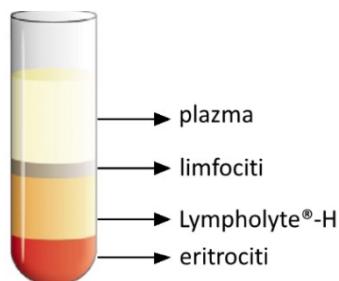
Protokol za izolacijo limfocitov iz periferne venske krvi

Kri smo odvzeli v epruveto z EDTA, jo prenesli v centrifugirko. Dodali smo enako količino pufra PBS, kot je bilo krvi ter premešali. V novo sterilno centrifugirko smo nalili toliko reagenta Lympholyte®-H, kot je bilo krvi. Na Lympholyte®-H smo previdno nanesli celotno suspenzijo krvi in PBS-a, pri čemer kri nalivamo ob steni zelo počasi in pazimo, da se ne pomeša z reagentom Lympholyte®-H, kot je prikazano na sliki 5.



Slika 5: Nanašanje mešanice krvi in pufra PBS na reagent Lympholyte®-H

Centrifugiramo pri $800 \times g$ 20 min pri temperaturi 18°C . Potrebna je zavora centrifuge, ki mora biti nastavljena na minimalno vrednost. Po centrifugiranju se kri loči v 4 plasti: plazmo, limfocite, Lympholyte®-H in eritrocite, kot je prikazano na sliki 6.



Slika 6: Plasti različnih tipov celic krvi po centrifugiranju krvi na Lympholyte®-H

Plazmo odstranimo, limfocite pa prenesemo v novo sterilno centrifugirko, jim dodamo 10 mL pufra PBS ter centrifugiramo pri $800 \times g$ 10 min pri temperaturi 18°C . Po centrifugiranju supernatant zavrzemo, k limfocitom dodamo še 5 mL pufra PBS ter ponovno centrifugiramo pri $800 \times g$ 10 min pri temperaturi 18°C . Po centrifugiranju supernatant v celoti odstranimo. Limfocite uporabimo za izolacijo RNA in DNA.

Protokol za izolacijo RNA in DNA iz limfocitov

Za izolacijo genomske DNA in RNA iz krvi smo uporabili TRI reagent (Sigma-Aldrich). Limfocitom smo dodali $1500 \mu\text{L}$ TRI reagenta ter jih s ponavljačim hitrim pipetiranjem homogenizirali. Homogenat smo inkubirali 5 min pri sobni temperaturi ter ga prenesli v mikrocentrifugirke in dodali $300 \mu\text{L}$ kloroform. S pomočjo stresalnika smo vse skupaj

intenzivno mešali minimalno 15 s, da je raztopina postala motno bela. Vzorce smo nato inkubirali pri sobni temperaturi 5 min in jih nato centrifugirali pri $12.000 \times g$ 15 min pri temperaturi 4°C . Pri tem se mešanica loči v tri faze - spodnja rdeča faza je faza, v kateri se nahajajo proteini, vmesna bela faza je faza DNA in zgornja prozorna faza je faza RNA. Za izolacijo RNA smo zgornjo fazo prenesli v svežo sterilno mikrocentrifugirko in dodali $750 \mu\text{L}$ 2-propanola ter premešali z obračanjem. Vzorec smo inkubirali pri sobni temperaturi 5 min. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali pri $12.000 g$ 10 min pri temperaturi 4°C . Supernatant smo po centrifugiranju odlili in dodali $1500 \mu\text{L}$ 75 % etanola. Premešali smo z obračanjem in centrifugirali pri $12.000 g$ 5 min pri temperaturi 4°C . Po centrifugiranju smo supernatant odlili in pelet posušili na zraku ter ga nato raztopili v $60 \mu\text{L}$ prečiščene vode brez ribonukleaz.

Za izolacijo DNA smo uporabili preostanek po odstranitvi zgornje faze za izolacijo RNA molekule. DNA smo iz vmesne precipitirali tako, da smo dodali $450 \mu\text{L}$ absolutnega etanola, premešali s počasnim obračanjem in inkubirali 3 min pri sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali pri $5.000 g$ 5 min pri temperaturi 4°C , odstranili supernatant ter pelet DNA dvakrat sprali v $1500 \mu\text{L}$ 0.1 M natrijevega citrata/10% etanol. Med vsakim spiranjem smo pelet DNA z občasnim mešanjem inkubirali 30 min pri sobni temperaturi ter centrifugirali pri $5.000 g$ 5 min pri temperaturi 4°C . Po spiranju DNA pelete suspendiramo v $1.500 \mu\text{L}$ 75 % etanola in inkubiramo 10 min pri sobni temperaturi, centrifugiramo pri $5.000 g$ 5 min pri temperaturi 4°C , odlijemo supernatant, DNA posušimo na zraku in jo raztopimo v $400 \mu\text{L}$ vode.

Po izolaciji smo izmerili koncentracijo DNA s čitalcem mikrotitrskih plošč (Synergy, Bioteck) z merjenjem absorbance pri 280 nm ter iz razmerja A_{260}/A_{280} določili čistost.

3.6. GENOTIPIZACIJA IZBRANIH POLIMORFIZMOV

Genotipizirali smo 2 polimorfizma posameznega nukleotida (SNP) na genu *ABCB1*, rs4148738 in rs1045642. Za genotipizacijo SNP-ja rs4148738 smo uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR, ang. za polymerase chain reaction), ki ji je sledila analiza talilne krivulje visoke ločljivosti (HRM, ang. za high resolution melting). Za SNP rs1045642 pa reakcijo polimorfizmov dolžin restriktionskih fragmentov (RFLP, ang. za restriction fragment lenght polymorphism) – PCR-RFLP.

Za genotipizacijo SNP-ja rs4148738 smo najprej z reakcijo PCR v realnem času (qPCR) pomnožili odsek DNA, ki vsebuje analiziran SNP, ter ga po pomnožitvi talili. Reakcija je

potekala po naslednjem protokolu: začetna denaturacija 95°C 10 min, pomnožitev, 45 ciklov po 95°C 10 s, 65-55°C 15 s (korak 0,5°C/1 cikel), 72°C 10 s, taljenje visoke ločljivosti: 95°C 1 min, 40°C 1 min, 60 – 90°C po 0,02°C/s in hlajenje: 40°C 10 s. HRM reakcijo smo izvedli na aparaturi LightCycler 480 (Roche) z uporabo LC480 HRM MasterMix (Roche).

Za genotipizacijo SNP-ja rs1045642 pa smo po PCR reakciji, ki je potekala po naslednjem protokolu: 95°C 5 min, 35 ciklov po 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s; produkt inkubirali ob prisotnosti restrikcijskega encima Sau3AI, ki reže PCR produkt v primeru alela C, ter ne reže produkta v primeru alela T na mestu SNP-ja. Po inkubaciji z restrikcijskim encimom čez noč pri temperaturi 37°C smo produkte reakcij analizirali z agarozno gelsko elektroforezo. Uporabili smo 2% agarozni gel.

Uporabljeni začetni oligonukleotidi in metoda genotipizacije so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Zaporedja začetnih oligonukelotidov, uporabljenih za genotipizacijo izbranih SNP-jev.

rs oznaka SNP-ja	Zaporedje začetnih oligonukleotidov	Velikost produkta [bp]	Metoda genotipizacije	Uporabljen restrikcijski encim	Velikosti fragmentov po restrikciji [bp]
rs4148738 A/G	TGACTGAGAGAGGACTGTTGGA ACTAGGGTTGAGGGGAGGAA	89	HRM	/	/
rs1045642 C/T	TGTTTCAGCTGCTTGATGG CATGCTCCCAGGCTGTTAT	252	RFLP	Sau3AI	CC: 160 + 92 CT: 252 + 160 + 92 TT: 252

Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 8.

Preglednica 8: Sestava reakcijske mešanice za PCR reakcijo

Komponenta	Volumen / koncentracija
DNA	50 ng
Smerni začetni oligonukleotid	500 nM
Protismerni začetni oligonukleotid	500 nM
10 x pufer	1 µL
dNTP (100 mM)	0,2 µL
Taq polimeraza (5 U/µL)	0,05 µL
H ₂ O	do 10 µL

3.7. MERJENJE IZRAŽANJA GENA *ABCB1*

Izolirano RNA smo uporabili za določanje izražanja gena *ABCB1* s tehniko PCR v realnem času (qPCR), ki omogoča sočasno detekcijo in kvantifikacijo PCR produkta. Z reverzno transkriptazo (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) smo RNA molekule prepisali v cDNA molekule. Vhodna količina RNA za prepis je bila 1 mg.

Sestava reakcijske mešanice za prepis je prikazana v preglednici 9. Prepisovanje je potekalo po naslednjem protokolu: 10 min pri 25°C, 120 min pri 37 °C, 5 s pri 85 °C, nato je sledilo hlajenje na 4 °C.

Preglednica 9: Sestava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo

Komponenta	Volumen [μL]
10 x RT Buffer	2,0
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10 RT Random Primers	2,0
MultiScribeTM Reverse Transcriptase	1,0
Nuclease-free H ₂ O	4,2
RNA	10

Nadalje smo s qPCR tehniko na aparaturi LC480 (Roche) izmerili količino izraženega gena. Sestava reakcijske mešanice za qPCR je bila naslednja: 5 μL LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche), mešanica začetnih oligonukleotidov (količina odvisna od vsakega para posebej, podana v preglednici 10), 2 μL cDNA ter voda do končnega volumna 10 μL .

Preglednica 10: Zaporedje in količine začetnih oligonukleotidov, uporabljenih pri qPCR reakciji.

Gen	mRNA	Zaporedje začetnih oligonukleotidov	Koncentracija začetnih oligonukleotidov [nM]
B2M	NM_004048.2	TTCTGGCCTGGAGGCTATC	500
		TCAGGAAATTGACTTCCATTTC	
GAPDH	NM_002046.3	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	200
		GAAGATGGTGATGGGATTTC	

Vsek vzorec smo naredili v duplikatu, pri čemer smo pri izračunih upoštevali povprečno vrednost obeh ponovitev. Za relativno kvantifikacijo analiziranih genov smo uporabili dva referenčna gena, ki se konstantno izražata v vseh celicah (*B2M* in *GAPDH*) ter glede na ta dva gena ovrednotili izražanje izbranih genov.

Temperaturni protokol qPCR je bil: začetna denaturacija pri 95 °C 5 min, pomnoževanje 55 ciklov po 95°C 10 s, 60°C 15 s in 72°C 15 s. Zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov ter uporabljene koncentracije so prikazane v preglednici 10.

Količino izraženega gena smo določili z metodo relativne kvantifikacije, pri kateri tarčni gen kvantificiramo relativno na referenčni gen, ki se konstantno izraža v vseh celicah. Uporabili smo metodo 2^{-ddC_t} (57) .

3.8. ASOCIACIJSKE ANALIZE

Naredili smo asociacijsko analizo z izidi zdravljenja za oba SNP-ja, posebej za dominantni in posebej za recesivni model ter nato še alelno asociacijsko analizo.

Pri testiranju modela dominantnega učinka, smo združili homozigote z rizičnim aleлом in heterozigote ter jih primerjali s homozigoti z divjim aleлом. Pri testiranju modela recesivnega učinka smo homozigote z divjim aleлом in heterozigote združili ter jih primerjali z homozigoti z rizičnim aleлом.

3.9. NONMEM model

3.9.1. Farmakokinetična analiza plazemskih podatkov

Plazemske koncentracije rivaroksabana smo analizirali s pomočjo populacijske farmakokinetike, ki omogoča ocenjevanje tako farmakokinetičnih parametrov, ki so značilni za celotno populacijo, kot parametrov, ki so značilni za posamezno osebo v populaciji (58). Populacijsko analizo smo izvedli v programskem okolju NONMEM 7 (59). Program ocenjuje parametre populacijske farmakokinetike na podlagi metode modela nelinearnih mešanih učinkov, kjer lahko ocenujemo interindividualno variabilnost parametrov, tj. variabilnost med različnimi osebami, ter rezidualno variabilnost. Slednje predstavlja nepojasnjeno napako, ki lahko izvira iz napake pri odmerjanju, jemanju vzorca, meritve koncentracije v vzorcu, itd..

V nekaterih primerih lahko interindividualno variabilnost parametrov, npr. pri volumnu porazdelitve ali očistku, pojasnimo s sočasnimi spremenljivkami, kot sta npr. telesna teža ali očistek kreatinina. S sočasnimi spremenljivki lahko torej razložimo različno farmakokinetiko zdravilnih učinkov med posamezniki. To omogoča identifikacijo posameznih podskupin ljudi, kjer se farmakokinetika razlikuje do te mere, da je za ustrezno zdravljenje potrebno prilagoditi režim odmerjenja (60). Pri določenih vzorcih so bile koncentracije rivaroksabana pod mejo detekcije, kar predstavlja manjkajoči podatek. To lahko privede do napačnih ocen parametrov modela, zato so v uporabi različne metode, ki manjkajoče podatke ustrezno vključujejo v model. Med boljšimi je t.i. M3 metoda. Ta predpostavlja, da je v vzorcu, kjer je bila izmerjena vrednost pod mejo kvantifikacije, taka koncentracija učinkovine, da bo verjetje za izmerjeno vrednost pod mejo kvantifikacije največje (61).

3.9.2. Osnovni model

V začetni fazi smo zgradili osnovni enoprostorni farmakokinetični model s prostorom absorpcije, kjer absorpcija poteka po kinetiki 1. reda. V programu NONMEM smo uporabili knjižnici ADVAN2 in TRANS2 ter definirali model z očistkom (CL), volumnom porazdelitve (Vd) in konstanto absorpcije (Ka). Interindividualno variabilnost parametrov (PAR) smo opisali z logaritemsko normalno porazdelitvijo:

$$PAR = TVPAR \cdot EXP(\eta)$$

TVPAR predstavlja populacijsko geometrično sredino parametra, η pa predstavlja naključno spremenljivko, ki se porazdeljuje normalno z aritmetični sredino 0 in varianco ω^2 . Model smo prilagajali logaritmiranim podatkom in pri tem smo ustreznododali proporcionalno rezidualno variabilnost.

