

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA HORVAT

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA HORVAT

**VPELJAVA PREISKAVE ANTI Xa V 24-URNEM LABORATORIJU,
ZA NAMEN SPREMLJANJA USPEŠNOSTI TERAPIJE BOLNIKOV
NA NIZKOMOLEKULARNEM HEPARINU**

**INTRODUCTION OF ANTI Xa TEST IN A 24-HOUR LABORATORY
FOR MONITORING THE SUCCESS OF THE THERAPY OF
PATIENTS ON LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARIN**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala v 24-urnem laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višjega svetnika in somentorja Enverja Melkića, uni. dipl. ing. zoot., dr. med., spec. med. biokem..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., višjemu svetniku za strokovno svetovanje in razumevanje pri nastajanju diplomskega dela. Hvala somentorju Enverju Melkiću, uni. dipl. ing. zoot., dr. med., spec. med. biokem. za strokovno pomoč v laboratoriju in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Iskrena hvala staršem in bratu za podporo, razumevanje in potrpežljivost. Stricu Pavletu in teti Rozaliji se zahvaljujem, da sta mi v času študija nudila dom. Hvala tudi tebi Goran in tvojima staršema, da ste mi pri nastajanju te diplomske naloge stali ob strani in verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višjega svetnika.

Mateja Horvat

Ljubljana, 2012

Vsebina

SEZNAM SLIK	IV
SEZNAM PREGLEDNIC	IV
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. Hemostaza	1
<i>1.1.1. Primarna hemostaza</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. Sekundarna hemostaza</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3. Fibrinoliza</i>	<i>5</i>
1.2. Heparin	6
<i>1.2.1. Nefrakcionirani heparin</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2. Nizkomolekularni heparin</i>	<i>9</i>
1.3. Zdravljenje s heparini	12
<i>1.3.1. Globoka venska tromboza in pljučna embolija</i>	<i>12</i>
<i>1.3.2. Akutni koronarni sindrom</i>	<i>13</i>
<i>1.3.3. Prilagoditev heparinskega zdravljenja glede na delovanje ledvic</i>	<i>14</i>
1.4. Merjenje koncentracije heparina v plazmi	15
<i>1.4.1. Merjenje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa</i>	<i>15</i>
<i>1.4.2. Merjenja anti-Xa v plazmi</i>	<i>17</i>
1.5. Uvedba nove metode v medicinski laboratorij	19
<i>1.5.1. Ujemanje testne metode s primerjalno metodo</i>	<i>20</i>
2. NAMEN DELA	25
3. EKSPERIMENTALNO DELO	26

3.1. Opis skupine pacientov	26
3.2. Opis zbiranja vzorcev	26
3.3. Metoda določanja aktivnosti heparina proti faktorju Xa v plazmi	27
3.4. Reagenti	27
3.5. Aparature	28
3.6. Kalibracija	30
3.7. Kontrolni vzorci	31
3.8. Validacija metode	31
3.8.1. Meja zaznavnosti	31
3.8.2. Selektivnost oz. specifičnost	32
3.8.3. Natančnost	32
3.8.4. Linearnost	33
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	34
4.1. Rezultati meritev za izračun ujemanja nove metode s primerjalno metodo	34
4.2. Vpliv zamrzovanja plazme na rezultate meritev anti-Xa	41
4.3. Vpliv okvare ledvic na aktivnost anti-Xa v plazmi	46
5. SKLEPI	51
6. LITERATURA	53

Seznam slik

Slika 1: Mehanizem aktivacije in agregacije trombocitov.	3
Slika 2: Koagulacijska kaskada.	5
Slika 3: Fibrinoliza.	6
Slika 4: Kemijska struktura nefrakcioniranega heparina.	7
Slika 5: Vpliv nefrakcioniranega heparina na faktor Xa in IIa.	8
Slika 6: Vpliv nizkomolekularnega heparina na faktor Xa in IIa.	11
Slika 7: Spremljanje dinamike nastajanja fibrinskega strdka pri preiskavi aPTČ na analizatorju BCS XP.	17
Slika 8: Reakcija merjenja aktivnosti heparina proti faktorju Xa.	18
Slika 9: Analizator CS-2100i, proizvajalca SYSMEX.	29
Slika 10: Analizator BCS XP, proizvajalca Dade Behring.	30
Slika 11: Regresijska premica meritev anti-Xa v KOŽB in KIKKB.	36
Slika 12: Regresijska premica meritev anti-Xa v KOŽB iz sveže in zamrznjene plazme.	43

Seznam preglednic

Preglednica I: Pregled nizkomolekularnih heparinov, ki so na trgu v Sloveniji.	10
Preglednica II: Prilagoditev odmerjanja enoksaparina pri hudi ledvični okvari.	14
Preglednica III: Lestvica za korelacijski koeficient.	22
Preglednica IV: Rezultati meritev aktivnosti anti-Xa v KOŽB in KIKKB.	34
Preglednica V: Rezultat izračuna korelacijskega koeficienta med meritvami aktivnosti anti-Xa v KOŽB in KIKKB.	36
Preglednica VI: Rezultati testa normalnosti porazdelitve meritev anti-Xa v KOŽB in KIKKB.	37
Preglednica VII: Rezultati parnega t-testa.	37