Parametre modela smo ocenjevali s pomočjo aproksimacijske metoda »First-OrderConditionalestimationwithinteraction« (FOCE INTERACTION). Meritve, pri katerih je bila vrednost pod mejo kvantifikacije, smo obravnavali s pomočjo metode M3, zato smo pri ocenjevanju parametrov vključili tudi opcijo LAPLACIAN (61).

3.9.3. Model sočasnih spremenljivk

Na podlagi zgrajenega osnovnega modela smo postopoma dodajali sočasne spremenljivke (COV): starost, spol, polimorfizem **rs10445642** in **rs4148738** na genu *MDR1/ABCB1*, indeks telesne mase, kajenje, hitrost glomerulne filtracije, jemanje selektivnih zaviralcev privzema serotonina (lahko povečajo tveganje za krvavitev) ter izražanje gena *ABCB1* (hišna gena *GAPDH* in *B2M* za relativno kvantifikacijo izražanja količine gena). Sočasne spremenljivke smo dodajali v obliki linearne ozziroma potencialnega modela na sledeči način:

- Linearni model za zvezno sočasno spremenljivko:

$$TVPAR = \theta_1 \cdot (1 + \theta_2 \cdot (COV - COV_{ref}))$$

- Potencialni model za zvezno sočasno spremenljivko:

$$TVPAR = \theta_1 \cdot \left(\frac{COV}{COV_{ref}} \right)^{\theta_2}$$

- Linearni model za dihotomno sočasno spremenljivko:

$$TVPAR = \theta_1 \cdot (1 + \theta_2 \cdot COV)$$

Sočasne spremenljivke smo vključevali postopoma (ang. Step wise covariate modeling building). Statistično značilno znižanje vrednosti objektivne funkcije (ang. Objective function value – OFV) pri stopnji tveganja $\alpha = 0.05$ je bil kriterij za vključitev sočasne spremenljivke v model. Za izločitev sočasne spremenljivke iz modela pa smo upoštevali stopnjo tveganja $\alpha = 0.01$.

3.9.4. Analiza ustreznosti modela

Končni model smo analizirali ali ustrezzo opiše meritve eksperimentalnih podatkov s t.i. **goodness-of-fit grafi**. Z uporabo **VPC (visual predictive checks)** analize smo preverili ali je variabilnost, tako interindividualna kot rezidualna, ustrezzo modelirana (62). Podobno smo pregledali ali model ustrezzo napoveduje verjetnost meritev pod mejo kvantifikacije (61).

3.10. STATISTIČNA ANALIZA

Statistične analize smo izvedli s programom SPSS. V deskriptivni analizi smo pri numeričnih spremenljivkah izračunali povprečja in standardne deviacije, pri atributivnih pa frekvence kategorij.

V analitičnem delu smo pri numeričnih spremenljivkah uporabili parametrične teste za ugotavljanje razlik med povprečji skupin (ANOVA). V primeru, da so bile razlike med variancami velike (statistično značilno različne), smo za izračun verjetnosti uporabili Kruskal-Wallis-ov test.

Pri atributivnih spremenljivkah smo uporabili test hi-kvadrat.

Za ugotavljanje statistično značilne razlike med genotipi smo pri atributivnih spremenljivkah uporabili Fischerjev natančni test.

Za analizo haplotipov smo uporabili program Haplovie (63). S programom smo izračunali LD med analiziranim SNP-jema, določi frekvence haplotipov in izvedli asociacijsko analizo.

Razlike smo opredelili kot značilne pri stopnji tveganja $\alpha < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. BOLNIKI

V raziskavo smo vključili 293 bolnikov, izmed njih pa v samo analizo 244 bolnikov. Izključili smo 49 bolnikov. Razlogi za izključitev so bili v 9. primerih odpadla operacija in v 40. primerih napačno predpisana shema tromboprofilakse. Največ, kar 25 napačno predpisanih shem je bilo v skupini 1, od tega kar v 88% zaradi predpisa peroralnega antikoagulanta ob odpustu iz bolnišnice. V skupini 2 je bilo 8 napačno predpisanih shem in v skupini 3 skupno 7 napačno predpisanih shem. Preglednica 11 prikazuje napačno predpisane sheme.

Preglednica 11: Napačno predpisane sheme

Napačne sheme (antikoagulant med hospitalizacijo/antikoagulant po odpustu)	število
rivaroksaban/dalteparin	1
nadroparin/rivaroksaban	6
nadroparin/dalteparin	3
dalteparin/rivaroksaban	22
dalteparin/dabigatran	3
dalteparin/dalteparin	4
dalteparin/enoksaparin	1

Vključeni bolniki so bili pretežno starejši (mediana 67 let, razpon 38-85 let). Prevladovale so ženske (ženske/moški=154/90). Aktivnih kadilcev je bilo 9%, 6,15% bolnikov je imelo diabetes tip 2, revmatoidni artritis je imelo 3,28% bolnikov. Dva bolnika sta v preteklosti že utrpela venski tromboembolični dogodek. V kronični terapiji je imelo 6,15% bolnikov predpisani antidepresiv iz skupine SSRI, 15,2% bolnikov je pred operacijo jemalo acetilsalicilno kislino 100 mg 1-krat dnevno ali acetilsalicilno kislino v kombinaciji z dipiridamolom v odmerku 200 mg/25 mg 2-krat dnevno.

V skupino 1 je bilo vključenih 80 bolnikov, v skupino 2 81 bolnikov in v skupino 3 skupno 83 bolnikov. Bolniki se v vseh treh skupinah med seboj niso razlikovali po osnovnih karakteristikah, izjema je bila diagnoza diabetesa tipa 2, kjer je bilo v skupini 3 statistično pomembno manj bolnikov s to boleznjijo kot v skupinah 1 in 2 (preglednica 12).

Preglednica 12: Osnovne značilnosti vključenih bolnikov po skupinah

Značilnosti	SKUPINA 1		SKUPINA 2		SKUPINA 3		Stat.razlika
	n	%	n	%	n	%	
Število bolnikov	80	32,8	81	33,2	83	34	NA
Starost (leta)*	70 (38-85)		66 (43-85)		66 (48-85)		0,141 ¹
Spol							0,217 ²
moški	34	42,5	24	29,6	32	38,6	
ženske	46	57,5	57	70,4	51	61,4	
Kadilski status							0,544
kadilec	5	6,25	8	9,88	9	10,84	
nekadilec	75	93,75	73	90,12	74	89,16	
ITM							0,223
1<18,5	0	0	1	1,23	0	0	
2=(18,5-24,5)	7	8,75	3	3,7	14	16,87	
3=(25-29,9)	40	50	36	44,44	37	44,58	
4=(30-34,5)	21	26,25	25	30,86	22	26,51	
5=(35-39,9)	10	12,5	11	16,05	7	8,44	
6≥40	2	2,5	5	6,17	3	3,61	
Diabetes tip 2							0,028
da	8	10	6	7,41	1	1,2	
ne	72	90	75	92,59	82	98,8	
Revmatoidni artritis							0,338
da	4	5	3	3,7	1	1,2	
ne	76	95	78	96,3	82	98,8	
Ocena GF							0,196
1≥90	20	25	33	40,74	26	31,33	
2=(60-89)	54	67,5	40	49,38	45	54,22	
3=(30-59)	6	7,5	7	8,64	11	13,25	
4=(15-29)	0	0	1	1,23	1	1,2	
5<15	0	0	0	0	0	0	
Stanje po VTE							0,106
da	2	2,5	0	0	0	0	
ne	78	97,5	81	100	83	100	
SSRI							0,515
da	7	8,75	4	4,94	4	4,82	
ne	73	91,25	77	95,06	79	95,18	
ASPIRIN® ali ASASANTIN®							0,424
da	13	16,25	9	11,11	15	18,07	
ne	67	83,75	72	88,89	68	81,93	

* mediana z razponom vrednosti v oklepaju; ITM: indeks telesne mase; Ocena GF: ocena glumerulne filtracije; SSRI: selektivni inhibitor prevzema serotonina; VTE: venski tromboembolizem; NA: izračun ni smiseln; ¹: ANOVA, ²: HI-KVADRAT.

Bolniki med skupinami se prav tako niso razlikovali v karakteristikah, vezanih na operativni poseg (preglednica 13)

Preglednica 13: Osnovne značilnosti bolnikov po skupinah vezane na operativni poseg

Značilnosti	SKUPINA 1		SKUPINA 2		SKUPINA 3		Stat. razlika p
	n	%	n	%	n	%	
Vrsta OP posega							0,713 ¹
TEP GEN sin	21	26,3	19	23,5	25	30,1	
TEP GEN dex	17	21,3	22	27,2	19	22,9	
TEP COXAE sin	23	28,7	19	23,5	15	18,1	
TEP COXAE dex	19	23,8	21	25,9	24	28,9	
Septična nekroza							0,238 ¹
da	2	2,5	1	1,2	0	0	
ne	78	97,5	80	98,8	83	100	
Revizijska OP							0,110 ¹
da	2	2,5	3	3,7	0	0	
ne	78	97,5	78	96,3	83	100	
Stanje po TEP							0,385 ¹
da	17	21,3	15	18,5	11	13,3	
ne	63	78,8	66	81,5	72	86,7	
Tip anestezije							0,549 ¹
področna	59	73,8	68	84	68	81,9	
splošna	16	20	9	11,1	11	13,3	
kombinirana	5	6,3	4	4,9	4	4,8	
Avtotransfuzija							0,853 ¹
da	20	25	22	27,2	24	28,9	
ne	60	75	59	72,8	59	71,1	
Čas hospitalizacije*	7,3 (4-23)		7,11 (22-22)		6,7 (3-26)		0,405 ²

TEP GEN sin: artroplastika levega kolena; TEP GEN dex: artroplastika desnega kolena; TEP COXAE sin: artroplastika levega kolka; TEP COXAE dex: artroplastika desnega kolka; Avtotransfuzija: planirana oddaja krvi pred OP posegom; Čas hospitalizacije: od operacije do odpusta iz bolnišnice; Statistični test je :¹hi-kvadrat, 2: ANOVA; * povprečje z razponom v oklepaju.

Primerjali smo bolnike med skupinami tudi glede na laboratorijske vrednosti vezane na koagulacijo krvi (PČ, INR in aPTČ), število trombocitov ter vrednost hemoglobina pred operativnim posegom in ugotovili, da med skupinami ni statistično pomembnih razlik (preglednica 14).

Preglednica 14: Primerjava laboratorijskih vrednosti bolnikov med skupinami

Lab vrednosti pred OP	Skupina 1 (povprečje (min-max))	Skupina 2 (povprečje (min-max))	Skupina 3 (povprečje (min-max))	Stat.razlika p
PČ	0,99 (0,75-1,23)	1,01 (0,78-1,18)	0,98 (0,77-1,21)	0,153
INR	1,02 (0,89-1,19)	1,01 (0,88-1,16)	1,03 (0,86-1,19)	0,177
aPTČ (s)	29,97 (23-41)	30,21 (23-39)	29,45 (19-36)	0,336
Trombociti 10 ⁹ /L	200,32 (52-330)	209,41 (122-354)	200,95 (124-336)	0,380
Hb (g/l)	137,2 (103-183)	137,15 (110-171)	140,04 (108-167)	0,286

OP: operacija; PČ: protrombinski čas, INR: mednarodno umerjeno razmerje: aPTČ: aktiviran parcialni protrombinski čas, Hb:hemoglobin; Statistični test: ANOVA

4.2. IZIDI UČINKOVITOSTI ZDRAVLJENJA

Med hospitalizacijo smo zabeležili 12 sumov na GVT in 4 sume na PE. Od tega sta bila dva suma na PE potrjena, ena bolnica stara 77 let je bila iz skupine 1, druga bolnica stara 78 let pa iz skupine 3. Bolnici sta bili nekadilki, nista imele sladkorne bolezni, kronične ledvične bolezni ali revmatoidnega artritisa. Bolnica iz skupine 1 je v preteklosti že utrpela VTE, vendar ne zaradi artroplastike. Pri obeh bolnicah je šlo za artroplastiko kolena.

Obe bolnici sta bili operirani v področni anesteziji, bolnica v skupini 1 je v 24 urah po operaciji prejela 4 enote krvi, bolnica v skupini 3 pa dodatne krvi ni prejela. Obe bolnici sta dobili reinfuzijo krvi, ki je iztekla po drenih, bolnica iz skupine 1 750 ml in bolnica iz skupine 3 550 ml. Nobena izmed bolnic pred posegom ni oddala krvi za avtotransfuzijo. Pri bolnici iz skupine 1 je bil sum na PE postavljen 7. dan po operaciji, pri bolnici iz skupine 3 pa 5. dan po operaciji. D-dimer pri bolnici in skupine 1 je znašal 9101 µg/l, pri bolnici iz skupine 2 pa 1785 µg/l (referenčne vrednosti D-dimera so manjše od 500 µg/l, pomembna je predvsem njegova negativna napovedna vrednost pri odkrivanju VTE).

V obdobju po odpustu iz bolnišnice pa do 35. dne po operaciji, ko so bolniki prenehali z jemanjem tromboprofilakse, smo zabeležili 7 sumov na GVT in 1. sum na PE, ki pa so bili z diagnostičnimi preiskavami ovrženi.

V obdobju po prenehanju jemanja tromboprofilakse pa do 90 dne po operaciji smo zabeležili še 7 sumov na GVT in 2 suma na PE, ki pa so bili prav tako ovrženi.

Vse tri skupine se v vseh navedenih izidih zdravljenja v vseh treh obdobjih zdravljenja statistično pomembno med seboj niso razlikovale (preglednica 15).

Preglednica 15: Izidi zdravljenja med skupinami med obdobji

Izidi	Skupina 1		Skupina 2		Skupina 3		stat. razlika
	n	%	n	%	n	%	
sum na GVT (obdobje 1)							0,450
da	6	7,5	3	3,7	3	3,7	
ne	74	92,5	78	96,3	78	96,3	
potrjen GVT (obdobje 1)							NA
da	0	0	0	0	0	0	
ne	80	100	81	100	83	100	
sum na PE (obdobje 1)							0,110
da	3	3,8	0	0	1	1,2	
ne	77	96,3	81	100	82	98,8	
potrjena PE (obdobje 1)							0,444
da	1	1,3	0	0	1	1,2	
ne	79	98,8	81	100	82	98,8	
sum na GVT (obdobje 2)							0,886
da	2	2,5	2	2,5	3	3,6	
ne	78	97,5	79	97,5	80	96,4	
potrjen GVT (obdobje 2)							NA
da	0	0	0	0	0	0	
ne	80	100	81	100	83	100	
sum na PE (obdobje 2)							0,339
da	0	0	0	0	1	1,2	
ne	80	100	81	100	82	98,8	
potrjena PE (obdobje 2)							NA
da	0	0	0	0	0	0	
ne	80	100	81	100	83	100	
sum na GVT (obdobje 3)							0,360
da	1	1,3	4	4,9	2	2,4	
ne	79	98,8	77	95,1	81	97,6	
potrjena GVT (obdobje 3)							NA
da	0	0	0	0	0	0	
ne	80	100	81	100	83	100	
sum na PE (obdobje 3)							0,450
da	0	0	1	1,2	1	1,2	
ne	80	100	80	98,8	82	98,8	
potrjena PE (obdobje 3)							NA
da	0	0	0	0	0	0	
ne	80	100	81	100	83	100	

obdobje 1: po operaciji do odpusta iz bolnišnice; obdobje 2: od odpusta iz bolnišnice do 35 dne po operaciji, obdobje 3: od 36-90 dne po operaciji; NA: izračun ni mogoč; GVT: globoka venska tromboza; PE: pljučna embolija; Statistični test: hi-kvadrat

4.3. NEŽELENI UČINKI

Pojav krvavitev smo vrednotili na več načinov. Zbrali smo podatke o velikih krvavitvah, klinično pomembnih ne-velikih krvavitvah in ne-velikih krvavitvah, spremljali smo izgube krvi, sekrecije iz ran, pojav hematomov ter nadomeščanje krvi ali dodajanje preparatov železa in jih primerjali med vsemi tremi skupinami (preglednica 16).

Ugotovili smo eno veliko krvavitev, ki je zahtevala punkcijo pri 49-letnem bolniku po artroplastiki levega kolena iz skupine 2. Bolnik ni bil diabetik, ni prejemal v kronični terapiji antiagregacijskih zdravil, prav tako ne zdravil iz skupine SSRI. Očistek kreatinina je bil večji od 90 ml/min. Bolnik je bil operiran s področno anestezijo. Ves čas po operativnem posegu je bila prisotna sekrecija iz operativne rane.

Preglednica 16: Pregled neželenih učinkov med skupinami

Značilnosti	Skupina 1		Skupina 2		Skupina 3		Stat. razlika
	n	%	n	%	n	%	
Razlika v Hb (g/l)*	32,5 (4-61)		28,1 (-5-54)		31,5 (-1-78)		0,074 ¹
Izguba krvi preko sukcij(ml)*	496,0 (0-1650)		461,05 (0-1490)		573,25 (0-1600)		0,220 ¹
Reinfuzija v 6 h (ml)*	225,6 (0-1200)		205,3 (0-1000)		279,2 (0-1000)		0,231 ¹
Prejel transfuzijo							0,431 ²
da	32	40,0	25	30,9	32	38,6	
ne	48	60,0	56	69,1	51	61,4	
Enote krvi v 24 h*	0,525 (0-5)		0,3086 (0-2)		0,494 (0-4)		0,358 ³
Enote krvi v 24-48 h*	0,0375 (0-1)		0,0247 (0-1)		0,0241 (0-1)		0,849 ¹
Enote krvi po 48 h*	0,1875 (0-2)		0,0494 (0-1)		0,0964 (0-2)		0,130 ³
Enote krvi skupaj*	0,75 (0-5)		0,3827 (0-3)		0,6145 (0-4)		0,432 ³
Velika krvavitev-potrebna punkcija							0,331 ²
da	0	0	1	1,2	0	0	
ne	80	100	80	98,8	83	100	
Velika krvavitev-≥2 enote krvi							0,065 ²
da	14	17,5	5	6,2	12	14,5	
ne	66	82,5	76	93,8	71	87,3	
Hematom							0,871 ²
da	11	13,8	12	14,8	10	12,05	
ne	69	86,3	69	85,2	73	87,95	
Sekrecija iz rane ali drenov							0,257 ²
da	20	25	22	27,2	30	36,1	
ne	60	75	59	72,8	53	63,9	
Sekrecija iz rane ≥5 dan po OP							0,840 ²
da	13	16,3	11	13,6	11	13,3	
ne	67	83,8	70	86,4	72	86,7	
Predpis železa per os							0,180 ²
da	5	6,3	2	2,5	1	1,2	
ne	75	93,7	79	97,5	82	98,8	

*povprečje z razponom v oklepaju; Razlika v Hb: razlika v hemoglobINU izmerjenim pred operacijo in 24 ur po njej;
¹:ANOVA; ²:Hi-kvadrat; ³:Kruskal-Wallis,

Med veliko krvavitev smo šteli tudi situacijo, kjer so bolniki v roku 24 ur potrebovali 2 ali več enot krvi. Takšnih bolnikov je bilo skupno 31 ali 12,7%. Prvih 24 ur po operaciji je 26 bolnikov prejelo 2 ali več enot krvi (20 bolnikov 2 enoti, 3 bolniki 3 enote, 2 bolnika 4 enote in 1 bolnik 5 enot). Po 48 urah po operaciji je 5 bolnikov potrebovalo dodatno 2 enoti krvi. Potreba po dveh ali več enotah krvi se med skupinami ni statistično pomembno razlikovala.

Med klinično pomembnimi ne-velikimi krvavitvami smo pri 13,5% bolnikov opazili pojav hematoma, vendar med skupinami ni bilo statistično značilne razlike.

Laboratorijsko smo izgubo krvi vrednotili tudi preko razlike v vrednosti hemoglobina (Hb) pred operacijo in 24 ur po operaciji. V povprečju je bil padec Hb za 30,7 g/l, najnižji padec smo zaznali pri skupini 2, vendar razlika ni bila statistično značilna.

Izgubo krvi smo po-operativno spremljali preko izgube krvi preko sukcij, ki so bile odstranjene 24 ur po operaciji. V povprečju so bolniki izgubili 510,7 ml krvi, v prvih 6 urah po operaciji pa so jim v povprečju reinfundirali z metodo po-operativne avtotransfuzije 237,1 ml lastne krvi. Največje izgube preko sukcij ter največji volumen reinfuzije smo opažali pri skupini 3, vendar razlika v primerjavi z skupinama 1 in 2 ni bila statistično značilna.

Beležili smo tudi sekrecijo iz operativne rane ali mesta, kjer so bili vstavljeni dreni. Sekrecijo smo opažali pri 29,5% bolnikov, še 5. dan po operaciji pa pri 14,3% bolnikov. Statistično pomembnih razlik med skupinami v sekreciji in sekreciji še 5. dan po operaciji nismo ugotovili.

Spremljali smo tudi, ali je bil bolnikom po operaciji predpisan peroralni pripravek železa, kar smo opažali pri 3,3% bolnikov. Med skupinami ni bilo statistično pomembnih razlik.

4.4. FREKVENCE GENOTIPOV, ALELOV IN HAPLOTIPOV IZBRANIH POLIMORFIZMOV

Pri vseh vključenih bolnikih smo genotipizirali dva polimorfizma posameznih nukleotidov (SNP) na genu *ABCB1*: **rs1045642** in **rs4148738**. Frekvence genotipov so se pri obeh proučevanih polimorfizmih razporedile v skladu s Hardy-Weinbergerjevim ravnotežjem (ang. Hardy-Weinberg equilibrium; HWE). Frekvence genotipov in alelov so za SNP rs1045642 prikazani v preglednici 17, za SNP rs4148738 pa v preglednici 18.

Preglednica 17: Analiza SNP-ja rs1045642

rs1045642		Vsi bolniki (n=238)	Skupina 3 (n=83)
CC	wt/wt	19,70%	20,50%
CT	wt/v	53,40%	54,20%
TT	v/v	26,90%	25,30%
C	wt	46,40%	47,60%
T	v	53,60%	52,40%
HWE	p	0,262	0,429

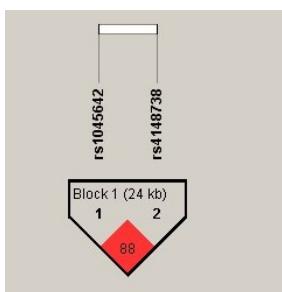
wt=alel divjega tipa, rizični alel

Preglednica 18: Analiza SNP-ja rs4148738

rs4148738		Vsi bolniki (n=241)	Skupina 3 (n=83)
AA	wt/wt	35,70%	37,30%
AG	wt/v	47,30%	47,00%
GG	v/v	17,00%	15,70%
A	wt	59,30%	60,80%
G	v	40,70%	39,20%
HWE	p	0,760	0,900

wt=alel divjega tipa, v=rizični alel

Za polimorfizma smo analizirali haplotip. Izvedli smo analizo vezavnega neravnovesja (LD) in jo prikazali s stopnjo LD (D'). Vrednost D' med SNP rs1045642 in rs4148738 je bila 0,88, kar kaže na to, da imata SNP-ja visoko vezavno neravnovesje in zato visoko verjetnost, da se bosta dedovala skupaj (slika 7).

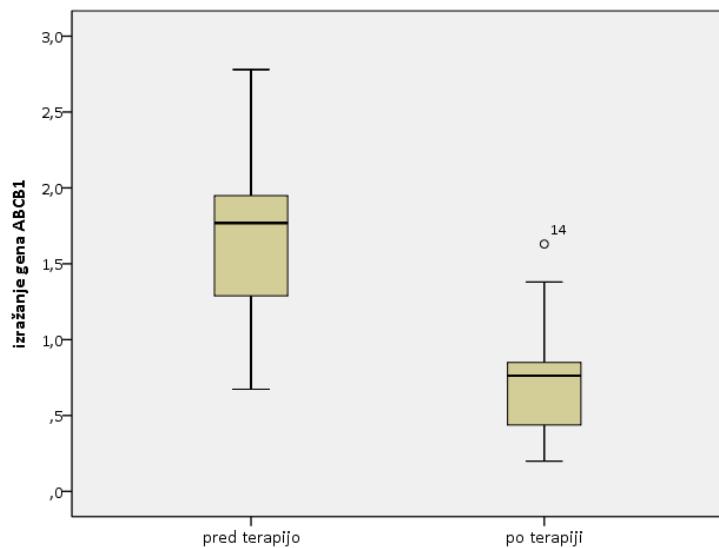


Slika 7: Haplotipski blok med SNP-jema rs1045642 in rs4148738.

Frekvence haplotipov so bile sledeče: CA 45,4%, TG 37,0%, TA 15,4% in CG 2,1%.

4.5. IZRAŽANJE GENA *ABCB1*

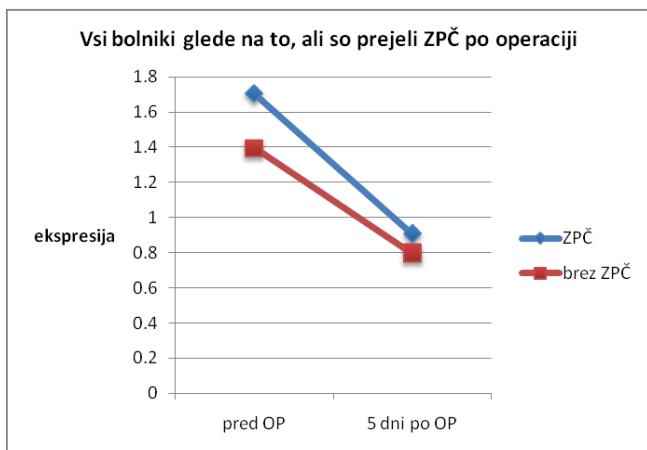
Pri 17. naključno izbranih bolnikih smo želeli določili izražanje gena *ABCB1* iz krvi odvzete pred operacijo in krvi odvzete 5 dni po operaciji z metodo relativne kvantifikacije in uporabo hišnega gena *GADPH*. Pri enem bolniku odvzema krvi 5. dan terapije nismo uspeli opraviti, zato ga v nadaljnjo analizo nismo vključili.



Slika 8: Izražanje gena *ABCB1* pred terapijo in po 5 dneh terapije.

Izražanje gena *ABCB1* se je po operaciji statistično značilno znižala ($p=0,000076$), kar prikazuje slika 8.

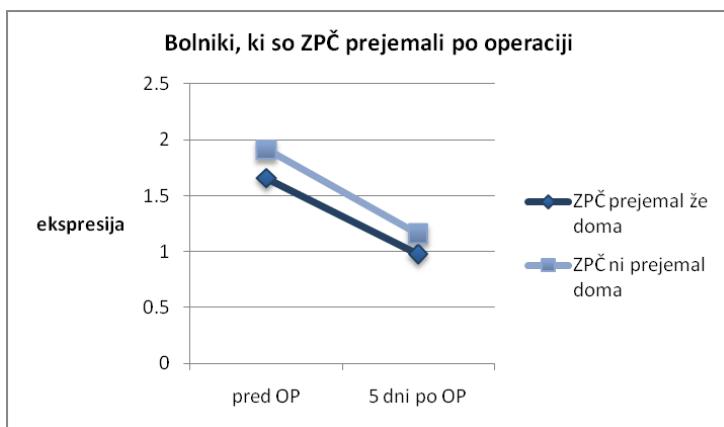
V nadaljevanju smo želeli preveriti, ali bi lahko bila sočasno predpisana zdravila odgovorna za spremembo izražanja gena *ABCB1* v limfocitih po 5. dneh zdravljenja. Med pogosto predpisanimi zdravili po operaciji, ki so znani kompetitivni inhibitorji in substrati *ABCB1*, so zaviralci protonske črpalke (ZPČ). Najpogosteje predpisani ZPČ so bili omeprazol, pantoprazol in esomeprazol (64).



Slika 9: Povprečna sprememba v izražanju *ABCB1* pred operacijo in 5. dni po njej glede na to, ali so bolniki po operaciji prejeli ZPČ

Bolniki, ki so ZPČ po operaciji prejeli, so imeli višjo izražanje gena, ki se je po 5. dneh tudi bolj zmanjšala kot pri skupini, ki ZPČ po operaciji niso prejemali. Razlika v izražanju gena *ABCB1* med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,278$) (slika 9).

Ko smo preučili samo bolnike, ki so po operaciji prejeli ZPČ in jih razdelili na tiste, ki so doma že prejemali ZPČ in tiste, ki jih niso, smo opazili nekoliko višji padec izražanja pri skupini, ki doma ZPČ še ni prejemala, ter višjim začetnim izražanjem pri bolnikih, ki ZPČ doma niso prejemali, kar lahko kaže na inhibitorni učinek ZPČ na gen *ABCB1*. Razlika med skupinama ni bila statistično značilna ($p=0,643$) (slika 10).



Slika 10: Razlika v povprečnem izražanju *ABCB1* pred operacijo in 5 dni po njem , glede na to, ali so bolniki že doma prejemali ZPČ.

4.6. POVEZAVA MED IZBRANIMI POLIMORFIZMI IN IZIDI ZDRAVLJENJA

Pri spremeljanju parametrov, preko katerih smo spremljali pozne učinke krvavitev, smo z modelom recessivnega učinka pri polimorfizmu rs1045642 dokazali statistično značilno povezavo med pojavnostjo hematoma ob operativni rani ter sekrecijo iz rane ali mesta, kjer so bili vstavljeni dreni še 5. dan po operaciji.

Pregled analize poznih učinkov na krvavitve s frekvencami genotipov je predstavljena v preglednici 19.

Preglednica 19: Primerjava povezav med genotipi in izidi poznih učinkov krvavitev s pomočjo dominantnega in recessivnega modela

Lastnost	Št. bolnikov z lastnostjo/brez lastnosti	Frekvence genotipov pri bolnikih z lastnostjo	Frekvence genotipov pri bolnikih brez lastnosti	p vrednost	OR	(95% IZ)
rs4148738 AA vs AG+GG						
Hematom ob rani	10/73	AA=40%, AG+GG=60%	AA=37%, AG+GG=63%	1,000	0,88	0,228-3,401
Sekrecija iz rane ali drenov	30/53	AA= 43,3%; AG+GG=56,7%	AA=34% AG+GG =66%	0,481	0,673	0,268-1,686
Sekrecija iz rane po ≥ 5 dnevih	11/72	AA=27,3% AG+GG=72,7%	AA=38,9% AG+GG =6,11%	0,525	1,697	0,415-6,953
Prejel ≥ 2 enoti krvi	12/72	AA= 41,7%; AG+GG=58,3%	AA=36,6% AG+GG =63,4%	0,756	0,809	0,233-2,809
rs4148738 GG vs AG+AA						
Hematom ob rani	10/73	GG= 20% AA+AG= 80%	GG=15,1%; AA+AG=84,9%	0,652	1,409	0,263-7,537
Sekrecija iz rane ali drenov	30/53	GG=23,3%; AA+AG=76,7%	GG=11,3%; AA+AG=88,7%	0,209	2,384	0,719-7,908
Sekrecija iz rane po ≥ 5 dnevih	11/72	GG= 36,4%; AA+AG=63,6%	GG= 12,5%; AA+AG=87,5%	0,065	4,000	0,974-16,435
Prejel ≥ 2 enoti krvi	12/71	GG= 18,2%; AA+AG=81,8%	GG= 15,5%; AA+AG=84,5%	1,000	1,827	0,366-9,108
rs1045642 CC vs CT+TT						
Hematom ob rani	10/73	CC=10% CT+TT=90%	CC=13,7% CT+TT=86,3%	0,679	2,526	0,297-21,453
Sekrecija iz rane ali drenov	30/53	CC=26,7% CT+TT=73,3%	CC=17% CT+TT=83%	0,397	0,563	0,191-1,658
Sekrecija iz rane po ≥ 5 dnevih	11/72	CC=9,1% CT+TT=90,9%	CC=22,2% CT+TT=77,8%	0,446	2,857	0,340-24,028
Prejel ≥ 2 enoti krvi	12/71	CC=16,7% CT+TT=83,3%	CC=21,1% CT+TT=78,9%	1,000	1,339	0,265-6,778
rs1045642 TT vs CC+CT						
Hematom ob rani	10/73	TT=60% CC+CT =40%	TT=20,5% CC+CT =79,5%	0,014	5,800	1,449-23,209
Sekrecija iz rane ali drenov	30/53	TT=36,7% CC+CT =63,3%	TT=18,9% CC+CT =81,1%	0,114	2,489	0,905-6,851
Sekrecija iz rane po ≥ 5 dnevih	11/72	TT=63,4% CC+CT =36,4%	TT=19,5% CC+CT =80,5%	0,005	7,25	1,861-28,249
Prejel ≥ 2 enoti krvi	12/71	TT=16,7% CC+CT =83,3%	TT=26,8% CC+CT =73,2%	0,721	1,827	0,366-9,108

Legenda: OR: razmerje obetov med frekvencami genotipov za posamezno lastnost; IZ:interval zaupanja; Statistični test: Fisherjev natančni test; p vrednost je statistična razlika med frekvencami genotipov pri bolnikih z lastnostjo in brez nje.

V skupini bolnikov s hematomom ob rani pri polimorfizmu rs1045642 je bila frekvenca genotipa TT 60%, frekvenca genotipov CC in CT pa 40% v primerjavi s skupino bolnikov brez hematoma ob rani, kjer je bila frekvenca genotipa TT 20,5%, frekvenca genotipov CC in CT pa 79,5%. Pri bolnikih s hematomom je bila frekvenca genotipa TT statistično značilno višja kot frekvenca genotipa TT pri bolnikih brez prisotnega hematoma ($p=0,014$).

Od skupno 83 bolnikov je imelo 5. dan po operaciji še prisotno sekrecijo iz rane ali mesta vstavljenih drenov 11 bolnikov. Med njimi je imelo 63,6% bolnikov genotip TT in 36,4% bolnikov genotip CC ali CT. Od 72 bolnikov, pri katerih sekrecija ni bila več prisotna je imelo TT genotip 19,5% in genotip CC ali CT 80,5% bolnikov.

Genotip TT je bil pogostejši pri skupini s prisotno sekrecijo (63,6%) v primerjavi s skupino brez sekrecije (19,5%) še 5. pooperativni dan. Razlika je bila statistično značilna ($p=0,005$).

Pri polimorfizmu rs4148738 smo pri primerjavi genotipov GG z AA ali AG pri bolnikih z sekrecijo iz rane še 5. dan po operaciji prav tako opazili precejšnjo, vendar statistično neznačilno razliko med frekvencama genotipov (frekvenca genotipa GG pri bolnikih z sekrecijo je znašala 36,4%, frekvenca genotipa AA ali AG pa 63,6%, frekvenca genotipa GG pri bolnikih brez sekrecije je znašala 12,5%, frekvenca genotipa AA ali AG pa 87,5%).

Za noben model nismo uspeli dokazati statistično značilnih povezav z učinkovitostjo zdravljenja, prav tako ne s parametri, preko katerih smo spremljali zgodnje znake krvavitev, kot so izguba krvi preko sukcij v prvih 24 urah po operaciji, reinfuzija krvi prvih 6 ur po operaciji, padec hemoglobina prvih 24 ur po operaciji, potrebne enote krvi prvih 24 ur po operaciji, ter 24 do 48 ur po operaciji.

Z alelno asociacijsko analizo smo primerjali pozne učinke krvavitev (preglednica 20) in ugotovili, da je alel T za SNP rs1045642 statistično značilno povezan z večjim tveganjem za nastanek hematoma ob rani. Frekvenca alela T je bila v skupini bolnikov s hematomom ob rani 75% v primerjavi z bolniki brez hematoma ob rani, kjer je frekvenca alela T znašala 49% ($p = 0,031$).

Preglednica 20: Alelna asociacijska analiza SNP rs1045642 in rs4148738 na pozne izide krvavitev

SNP	rs1045642			rs4148738		
Alel	T			G		
Lastnost	Hematom ob rani	Sekrecija iz rane ali mesta drenov	Sekrecija iz rane ali mesta drenov po 5. dneh	Hematom ob rani	Sekrecija iz rane ali mesta drenov	Sekrecija iz rane ali mesta drenov po 5. dneh
Frekvenca alela pri posameznikih z lastnostjo	75%	55%	77,3%	40%	40%	54,5%
Frekvenca alela pri posameznikih brez lastnosti	49%	50,9%	48,6%	39%	38,7%	36,8%
p-vrednost	0,031	0,615	0,0122	0,934	0,867	0,112

Alel T je bil značilno povezan tudi s sekrecijo iz rane ali mesta, kjer so bili vstavljeni dreni še 5. dan po operaciji. Frekvenca alela T je bila v skupini bolnikov s sekrecijo iz rane ali mesta, kjer so bili vstavljeni dreni še 5. dan po operaciji 77,3%. Pri posameznikih, kjer sekrecija po 5. dneh ni bila več prisotna, je frekvenca alela T znašala le 48,6% ($p = 0,0122$).

Statistično značilnih povezav med aleli SNP-ja rs4148738 in izidi zdravljenja nismo odkrili.

4.7. POVEZAVE MED HAPLOTIPI IN IZIDI ZDRAVLJENJA

Primerjava frekvence haplotipov v povezavi s poznnimi izidi krvavitev je pokazala statistično značilno razliko v frekvenci haplotipa TA pri bolnikih s hematomom v primerjavi z bolniki brez hematoma. Frekvenca haplotipa CA je bila statistično značilno nižja pri bolnikih s hematomom in pri bolnikih s sekrecijo iz rane še po 5. dnev, kot pri bolnikih brez teh zapletov.

Frekvenca haplotipa TA je pri posameznikih s hematomom ob rani znašala 35%, medtem ko je pri posameznikih brez hematoma frekvenca haplotipa nižja in je znašala 12,7% ($p=0,0092$). Frekvenca haplotipa CA je znašala pri posameznikih s hematomom ob rani 25%, pri posameznikih brez hematoma pa je bila višja in je znašala 48,3% ($p=0,0491$). Frekvenca haplotipa CA je pri posameznikih s sekrecijo iz rane ali mesta, kjer so bili vstavljeni dreni še 5. dan po operaciji znašala 22,7% in je bila nižja kot pri posameznikih brez prisotne sekrecije, kjer je znašala 49% ($p=0,0211$). Vsi rezultati so zbrani v preglednici 21.

Preglednica 21: Primerjava alelnih blokov glede na pozne znake krvavitev

Lastnost	Hematom ob rani			Sekrecija iz rane ali mesta drenov			Sekrecija iz rane ali mesta drenov po 5. dneh		
	Frekvenca haplotipa pri osebah z lastnostjo	Frekvenca haplotipa pri osebah brez lastnosti	p-vrednost	Frekvenca haplotipa pri osebah z lastnostjo	Frekvenca haplotipa pri osebah brez lastnosti	p-vrednost	Frekvenca haplotipa pri osebah z lastnostjo	Frekvenca haplotipa pri osebah brez lastnosti	p-vrednost
Halotip									
CA	25%	48,3%	0,0491	44,8%	45,8%	0,9009	22,7%	49%	0,0211
TG	40%	36,6%	0,7753	39,8%	35,5%	0,5748	54,5%	34,4%	0,0688
TA	35%	12,7%	0,0092	15,2%	15,5%	0,9563	22,7%	14,2%	0,3006
CG	0%	2,4%	0,5003	0,2%	3,2%	0,1916	0%	2,4%	0,4747

4.8. FARMAKOKINETIČNI MODEL RIVAROKSABANA

4.8.1. Podatki o vključenih bolnikih

Od sprva predvidenih 25 bolnikov smo v raziskavo vključili 17 bolnikov, pri katerih smo opravili meritve plazemskih koncentracij rivaroksabana, teste koagulacije, genotipizacijo ter meritve izražanja gena *ABCB1* iz venske krvi bolnikov.

Bolnični so bili v povprečju stari $64,7 \pm 10,2$ leti, med njimi je bilo 9 žensk in 8 moških. Dva bolnika sta bila kadilca, noben bolnik ni imel sladkorne bolezni ali revmatoidnega artritisa. Pri vseh bolnikih je šlo za prvo artroplastično operacijo, pri 7. bolnikih kolensko in pri 10. bolnikih kolčno. Trije bolnični so imeli ITM med $18,5\text{-}24,5 \text{ kg/m}^2$, 8 bolnikov med $25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$, 5 bolnikov med $30\text{-}34,5 \text{ kg/m}^2$ in en bolnik med $35\text{-}39,9 \text{ kg/m}^2$. Glede na očistek kreatinina smo 5 bolnikov uvrstili v skupino, ki je imela očistek $\geq 90 \text{ ml/min}/1,73 \text{ m}^2$, 11 bolnikov v skupino z očistkom med $60\text{-}89 \text{ ml/min}/1,73 \text{ m}^2$. Samo en bolnik je imel očistek med $30\text{-}59 \text{ ml/min}/1,73 \text{ m}^2$.

4.8.2. Koncentracije rivaroksabana

Vsi bolnični so prejemali 10 mg odmerek rivaroksabana na 24 ur. Prvi odmerek so prejeli približno 6 ur po operaciji. V preglednici 22 so navedene izmerjene koncentracije rivaroksabana v petih časovnih točkah.

Preglednica 22: Izmerjene plazemske koncentracije rivaroksabana v petih točkah

Št. bolnika	C _{3h(dan 1)}	C _{12h(dan 1)}	C _{24h(dan 1)}	C _{3h(dan 3)}	C _{3h(dan 5)}
	µg/l				
1	122,8	57,4	19,9	96,2	121,4
2	26	70,6	18,8	109,8	113,7
3	78,1	75,8	32,9	127,2	124,2
4	21,6	103,4	51	136,7	92,2
5	15,8	46,5	24,2	115,4	137,5
6	78,5	46,7	33,9	94,2	136,3
7	108	72,7	35,6	94,5	110,6
8	117,6	50,9	19,5	115,6	/
9	59,9	36,9	21,9	38,6	117,7
10	19,5	88,9	21,1	157	161,4
11	0	16,3	14,6	12,3	73,5
12	73	28,3	6,5	22,1	114,1
13	63,3	15,7	0	35,2	65,2
14	106,4	0	0	67,7	58,2
15	1,2	0	0	14	78,3
16	4,3	5,4	85,5	107,1	/
17	0	/	4,7	55,7	106,9

Legenda: /: meritev ni bila opravljena

Prvi trije odvzemi koncentracije rivaroksabana (dan 1) so bili opravljeni 3 ure po prvem odmerku, 12 ur po prvem odmerku in 24 ur po prvem odmerku. Četrти odvzem je bil opravljen ob tretjem odmerku rivaroksabana (dan 3) in sicer 3 h po odmerku. Peti odvzem je bil opravljen ob petem odmerku (dan 5), in sicer 3 ure po odmerku.

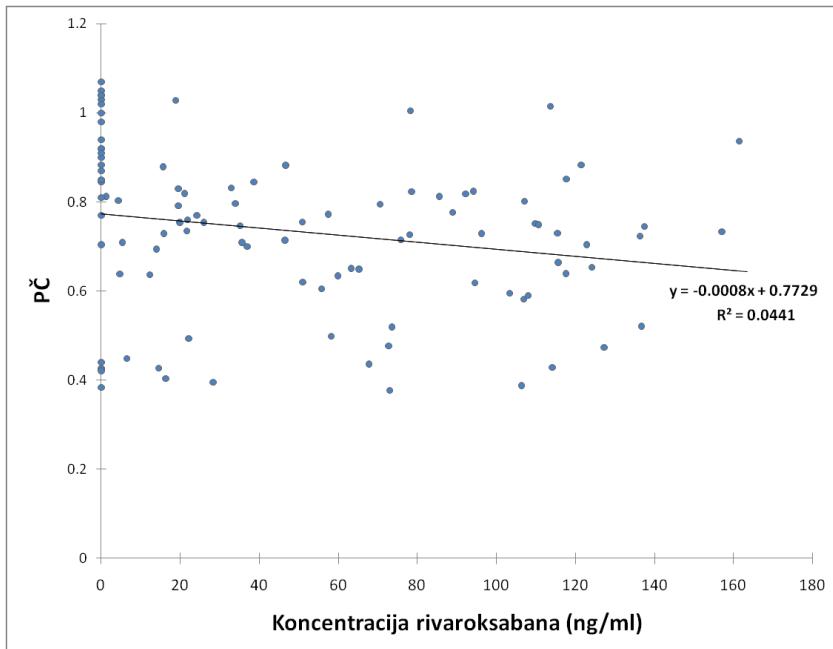
V preglednici 23 so predstavljene povprečne vrednosti koncentracij v treh točkah po prvem odmerku in v času maksimalne koncentracije, ko je že bilo vzpostavljeno stacionarno stanje.

Preglednica 23: Povprečne koncentracije rivaroksabana in standardne deviacije v petih točkah meritev.

Prvi odmerek			Stacionarno stanje
povprečni C _{max}	povprečni C _{12h}	povprečni C _{min}	povprečni C _{max}
52,7 ± 44,5 µg/l	44,7 ± 32,2 µg/l	22,9 ± 21,5 µg/l	94,1 ± 40,0 µg/l

Sočasno smo pri bolnikih izvedli tudi teste koagulacije in sicer PČ in aPTČ, preko katerih smo spremljali farmakodinamski učinek rivaroksabana. Prva meritev je bila opravljena pred operacijo, vse naslednje pa v istih časovnih točkah, kot smo določali plazemske koncentracije rivaroksabana.

Korelacija med PČ in koncentracijo rivaroksabana je pokazala hiter in direkten odziv na zdravljenje z rivaroksabanom.

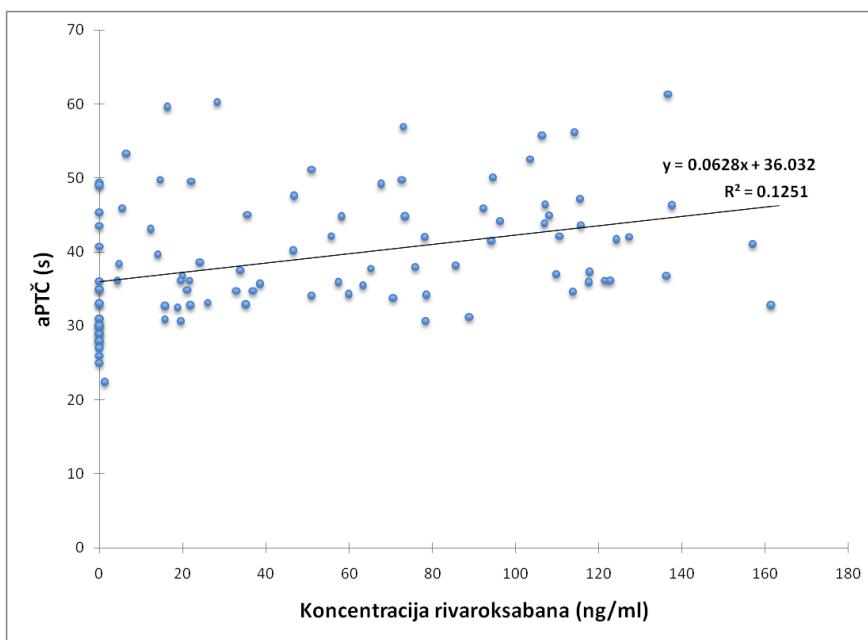


Slika 11: Odvisnost PČ od koncentracije rivaroksabana

Pred operacijo, ko bolniki še niso prejeli rivaroksabana, je povprečen PČ znašal 0,948.

Pri koncentraciji rivaroksabana okoli 100 µg/l je povprečni PČ znašal približno 0,700, kot je razvidno iz slike 11.

Za razliko od PČ, ki je normiran, pa je aPTČ izražen v sekundah, zato se je z višanjem koncentracije rivaroksabana njegov čas podaljševal, kot prikazuje slika 12.



Slika 12: Odvisnost aPTČ od koncentracije rivaroksabana.

4.8.3. Razvoj populacijskega farmakokinetičnega modela

OSNOVNI MODEL

Pridobljene podatke smo vključili v osnovni enoprostorni farmakokinetični model s kinetiko absorpcije 1. reda in ga opisali z očistkom (CL), volumnom porazdelitve (Vd) in konstanto absorpcije (Ka) kot parametri. Parametri izbranega osnovnega modela so prikazani v preglednici 24.

Glede na osnovni model smo ocenili povprečno populacijsko konstanto absorpcije rivaroksabana na $0,215 \text{ h}^{-1}$, pri čemer je variabilnost med posamezniki znašala 224%. Povprečni populacijski očistek (Cl/F) smo ocenili na 5,61 L/h, pri čemer je variabilnost med posamezniki znašala 83,1%.

Preglednica 24: Parametri osnovnega farmakokinetičnega modela

Parameter	Ocenjena vrednost	Relativna standardna napaka (%)
Ka (1/h)	0,215	14,4
Cl/F (L/h)	5,61	12,6
V/F (L)	110	29,4
Interindividualna variabilnost (IV)		
Ka (CV%)	224	15,2
CL(CV%)	83,1	24,8
Rezidualna variabilnost		
Proporcionalna napaka (%)	63,1	16,2

Povprečni populacijski volumen porazdelitve (Vd/F) smo ocenili na 110 L, variabilnosti med posamezniki zaradi majhnega števila bolnikov ni bilo mogoče oceniti, zato smo predpostavili, da imajo vse osebe enak Vd.

Za izračun rezidualne napake smo uporabili proporcionalni model z objektivno vrednostjo funkcije (OFV), ki je znašala 86,136.

VKLJUČEVANJE SOČASNIH SPREMENLJIVK

V osnovni model smo postopoma vključevali sočasne spremenljivke (SO_SPR) v obliki linearne ali pa tudi proporcionalnega modela glede na vrsto spremenljivke:

- Linearni model: $CL = k_1 + k_2 * SO_SPR$
- Potenčni model: $CL = k_1 * (SO_SPR)^{k_2}$

k_1 in k_2 predstavljata konstanti modela. Pri tem nas je zanimalo statistično značilno zmanjšanje OFV. Rezultati so prikazani v preglednici 25.

Z modelom nismo mogli oceniti IIV volumna porazdelitve, zato posledično nismo ocenjevali vpliva sočasnih spremenljiv na V_D .

V osnovnem modelu je bila nepojasnjena variabilnost med posamezniki za očistek 83,1%. Ko smo vključili sočasno spremenljivko, ki je predstavljala spremembo izražanja gena *ABCB1*, se je variabilnost med posamezniki za očistek znižala na 70,9%. To predstavlja 14,7% znižanje nepojasnjene variabilnosti med posamezniki za očistek. Z drugimi besedami, uspelo nam je pojasniti 14,7% začetne variabilnosti med posamezniki za očistek rivaroksabana. Spremenljivko smo vključili v model. Ocenjena vrednost spremenljivke je znašala **0,818** z relativno standardno napako **32,8%**, ob tem se je OFV znižal na **78,810**.

Preglednica 25: Vpliv sočasnih spremenljiv na očistek (CL) in volumen porazdelitve (Vd) rivaroksabana

Sočasne spremenljivke	p (CL)	p (Vd)
Starost – lin	0,122	/
Starost – pot	0,041	/
Izražanje gena <i>ABCB1</i> (<i>GADPH</i>) – lin	0,0074	/
Izražanje gena <i>ABCB1</i> (<i>GADPH</i>) – pot	0,0068	/
GFR – lin	0,014	/
GFR – pot	0,052	/
ITM – lin	0,617	/
ITM – pot	0,638	/
rs1045642- kodominantni model s 3. skupinami	0,907	/
rs1045642- dominantni model	0,781	/
rs1045642- recesivni model	0,682	/
rs4148738- kodominantni model s 3. skupinami	0,432	/
rs4148738- dominantni model	0,209	/
rs4148738- recesivni model	0,434	/
Sočasna terapija z SSRI	0,432	/
Spol	0,125	/
Kajenje	0,681	/

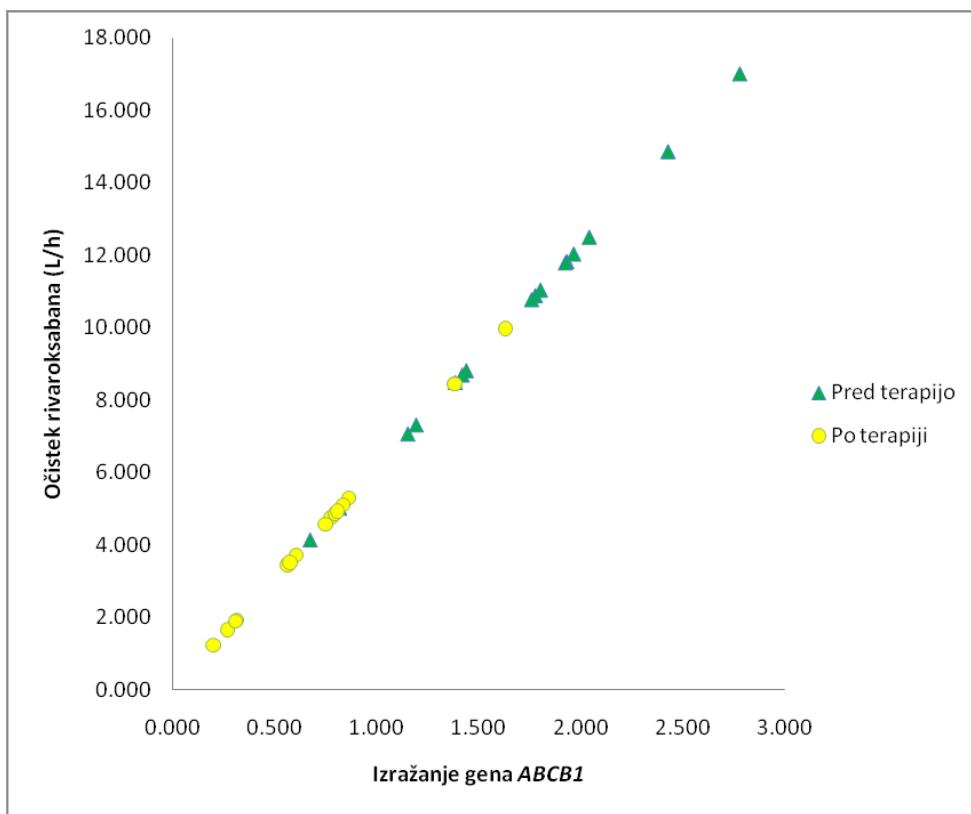
p: verjetnost, CL: očistek; Vd: volumen porazdelitve; SSRI: inhibitorji ponovnega privzema serotoninina; lin – linearni model; pot – potenčni model; GFR=glomerulna filtracija; ITM: indeks telesne mase

Za vključitev spremembe izražanja gena *ABCB1* kot sočasne spremenljivke smo uporabili potenčni model za zvezno spremenljivko. Konkretni končni model za očistek, ki je odvisen od sočasne spremenljivke za posameznega bolnika je naslednji:

$$CL = 6,12 * ((SO_SPR / 1,25) ^ 0,818)$$

Glede na končni model je plazemski očistek rivaroksabana (Cl/F) za osebo, katere sprememba izražanja gena *ABCB1* znaša 1,25, ocenjen na 6,12 L/h.

Na sliki 13 je predstavljena potenčna odvisnost očistka rivaroksabana od izražanja gena *ABCB1*.



Slika 13: Odvisnost očistka rivaroksabana od izražanja gena *ABCB1*

Z večanjem izražanja gena *ABCB1* se zvišuje očistek rivaroksabana. Po 5. dnevni terapiji je prišlo pri večini bolnikov do znižanja izražanja *ABCB1* gena, posledično se je pri njih izločanje rivaroksabana zmanjšalo.

Natančen prikaz odvisnosti očistka rivaroksabana od izražanja gena *ABCB1* za posameznega vključenega bolnika pred in po terapiji prikazuje preglednica 26.

Preglednica 26: Odvisnost očistka rivaroksabana od izražanja gena ABCB1 za posameznega bolnika

Bolnik	Pred terapijo		Po terapiji	
	Izražanje gena ABCB1	Očistek rivaroksabana (L/h)	Izražanje gena ABCB1	Očistek rivaroksabana (L/h)
1	0,818	5,006	0,313	1,917
2	2,428	14,862	0,776	4,752
3	1,439	8,806	0,865	5,291
4	1,153	7,054	0,607	3,715
5	2,780	17,013	1,380	8,448
6	1,932	11,823	0,835	5,111
7	1,803	11,031	1,630	9,976
9	1,925	11,782	1,380	8,448
10	1,778	10,879	0,271	1,657
11	1,419	8,685	0,563	3,443
12	1,966	12,030	0,200	1,221
13	1,385	8,477	0,796	4,869
14	2,042	12,497	0,747	4,574
15	1,193	7,303	0,574	3,515
16	1,759	10,767	0,807	4,937
17	0,674	4,123	0,308	1,884

Bolnik 8 ni vključen, ker izražanje gena 5. dan terapije ni bilo pomerjeno.

5. RAZPRAVA

V prospektivni randomizirani raziskavi 293 bolnikov, pri katerih je bila opravljena kolenska ali kolčna artroplastika, smo proučevali učinkovitost in varnost treh različnih načinov tromboprofilakse. Dodatno smo v skupini 3, ki je ves čas tromboprofilakse prejemala rivaroksaban, proučevali vpliv izbranih polimorfizmov in pripadajočih haplotipov na izide zdravljenja ter varnostni profil tromboprofilakse. Naključno izbranim 17. bolnikom v skupini 3 smo določili farmakokinetični profil rivaroksabana in merili izražanje gena *ABCB1*, katerega substrat je rivaroksaban, pred terapijo in 5. dan terapije. Proučevali smo vpliv demografskih lastnosti bolnikov na farmakokinetične parametre ter na ostale izide, povezane z učinkovitostjo in varnostjo tromboprofilakse. Vključili smo tudi vpliv dveh polimorfizmov, ki bi lahko vplivala na izražanje gena *ABCB1* ter posledično na izide tromboprofilakse z rivaroksabanom.

5.1. UČINKOVITOST IN VARNOST TROMBOPROFILAKSE MED TREMI RAZLIČNIMI REŽIMI ZDRAVLJENJA

V naši raziskavi smo izmed NMH, ki so na tržišču in registrirani za ortopedsko tromboprofilakso, izbrali dalteparin v enotnem odmerku 5000 IE dnevno, s prvim odmerkom 6 ur po operaciji. To je bila namreč najpogosteša izbira, za katero so se odločili zdravniki na oddelku. V vseh kliničnih raziskavah se kot »standard« uporablja enoksaparin, na evropskem področju v odmerku 40 mg enkrat dnevno, na ameriškem področju pa tudi v odmerku 30 mg dvakrat dnevno. Zelo raznolik je tudi čas začetka tromboprofilakse, ki se zelo pogosto začne že predoperativno, najpogosteje 12 ur pred operacijo. Priporočila NICE priporočajo začetek tromboprofilakse 6-12 ur po operaciji, Ameriške smernice pa 12 ur pred operacijo ali 12 ur po operaciji, raje kot 4 ure pred ali po operaciji (14, 65). Ta neenotnost se odraža tudi v raznolikosti načrtovanja kliničnih raziskav, kar nato otežuje njihovo neposredno primerjavo. Optimalen čas začetka tromboprofilakse tako ostaja precej nedorečen. Zagovorniki predoperativne tromboprofilakse poudarjajo prednost boljše tromboprofilakse, kar je bilo zlasti pomembno v času, ko je večina operacij potekala v splošni anesteziji, za katero je znano, da povečuje tveganje za VTE. S povečano uporabo področne anestezije se bo verjetno potreba po predoperativni tromboprofilaksi počasi zmanjševala in raziskovalci se bodo začeli bolj

osredotočati na optimalni čas pooperativne tromboprofilakse, s katerim bodo dosegli dobro zaščito, po drugi strani pa zmanjšali tveganje za krvavitve.

Druga posebnost naše raziskave je bila skupina 2, kjer smo želeli spremljati učinkovitost in varnost prehoda iz NMH na peroralni antikoagulant rivaroksaban ob odpustu iz bolnišnice. Raziskav, ki bi proučevale tak prehod, še ni, čeprav smernice to možnost dopuščajo.

Raziskavo smo razdelili na tri časovna obdobja, v katerih smo spremljali izide zdravljenja. Prvo obdobje je bilo čas hospitalizacije, drugo obdobje je bilo od odpusta do 35. dne po operaciji, ko je bolnik vzel zadnji odmerek tromboprofilaktičnega zdravila in tretje obdobje od 35. dne po operaciji do 90. dne po operaciji. V našem primeru je tako šlo za najdaljše spremjanje bolnikov, če primerjamo raziskave, ki so proučevale rivaroksaban v sklopu ortopedske tromboprofilakse, kjer se je čas spremjanja gibal med 50 do 71 dni po operaciji (21-24, 44, 47).

V raziskavi smo ločeno spremljali pojav suma na VTE in potrjen VTE. Za ta način smo se odločili zato, ker pri bolnikih ni bil opravljen redni Doppler ven spodnjih okončin, ki bi potrdil ali ovrgel prisotnost GVT, ki lahko poteka tudi brez simptomov. Po drugi strani pa so pri vseh bolnikih, kjer so se pokazali klinični znaki za VTE opravili laboratorijsko diagnostične preiskave, ki so diagnozo potrdile ali ovrgle. Takšen način spremjanja bolnikov je smiseln tudi zato, ker pojav kliničnih znakov VTE za seboj potegne dodatne preiskave, dodatne stroške in velikokrat daljšo hospitalizacijo.

V skupini 1 in 2 smo imeli po 10 sumov na VTE, v skupini 3 pa 11 sumov na VTE. V skupini 1 in 3 smo imeli po eno potrjeno PE, v skupini 2 ni bilo nobene potrjene PE. V nobeni skupini ni prišlo do potrjene GVT. Naša raziskava v primerjavi z meta-analizo, ki jo je objavil Ning s sodelavci, ni pokazala superiornosti rivaroksabana v primerjavi z NMH, pri čemer je potrebno poudariti, da gre v našem primeru za drug NMH (45).

Druga omejitev naše raziskave je relativno majhen vzorec bolnikov ob nizki incidenci teh dogodkov. Kljub vsemu pa lahko rečemo, da je incidenca VTE, ki je bila v naši raziskavi v skupini 1 1,3%, v skupini 2 0% in v skupini 3 1,2% primerljiva z objavljenimi raziskavami, kjer se je incidenca ob zdravljenju z rivaroksabanom gibala med 0,2% in 2,7%, ob zdravljenju z enoksaparinom pa med 1,5% in 5,1%. V naši raziskavi je izstopal

režim s prehodom, kjer nismo zasledili nobenega dogodka VTE. Ker primerjavnih študij režima s prehodom ni, naših rezultatov ne moremo primerjati (21-24, 44, 45, 47).

5.2. NEŽELENI UČINKI MED TREMI RAZLIČNIMI REŽIMI ZDRAVLJENJA

V naši raziskavi so imeli vsi trije režimi tromboprofilakse podoben varnostni profil. Nihče od vključenih bolnikov v času spremljanja bolnikov ni umrl ali utrpel kardiovaskularni neželeni učinek.

Spremljali smo številne parametre, s katerimi smo vrednotili pooperativno izgubo krvi. Prvi pomemben dejavnik je tip anestezije. Znano je, da področna anestezija zmanjša izgubo krvi med operacijo in potrebo po transfuziji krvi (8, 9). V naši raziskavi smo imeli visok delež bolnikov (skupina 1/skupina 2/skupina 3: 73,9%/84%/81,9%), ki so bili operirani s področno anestezijo, medtem ko v študijah RECORD 1-4 zasledimo, da je bil ta delež okoli 60% (21-24).

Bolniki so v različnih deležih potrebovali transfuzijo krvi (skupina 1/skupina 2/skupina 3: 40,0%/30,9%/38,6%), ob tem je bila velika večina krvi, predvsem v skupini 2 nadomeščena s krvjo, ki so jo bolniki planirano oddali pred operacijo (predoperativna avtotransfuzija). Delež bolnikov, ki je potreboval transfuzijo krvi, se sklada z raziskavama RECORD 2 in 4, v raziskavah RECORD 1 in 3 pa je bil da delež višji za približno 5-10%. Sicer pa je odločitev za transfuzijo krvi v veliki meri subjektivna klinična ocena operaterja, na katero v veliki meri vpliva medoperativna izguba krvi in izguba krvi preko sukcij. Zato je smiselno ločeno spremljanje klinično skrite velike krvavitve, ki ni na mestu operativne rane in zahteva transfuzijo dveh ali več enot krvi na enkrat. Ta kriterij bi lahko prišтели k velikim krvavitvam, spet po drugi strani pri nekaterih bolnikih ta ukrep verjetno ni bil nujno potreben, ampak je temeljil, kot že rečeno, na individualni odločitvi operaterja. Skupine bolnikov so se v tem kriteriju najbolj razlikovale. Največkrat so dve ali več enot krvi naenkrat potrebovali v skupini 1 (17,5%), sledi ji skupina 3 (14,5%) in skupina 2 (6,2%). Razlika kljub vsemu ni bila statistično pomembna. Zanimiva je primerjava z raziskavami RECORD 1-4, kjer se je odstotek bolnikov, ki je potreboval dve ali več enot

krvi v skupini z rivaroksabanom gibal do največ 0,3%, v skupini z enoksaparinom pa je bil manjši od 0,1%.

Samo en bolnik v skupini 2 je potreboval razbremenilno punkcijo kolena, podatek sovpada z rezultati študij RECORD 3 in 4, ki sta obravnavali artroplastike kolena (21-24).

Največ krvi preko sukcij so izgubljali bolniki v skupini 3, vendar razlika ni bila statistično značilna. Rezultat je skladen z raziskavami RECORD. Bolnikom so kri, izgubljeno preko sukcij, prvih 6 ur po operaciji nadomestili v obliki pooperativne avtotransfuzije. Največ takšne krvi je prejela skupina 3, vendar ne statistično pomembno več kot ostali dve skupini. Podatek, ali so se v kliničnih raziskavah RECORD posluževali metode pooperativne avtotransfuzije ni na voljo (21-24).

V kategorijo klinično pomembnih ne-velikih krvavitev uvrščamo prisotnost hematoma. Leta je bil prisoten v vseh skupinah v približno enakem odstotku (od 12% do 14,8%). Podatka ne moremo primerjati z raziskavami RECORD, ker pojavnosti niso spremeljali.

Spremljali smo tudi prisotnost sekrecije iz operativne rane ali mest, kjer so odstranjeni dreni. Do petega dneva je sekrecija še normalen proces celjenja operativne rane. Po tem obdobju pa že lahko prispeva k pooperativnim zapletom, kot so npr. okužbe. Še posebej nas je zanimalo, kakšna bo sekrecija po petih dneh od operativnega posega, saj je lahko odraz premočne antikoagulantne zaštite pri posamezniku. Do petega dne je bila sekrecija največja v skupini 3, nato pa je bilo več prisotne sekrecije v skupini 1, vendar ne statistično značilno. Tudi tega podatka ne moremo primerjati z raziskavami RECORD.

5.3. VPLIV GENETSKIH DEJAVNIKOV NA UČINKOVITOST IN VARNOST RIVAROKSABANA

Naša raziskava je prva, ki je proučevala vpliv različnih genotipov, alelov in haplotipov dveh polimorfizmov gena *ABCB1* na odziv zdravljenja z rivaroksabanom. Prvi SNP je eden najbolj raziskanih polimorfizmov *ABCB1*, to je 3435 C>T ali rs1045642. Drugi SNP rs4148738, je novejši in prvič omenjen leta 2013 v raziskavi, ki je proučevala vpliv polimorfizmov na peroralni antikoagulant dabigatran (55). Za razliko od rs1045642, gre pri rs4148738 za nekodirajoči polimorfizem, ki so ga v omenjeni raziskavi povezali z vplivom na višje plazemske koncentracije dabigatrana, kar lahko vpliva na varnostni profil tega

antikoagulanta. Ker sta tako dabigatran kot rivaroksaban substrata za *ABCB1* smo se odločili preučiti, ali morda ta povezava velja tudi za rivaroksaban.

Pri stopnji tveganja $\alpha=0,05$ se opažene genotipske frekvence obeh polimorfizmov niso značilno razlikovale od pričakovanih, ki so izračunane iz alelnih frekvenc z upoštevanjem HWE. Genotipske frekvence pri obeh polimorfizmih so tako bile v HWE.

Izračun frekvenc genotipov pri polimorfizmu rs1045642 v naši raziskavi se sklada z frekvencami pri Kavkazijcih v predhodno objavljenih raziskavah, prav tako se frekvenca alela G pri rs4148738 razmeroma sklada z ugotovljeno frekvenco v omenjeni raziskavi z dabigatranom (51, 55).

Protein *ABCB1* se nahaja v številnih celicah in tkivih, njegova lokacija v črevesju, jetrih in ledvicah naj bi bila povezana s farmakokinetiko številnih učinkovin. *ABCB1* ne omejuje le absorpcije učinkovin iz prebavil, ampak vpliva tudi na eliminacijo učinkovin v žolč, urin in celo v blato. Vpliva tudi na porazdelitev zdravil na mesto delovanja. Merjenje izražanja gena *ABCB1* je v najlažje dostopno z odvzemom periferne venske krvi.

Albermann in sodelavci so proučevali povezavo med izražanjem mRNA v humanih mononuklearnih celicah (torej limfocitih) in tankem črevesju ter v limfocitih in jetrih. Ugotovili so, da iz izražanja mRNA v limfocitih ne moremo sklepati na izražanje v tankem črevesju ali v jetrih (66).

Obstajajo pa dokazi, ki nakazujejo, da indukcija z rifampicinom, ki je znan substrat in močan induktor *ABCB1* poveča izražanje mRNA *ABCB1* v limfocitih (67).

Čeprav je osnovno izražanje *ABCB1* za določeno tkivo zagotovo specifična, pa bi se indukcija ali inhibicija v specifičnem tkivu lahko istočasno izrazila v vseh tkivih, kjer se *ABCB1* izraža. Zato smo se v naši raziskavi odločili, da spremljamo zgolj spremembo izražanja *ABCB1* po petih dneh terapije z rivaroksabanom in jo poskusimo povezati z farmakokinetičnimi parametri rivaroksabana.

Albermann in sodelavci so preučevali tudi vpliv dveh polimorfizmov (G2677T in C3435T) na izražanje *ABCB1* v limfocitih, tankem črevesju in jetrih. V nobenem od naštetih tkiv niso odkrili povezave med različnimi genotipi polimorfizmov in izražanjem *ABCB1* (66). Zato se tudi v naši raziskavi, kljub temu da smo proučevali poleg C3435T še polimorfizem rs4148738, nismo odločili za iskanje teh povezav. Dodatni omejujoči dejavnik je bil tudi majhen vzorec bolnikov, da bi dosegli zadostno statistično moč.

V naši raziskavi smo bili osredotočeni predvsem na spremljanje neželenih učinkov, oziroma na vse parametre, ki jih lahko spremljamo v sklopu prekomerne antikoagulantne zaščite in se kažejo v obliki različnih vrst krvavitev. V to so nas usmerili rezultati, ki so jih predstavili Paré in sodelavci, kjer so pri rs4148738 alel G povezali z 12% višjimi maksimalnimi plazemskimi koncentracijami dabigatrana, ki je prav tako substrat proteina ABCB1 (55). Raziskave v povezavi s SNP-jem rs1045642 (3435 C>T) so precej nasprotuječe. V letu 2000 je Hoffmeyer z sodelavci dokazal povezavo med nižjim izražanjem gena *ABCB1* in genotipom 3435TT ob uporabi digoksina, ki je substrat proteina ABCB1. Bolniki z genotipom 3435TT so imeli značilno višje maksimalne plazemske koncentracije digoksina (68). Nadaljnje raziskave niso uspele pokazati istih povezav. Nekatere so dokazale nižjo, nekatere višje izražanje gena *ABCB1*, nekatere pa povezave z genotipom 3435TT sploh niso uspele dokazati (69).

Zaradi samo enega dogodka PE v skupini 3 je bila statistična moč našega vzorca premajhna, da bi lahko prišli do povezav med genotipi, aleli in haplotipi izbranih polimorfizmov ter izidi, povezanimi z učinkovitostjo zdravljenja.

Po petih dneh terapije z rivaroksabanom se je statistično značilno zmanjšalo izražanje gena *ABCB1*. Izražanje gena smo določali pred operacijo in 5. dan po operaciji. Takšen rezultat bi lahko pričakovali, če bi bil rivaroksaban inhibitor proteina ABCB1 na način, da bi povzročil supresijo izražanja *ABCB1* gena, vendar ta lastnost rivaroksabana ni bila dokazana (53,70). Nadalje smo raziskovali, ali bi lahko katero drugo predpisano zdravilo povzročilo tako značilno znižanje izražanja gena *ABCB1*. Bolniki so namreč po operaciji prejemali različne analgetike (piritramid, oksikodon, diklofenak, metamizol in paracetamol), različne ZPČ, posamezniki so na dan operacije prejeli tudi antiemetik ondansetron ali granisetron. Med vsemi omenjenimi zdravili so znani inhibitorji ABCB1 le ZPČ, ki pa delujejo kot kompetitivni inhibitorji ABCB1, ni pa znano, da lahko znižali tudi izražanje gena *ABCB1* (64). Ugotovili smo, da so ZPČ nekoliko zmanjšali izražanje gena, vendar ne v tolikšni meri in ne značilno pomembno v primerjavi z bolniki, ki ZPČ niso prejemali. Omejitev pri iskanju vzrokov za zmanjšanje izražanja v povezavi z uporabo ZPČ je zagotovo majhno število proučevanih bolnikov.

V nadaljevanju smo z asociacijsko analizo proučevali vpliv genotipov na izide zdravljenja. S pomočjo modela recessivnega učinka smo v raziskavi dokazali statistično značilno povezavo med genotipom 3435TT in pojavom hematoma po operaciji ter z vztrajanjem sekrecije iz rane ali mesta, kjer so bili vstavljeni dreni še 5. dan po operaciji v primerjavi z bolniki, ki teh lastnosti niso imeli. Njihova frekvenca genotipa 3435TT je bila značilno nižja. Oba parametra uvrščamo med klinično pomembne ne-velike krvavitve, torej gre za neželena učinka rivaroksabana, ki bi lahko nastala tudi zaradi prekomernega antikoagulantnega učinka rivaroksabana, kar pa bi bilo potrebno dokazati z merjenjem plazemskih koncentracij rivaroksabana. Pojav sekrecije iz rane ali mesta, kjer so bili vstavljeni dreni še 5. dan po operaciji je bil prav tako relativno močno, vendar še neznačilno povezan z višjo pojavnostjo GG genotipa pri polimorfizmu rs4148738 z uporabo modela recessivnega učinka kot v skupini brez te lastnosti. Z modelom dominantnega učinka nismo našli statistično pomembnih povezav genotipov z izidi zdravljenja.

Parametri, s katerimi smo spremljali krvavitev prvih 24 ur po operaciji, niso pokazali statistično pomembnih povezav s frekvencami genotipov obeh polimorfizmov. Ti parametri so bili padec hemoglobina 24 ur po operaciji, izguba krvi preko sukcij in količina nadomeščene krvi v prvih 24. urah. Eden od možnih razlogov bi lahko bil tudi v relativno kratkem času od aplikacije zdravila, ki ga je bolnik dobil približno 6 ur po operaciji, pa do časa, ko so se ti parametri vrednotili.

Nato smo izvedli še alelno asociacijsko analizo, ki je bila izvedena tudi v raziskavi z dabigatranom, kjer so pri polimorfizmu rs4148738 alel G povezali z višjimi (za 12%) maksimalnimi plazemskimi koncentracijami dabigatrana, ki pa se niso izrazile tudi v večji pojavnosti krvavitev (55). V naši raziskavi alela G SNP-ja rs4148738 prav tako nismo povezali s statistično večjo pojavnostjo krvavitev. Smo pa alelno asociacijsko analizo pri polimorfizmu rs1045642 odkrili statistično značilno večjo pojavnost hematoma ob rani ter več sekrecije iz rane ali mesta drenov še 5. dan po operaciji pri nosilcih alela T, kar bi lahko ponovno povezali z večjim antikoagulantnim učinkom rivaroksabana pri teh posameznikih, vendar bi za podkrepitev teh domnev morali spremljati še plazemske koncentracije rivaroksabana.

Dodatno smo želeli preučiti vpliv haplotipov na izide zdravljenja. Ugotovili smo, da imata polimorfizma visoko verjetnost skupnega dedovanja, saj je imel haplotipski blok stopnjo vezavnega neravnovesja (D') večjo od 0,8.

Pregledali smo razlike v frekvenci posameznega haplotipa glede na vse izide, ki smo jih proučevali.

Frekvenca haplotipa CA je bila pri posameznikih s hematomom značilno nižja kot pri posameznikih brez hematoma, prav tako je bila frekvenca istega bloka značilno nižja pri bolnikih s prisotno sekrecijo še 5. dan po operaciji, kot pri tistih brez prisotne sekrecije. Rezultat nakazuje, da imajo bolniki z haplotipom CA manj tveganj, povezanih z različnimi oblikami ne-velikih, vendar klinično pomembnih krvavitev.

Nadalje smo še dokazali, da so imeli posamezniki s prisotnim hematomom pomembno višjo frekvenco haplotipa TA kot tisti posamezniki brez hematoma ob rani, kar ponovno kaže na močan vpliv alela T na zaplete, ki se kažejo s klinično pomembnimi ne-velikimi krvavitvami.

5.4. FARMAKOKINETIČNI MODEL RIVAROKSABANA

V naši raziskavi smo se lotili razvoja populacijskega farmakokinetičnega modela za napovedovanje konstante absorpcije, volumna porazdelitve in plazemskega očistka rivaroksabana.

Plazemske koncentracije smo pridobili od 17. bolnikov v petih različnih točkah. Koncentracije smo določali z validiranim in kalibriranim kromogenim anti-Xa testom Technochrom®. Uporabljan test se zaradi lahke dostopnosti rutinsko uporablja v vsakodnevni klinični praksi. Objavljene študije populacijske farmakokinetike in farmakodinamike so sicer kot metodo določanja koncentracije uporabljale tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemso masno spektrofotometrijo (LC-MS/MS), ki velja zaradi svoje selektivnosti, ponovljivosti in občutljivosti zagotovo za metodo izbora. Vendar pa so nadaljnje raziskave pokazale dobro korelacijo med metodo LC-MS/MS in kromogenimi testi, ki so dostopni na tržišču. Primerjava kromogene metode (reagent Biophen DiXal®) z metodo LC-MS/MS je na primer pokazala dobro linearno korelacijo pri koncentracijah med 5 ng/ml in 485 ng/ml ($r^2=0,95$) z nekoliko slabšo korelacijo le pri koncentracijah, ki so bile nižje od 30 ng/ml. Zavedati se je potrebno, da obstajajo razlike

tudi med dostopnimi kromogenimi testi, prav tako ni mogoče zanemariti razlik med različnimi laboratoriji (71, 72).

Kljub temu, da smo imeli relativno enostaven enoprostorni model, pa so nas omejevalni številni vplivi. Prvi takšen vpliv je bil majhen vzorec bolnikov in malo meritev na posameznega bolnika. Dodatno gre pri tej skupini bolnikov za zelo variabilno farmakokinetiko, predvsem prve tri dni po operaciji, kar je pokazala že objavljena raziskava populacijske farmakokinetike in farmakodinamike na bolnikih po artroplastikah kolka (40).

Kot zelo variabilna se je izkazala predvsem konstanta absorpcije. Našo oceno konstante absorpcije ($K_a=0,215 \text{ h}^{-1}$) lahko primerjamo z ugotovljeno konstanto absorpcije med dnevi 3 in 4 v prej omenjeni raziskavi (34). Zato bi bilo verjetno smiselno opraviti odvzeme krvi tudi drugi, tretji in četrti dan po operaciji v točkah pričakovane maksimalne plazemske koncentracije. Izstopa visoka variabilnost v konstanti absorpcije med posamezniki, ki znaša kar 224%.

Očistek rivaroksabana je primerljiv z ocenjenimi očistki v populacijskih farmakokinetičnih in farmakodinamskih raziskavah pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom, atrijski fibrilaciji, GVT in ortopedski tromboprofilaksi z nekoliko višjo relativno standardno napako, ki pa se najbolj približa prav raziskavi bolnikov pri ortopedski tromboprofilaksi. Variabilnost med posamezniki je v naši raziskavi precej višja (83,1%) kot pri ostalih raziskavah, kjer je znašala med 31,3% do 39,9% (40-43).

Ocena volumna porazdelitve je bila v naši raziskavi prav tako nekoliko višja (110 L) kot v ostalih raziskavah, kjer se je gibal med 54,4 L in 79,7 L. V raziskavi nismo uspeli oceniti interindividualne variabilnosti volumna porazdelitve zaradi premajhne velikosti vzorca, zato smo v nadaljevanju upoštevali, da imajo vsi bolniki enak volumen porazdelitve.

Model ima tudi visoko rezidualno variabilnost, ki znaša 59,6%, ki pa je zelo primerljiva z raziskavo pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom (41). Zaradi visoke rezidualne variabilnosti smo koncentracije pred analizo transformirali v logaritemsko skalo. Sicer so najnižjo rezidualno variabilnost ocenili pri bolnikih z GVT, kjer je znižala 40,7% (42).

V raziskavi smo imeli nekaj meritov koncentracije rivaroksabana, ki so bile 0 µg/L. Vse takšne meritve so bile prvi dan aplikacije rivaroksabana. Dve meritvi sta bili 3 ure po odmerku rivaroksabana in lahko kažeta na zakasnjeno absorpcijo. Ena meritev je bila 24 ur po prvem odmerku, dve meritvi pa sta bili 0 µg/L že 12 ur po prvem odmerku. Meritve lahko kažejo na variabilnost farmakokinetike rivaroksabana ob prvem odmerku v smislu varibilne absorpcije in izločanja. Pri vseh teh meritvah smo uporabili M3 metodo in ocenjevali verjetnost, da je bila z modelom napovedana koncentracija manjša od 1 µg/L. Predpostavili smo, da je limita kvantifikacije metode pri 1 µg/l.

Pri vključevanju sočasnih spremenljivk smo uspeli dokazati sočasen vpliv izražanja gena *ABCB1* na očistek rivaroksabana. Začetna variabilnost med posamezniki za očistek rivaroksabana je znašala 83,1%. Z vključitvijo te spremenljivke nam je uspelo pojasniti 14,7% začetne variabilnosti med posamezniki za očistek rivaroksabana.

Višje kot je bilo izražanje gena *ABCB1* pri posamezniku, večji je bil njegov očistek rivaroksabana in obratno. Protein ABCB1 se med drugim nahaja na apikalni strani proksimalnih tubulov v ledvicah, kjer skrbi za izločanje ksenobiotikov iz krvi v urin. Z večanjem števila ABCB1 prenašalcev se je lahko več rivaroksabana izločilo v urin, kar pomeni večji očistek rivaroksabana. Učinek spremembe izražanja gena *ABCB1* na očistek rivaroksabana, ki se dejansko dogodi v ledvičnih tubulih smo vseeno zaznali, pa čeprav smo izražanje gena določali iz limfocitov. ABCB1 lahko regulira očistek rivaroksabana tudi preko jetrnega očistka. Nahaja se na kanalikularni membrani hepatocitov, kjer prav tako povečuje izločanje rivaroksabana preko jeter.

Le pri enem bolniku po 5. dneh terapije z rivaroksabanom nismo zaznali zmanjšanja izražanja gena *ABCB1*. Pri vseh ostalih se je po 5. dneh zmanjšal tudi očistek rivaroksabana. Rezultati naše raziskave so nasprotni raziskavi populacijske farmakokinetike in farmakodinamike pri bolniki z ortopedsko tromboprofilaksijo, kjer je bil navidezni očistek po 4. dnevnu višji kot 2. dan jemanja rivaroksabana (40).

Očistek kreatinina in starost, kot znani odvisni sočasni spremenljivki na očistek rivaroksabana se v naši raziskavi nista izkazali kot statistično značilni, čeprav so opaženi trendi, ki so biološko smiselnii. Ocenjena verjetnost je bila za obe spremenljivki sicer nižja od 0,05, vendar smo se odločili za bolj konzervativno mejo pri vseh vključenih spremenljivkah, ki je znašala 0,01. Prav tako nismo uspeli dokazati statistično značilne

povezave z indeksom telesne mase in volumnom porazdelitve. Eden od razlogov, da vplivov znanih sočasnih spremenljivk, ki so pomembno vplivale na farmakokinetične parametre v prejšnjih raziskavah nismo uspeli dokazati, najbrž tiči tudi v majhnem vzorcu preiskovanih bolnikov (40-43).

Z uporabo treh modelov izražanja genotipov za oba polimorfizma (dominantni, recessivni in kodominanti model) smo želeli preučiti morebitni vpliv na variabilnost očistka rivaroksabana. Ugotovili smo, da na začetno variabilnost očistka rivaroksabana med posamezniki pomembno ne vplivajo.

6. SKLEPI

V naši raziskavi smo proučevali izide zdravljenja pri treh režimih tromboprofilaktičnega zdravljenja po opravljeni artroplastiki kolka ali kolena. Ugotavljali smo prevalenco polimorfizmov rs4148738 in rs1045642 v genu *ABCB1*, nato pa pri bolnikih v skupini 3, ki so ves čas pooperativne tromboprofilakse prejemali rivaroksaban, pojavnost polimorfizmov povezali z izidi zdravljenja. Na naključno izbranih 17. bolnikih smo razvili populacijski farmakokinetični model rivaroksabana in poskušali parametre modela povezati z izidi zdravljenja, pojavnostjo polimorfizmov ter spremembo izražanja gena *ABCB1*. Pri tem smo potrdili prvo hipotezo, drugo pa le delno.

Hipoteza 1:

Tromboprofilaksa z vsemi tremi režimi zdravljenja je bila enako učinkovita in varna v vseh treh obdobjih spremljanja. Med skupinami ni bilo statistično pomembnih razlik v parametrih, ki smo jih spremljali v povezavi z učinkovitostjo in varnostjo tromboprofilakse.

Hipoteza 2:

Genetski dejavniki, ki smo jih proučevali v naši raziskavi so bili povezani z varnostjo zdravljenja z rivaroksabanom. Vpliv polimorfizmov na farmakokinetični profil rivaroksabana nismo dokazali.

Statistično značilno pogostejojo pojavnost hematoma ob operativni rani ter pogosteje prisotno sekrecijo iz operativne rane ali mesta vstavljenih drenov še 5. pooperativni dan (to sta parametra, ki jih uvrščamo v skupino klinično pomembnih ne-velikih krvavitev) smo odkrili pri bolnikih z genotipom TT SNP-ja rs1045642 z uporabo modela recesivnega učinka ter pri nosilcih alela T SNP-ja rs1045642 z metodo alelne asociacijske analize. Pri analizi haplotipov smo ugotovili značilno nižjo pojavnost obeh omenjenih parametrov pri nosilcih haplotipa CA ter višjo frekvenco haplotipa TA pri bolnikih s prisotnim hematomom. Z razvojem farmakokinetičnega modela rivaroksabana smo dokazali statistično značilno povezavo med očistkom rivaroksabana in spremembo v izražanju gena *ABCB1*, ki se je po 5. dneh zdravljenja z rivaroksabanom statistično pomembno znižala. Z spremembo izražanja gena *ABCB1* smo pojasnili 14,7% variabilnosti očistka rivaroksabana med posamezniki. V raziskavi nismo uspeli dokazati, da je sprememba v izražanju *ABCB1* gena tudi genetsko pogojena, saj mehanizma zmanjšanja izražanja gena nismo uspeli pojasniti.

7. LITERATURA

1. Herman S, Antolič V, Pavlovčič V. Ortopedija. Samozaložba. Ljubljana, 2006: 171-175.
2. Artroza in endoprotetika sklepov. Zbornik predavanj. VI Mariborsko ortopedsko srečanje. Maribor, 2010. 69-79, 81-91 p.
3. Alfonso DT, Toussaint RJ, Alfonso BD, Strauss EJ, Steiger DT, Di Cesare PE. Nonsurgical complications after total hip and knee arthroplasty. *Am J Orthop* (Belle Mead NJ). 2006;35(11):503-10.
4. Dahl OE, Caprini JA, Colwell CW, Frostick SP, Haas S, Hull RD, et al. Fatal vascular outcomes following major orthopedic surgery. *Thromb Haemost*. 2005;93(5):860-6.
5. Ponikvar M, Vene N, Mavri A, Boc A, Fokter S. Preprečevanje venske tromboembolije pri artroplastiki kolka in kolena. *Zdrav Vest*. 2010;79:235-43.
6. Haas S, Lassen M. Venous thromboembolism after elective hip and knee replacement surgery. *EJHPPPractice*. 2010;16(1):17-9.
7. Šabovič M, Kozak M, Žuran I, P B, Mavri A, Vene N, et al. Smernice za odkrivanje in zdravljenje venske tromboze. *Zdrav Vest*. 2005;74:137-42.
8. Optimalno zdravljenje anemije v perioperativnem obdobju in varnost transfuzijskega zdravljenja, zbornik strokovnih prispevkov 8. podiplomskega seminarja Zdravljenje s krvjo, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana, 2007: 43-68.
9. Park JH, Rasouli MR, Mortazavi SM, Tokarski AT, Maltenfort MG, Parvizi J. Predictors of perioperative blood loss in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(19):1777-83.
10. Dahl OE, Quinlan DJ, Bergqvist D, Eikelboom JW. A critical appraisal of bleeding events reported in venous thromboembolism prevention trials of patients undergoing hip and knee arthroplasty. *J Thromb Haemost*. 2010;8(9):1966-75.
11. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on clinical investigation of medicinal products for prevention of venous thromboembolism (VTE) in patients undergoing high VTE-risk surgery. May 2013. www.ema.europa.eu/.../guideline/.../WC500143764.pdf (Dostop 1.2.2015).
12. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost*. 2008;99(5):807-18.
13. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*. 2001;119(1 Suppl):64S-94S.
14. Venous thromboembolism, Reducing the risk. NICE Clinical Guideline 92. 2010.
15. Whang PG, Lieberman JR. Low-molecular-weight heparin. *J Am Acad Orthop Surg*. 2002;10(5):299-302.
16. Kortchinsky T, Vigué B, Samama CM. [Reversal for heparins and new anticoagulant treatments]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2013;32(1):37-49.
17. Rachidi S, Aldin ES, Greenberg C, Sachs B, Streiff M, Zeidan AM. The use of novel oral anticoagulants for thromboprophylaxis after elective major orthopedic surgery. *Expert Rev Hematol*. 2013;6(6):677-95.

18. Bauer KA, Hawkins DW, Peters PC, Petitou M, Herbert JM, van Boeckel CA, et al. Fondaparinux, a synthetic pentasaccharide: the first in a new class of antithrombotic agents - the selective factor Xa inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev.* 2002;20(1):37-52.
19. Tran AH, Lee G. Fondaparinux for prevention of venous thromboembolism in major orthopedic surgery. *Ann Pharmacother.* 2003;37(11):1632-43.
20. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, Xarelto
http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf (dostop 1.5.2016).
21. Eriksson BI, Borris LC, Friedman RJ, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty. *N Engl J Med.* 2008;358(26):2765-75.
22. Kakkar AK, Brenner B, Dahl OE, Eriksson BI, Mouret P, Muntz J, et al. Extended duration rivaroxaban versus short-term enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total hip arthroplasty: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2008;372(9632):31-9.
23. Lassen MR, Ageno W, Borris LC, Lieberman JR, Rosencher N, Bandel TJ, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty. *N Engl J Med.* 2008;358(26):2776-86.
24. Turpie AG, Lassen MR, Davidson BL, Bauer KA, Gent M, Kwong LM, et al. Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after total knee arthroplasty (RECORD4): a randomised trial. *Lancet.* 2009;373(9676):1673-80.
25. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, Eliquis
http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-Product_Information/human/002148/WC500107728.pdf (dostop 1.5.2016).
26. Lassen MR, Raskob GE, Gallus A, Pineo G, Chen D, Portman RJ. Apixaban or enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement. *N Engl J Med.* 2009;361(6):594-604.
27. Lassen MR, Raskob GE, Gallus A, Pineo G, Chen D, Hornick P, et al. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after knee replacement (ADVANCE-2): a randomised double-blind trial. *Lancet.* 2010;375(9717):807-15.
28. Lassen MR, Gallus A, Raskob GE, Pineo G, Chen D, Ramirez LM, et al. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement. *N Engl J Med.* 2010;363(26):2487-98.
29. Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, Pradaxa
http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf (dostop:1.5.2016).
30. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth AA, van Dijk CN, Frostick SP, et al. Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet.* 2007;370(9591):949-56.
31. Eriksson BI, Dahl OE, Huo MH, Kurth AA, Hantel S, Hermansson K, et al. Oral dabigatran versus enoxaparin for thromboprophylaxis after primary total hip arthroplasty (RE-NOVATE II*). A randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Thromb Haemost.* 2011;105(4):721-9.
32. Eriksson BI, Dahl OE, Rosencher N, Kurth AA, van Dijk CN, Frostick SP, et al. Oral dabigatran etexilate vs. subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after total knee replacement: the RE-MODEL randomized trial. *J Thromb Haemost.* 2007;5(11):2178-85.

33. Ginsberg JS, Davidson BL, Comp PC, Francis CW, Friedman RJ, Huo MH, et al. Oral thrombin inhibitor dabigatran etexilate vs North American enoxaparin regimen for prevention of venous thromboembolism after knee arthroplasty surgery. *J Arthroplasty*. 2009;24(1):1-9.
34. Mueck W, Stampfuss J, Kubitz D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(1):1-16.
35. Gulseth MP, Michaud J, Nutescu EA. Rivaroxaban: an oral direct inhibitor of factor Xa. *Am J Health Syst Pharm*. 2008;65(16):1520-9.
36. Kubitz D, Becka M, Voith B, Zuehlsdorf M, Wensing G. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(4):412-21.
37. Kubitz D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehlsdorf M. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939--an oral, direct Factor Xa inhibitor--after multiple dosing in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;61(12):873-80.
38. Siegal DM, Konkle BA. What is the effect of rivaroxaban on routine coagulation tests? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):334-6.
39. Kreutz R. Pharmacodynamic and pharmacokinetic basics of rivaroxaban. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012;26(1):27-32.
40. Mueck W, Borris LC, Dahl OE, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of once- and twice-daily rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing total hip replacement. *Thromb Haemost*. 2008;100(3):453-61.
41. Xu XS, Moore K, Burton P, Stuyckens K, Mueck W, Rossenu S, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with acute coronary syndromes. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74(1):86-97.
42. Mueck W, Lensing AW, Agnelli G, Decousus H, Prandoni P, Misselwitz F. Rivaroxaban: population pharmacokinetic analyses in patients treated for acute deep-vein thrombosis and exposure simulations in patients with atrial fibrillation treated for stroke prevention. *Clin Pharmacokinet*. 2011;50(10):675-86.
43. Girgis IG, Patel MR, Peters GR, Moore KT, Mahaffey KW, Nessel CC, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with non-valvular atrial fibrillation: results from ROCKET AF. *J Clin Pharmacol*. 2014;54(8):917-27.
44. Eriksson BI, Borris LC, Dahl OE, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, et al. A once-daily, oral, direct Factor Xa inhibitor, rivaroxaban (BAY 59-7939), for thromboprophylaxis after total hip replacement. *Circulation*. 2006;114(22):2374-81.
45. Ning GZ, Kan SL, Chen LX, Shangguan L, Feng SQ, Zhou Y. Rivaroxaban for thromboprophylaxis after total hip or knee arthroplasty: a meta-analysis with trial sequential analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*. 2016;6:23726.
46. Mills RM, Berkowitz RD, Damaraju CV, Jennings LK, Wildgoose P. Initiation of rivaroxaban following low molecular weight heparin for thromboprophylaxis after total joint replacement: the Safe, Simple Transitions (SST) study. *Thromb Res*. 2012;130(5):709-15.
47. Zou Y, Tian S, Wang Y, Sun K. Administering aspirin, rivaroxaban and low-molecular-weight heparin to prevent deep venous thrombosis after total knee arthroplasty. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014;25(7):660-4.

48. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. 2003;22(47):7468-85.
49. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(5):860-71.
50. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(11):1391-400.
51. George AM. ABC transporters-40 Years on. Springer 2015; 105-135.
52. Wessler JD, Grip LT, Mendell J, Giugliano RP. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(25):2495-502.
53. Gnoth MJ, Buetehorn U, Muenster U, Schwarz T, Sandmann S. In vitro and in vivo P-glycoprotein transport characteristics of rivaroxaban. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(1):372-80.
54. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54(7):709-35.
55. Paré G, Eriksson N, Lehr T, Connolly S, Eikelboom J, Ezekowitz MD, et al. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding. *Circulation*. 2013;127(13):1404-12.
56. Reaserch Randomizer. <http://www.randomizer.org>. Dostop: 19.3.2012.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
58. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother*. 2004;38(10):1702-6.
59. Beal S, Sheiner L, Boeckmann A, Bauer R. 2009. NONMEM User's Guides. (1989-2009). Ellicott City, MD, USA:Icon Development Solutions; 2009.
60. Wahlby U, Jonsson EN, Karlsson MO. Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *AAPS PharmSci*. 2002;4(4):E27.
61. Bergstrand M, Karlsson MO. Handling data below the limit of quantification in mixed effect models. *AAPS J*. 2009;11(2):371-80.
62. Holford N. 2005. The visual predictive check – superiority to standard diagnostic (Rorchach) plots. [abstr 738]. PAGE 14.
63. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5.
64. Pauli-Magnus C, Rekersbrink S, Klotz U, Fromm MF. Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001;364(6):551-7.
65. Falck-Ytter Y, Francis CW, Johanson NA, Curley C, Dahl OE, Schulman S, et al. Prevention of VTE in orthopedic surgery patients: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e278S-325S.
66. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, et al. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood

- mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(6):949-58.
67. Asghar A, Gorski JC, Haehner-Daniels B, Hall SD. Induction of multidrug resistance-1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rifampin. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(1):20-6.
68. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johne A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3473-8.
69. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(3):152-61.
70. Yuan H, Li X, Wu J, Li J, Qu X, Xu W, et al. Strategies to overcome or circumvent P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Curr Med Chem.* 2008;15(5):470-6.
71. Francart SJ, Hawes EM, Deal AM, Adcock DM, Gosselin R, Jeanneret C, et al. Performance of coagulation tests in patients on therapeutic doses of rivaroxaban. A cross-sectional pharmacodynamic study based on peak and trough plasma levels. *Thromb Haemost.* 2014;111(6):1133-40.
72. Douxfils J, Tamignau A, Chatelain B, Chatelain C, Wallemacq P, Dogné JM, et al. Comparison of calibrated chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban. *Thromb Haemost.* 2013;110(4):723-31.