Preglednica VIII: Vrednosti anti-Xa, izmerjene iz tako imenovanega pool vzorca plazme, za določanje ponovljivosti metode v seriji.	39
Preglednica IX: Izmerjene koncentracije heparinske kontrole 1 in heparinske kontrole 2.	40
Preglednica X: Meritve anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme v KOŽB.	41
Preglednica XI: Statistično ovrednotenje svežega in zamrznjenega vzorca plazme iz KOŽB.	43
Preglednica XII: Rezultati testa normalnosti porazdelitve aktivnosti anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme.	44
Preglednica XIII: Rezultati parnega t-testa.	45
Preglednica XIV: Meritve koncentracije kreatinina in anti-Xa v serumu ter izračunana ocena glomerulne filtracije zdravih preiskovancev.	46
Preglednica XV: Meritve koncentracije kreatinina in anti-Xa v serumu ter izračunana ocena glomerulne filtracije pacientov z ledvično okvaro.	46
Preglednica XVI: Rezultati testa normalnosti porazdelitve meritev anti-Xa in izračunanega oGFR.	47
Preglednica XVII: Rezultati Mann-Whitneyevega U testa.	48
Preglednica XVIII: Statistične vrednosti oGFR zdravih in bolnih preiskovancev.	49
Preglednica XIX: Rezultati neodvisnega t-testa.	49
Preglednica XX: Statistične vrednosti anti-Xa zdravih in bolnih preiskovancev.	50

Povzetek

Heparin je prvi antikoagulant, ki so ga odkrili leta 1916. Kot nefrakcionirani heparin so ga začeli uporabljati 30 let pozneje. Je kisli mukopolisaharid, ki ga sestavljata D-glukozamin in uronska kislina z različno stopnjo sulfatacije.

Kemijska ali encimska hidroliza heparina vodi do nastanka nizkomolekularnih heparinov. Le-ti so glede na klinične znake vsaj enako učinkoviti kot standardni heparin. Njihova glavna prednost pred nefrakcioniranim heparinom je v predvidljivem antikoagulacijskem učinku, manj stranskimi učinki ter boljšimi farmakokinetičnimi lastnostmi.

Nizkomolekularne heparine uporabljamo v terapevtskih odmerkih za zdravljenje bolnikov z akutno vensko ali arterijsko trombozo, z akutnim koronarnim sindromom in za bolnike iz skupine z zelo velikim tveganjem za tromboembolijo, ki so začasno prekinili zdravljenje s kumarini.

Namen naloge je bil vpeljati preiskavo merjenja anti-Xa v 24-urni laboratorij Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani, zaradi nedostopnosti preiskave 24 ur na dan, ob praznikih in vikendih, ki je nujno potrebna za spremljanje zdravljenja zgoraj navedenih indikacij. Anti-Xa test nam pove aktivnost heparina proti faktorju Xa. Obravnavali smo vzorce 44-ih pacientov. V vzorcu citratne plazme smo izmerili aktivnost anti-Xa. Meritve smo izvedli v laboratoriju Kliničnega oddelka za žilne bolezni, kjer meritve anti-Xa že izvajajo, in v 24-urnem laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani. Z obema analizatorjema smo aktivnost anti-Xa merili z isto kolorimetrično metodo. Iz meritev smo izračunali statistične parametre, ki so potrebni za primerjavo dveh metod v medicinskem laboratoriju, in sicer Pearsonov koeficient korelacije, t-test in koeficient variacije. Ugotavljali smo tudi ali obstajajo razlike med meritvami sveže in zamrznjene plazme ter vpliv delovanja ledvic na aktivnost anti-Xa.

Zaključimo lahko, da izračunan Pearsonov korelacijski koeficient kaže na primerljive rezultate, dobljene z obema analizatorjema. Tudi ponovljivost meritev v seriji je ustrezna. V primeru, da bo meritev med serijami prav tako ustrezna, lahko preiskavo merjenja anti-Xa v 24-urni laboratorij uvedemo za spremljanje terapije bolnikov z nizkomolekularnim heparinom.

Abstract

Heparin is the first anticoagulant, which was discovered in 1916. Unfractionated heparin began to be used 30 years later. It is an acidic mucopolysaccharide, containing D-glucosamine and uronic acid with different levels of sulphitation.

Chemical or enzymatic hydrolysis of heparin leads to the creation of low-molecular-weight heparins. In view of clinical signs, the latter are at least as effective as standard heparin. The main advantages over unfractionated heparin are the predictable anticoagulative effect and fewer side effects, as well as better pharmacokinetic properties.

Low-molecular-weight heparins are used in therapeutic doses for treating patients with acute venous thrombosis or arterial thrombosis, with acute coronary syndrome, and for patients with a very high risk of thromboembolism, who have temporarily suspended coumarine therapy.

The purpose of the thesis was to introduce a test for anti-Xa measurement in the 24-hour laboratory of the Clinical Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry at the University Medical Centre in Ljubljana due to the inaccessibility of the test 24 hours a day, on holidays and weekends, which is necessary for monitoring the treatment of the above-mentioned indications. Samples from 44 patients were analysed. The anti-Xa activity was measured in every sample of citrated plasma. The measurements were conducted in the laboratory of the Department of Vascular Diseases, which already performs anti-Xa measurements, and in the 24-hour laboratory of the Clinical Institute of Clinical Chemistry in Ljubljana. The concentration of anti-Xa was measured on both analysers with the same colorimetric method. From these measurements the parameters that are necessary for comparing two methods in a medical laboratory were calculated, namely the Pearson correlation coefficient, t-test, and the coefficient of variation.

It can be concluded that the calculated Pearson correlation coefficient indicates comparable results obtained with both analysers. The repeatability of measurements in the series is also adequate. Should the measurement between series prove to be as good, the test for anti-Xa measurement can be introduced in the 24-hour laboratory in order to monitor the therapy of patients on low-molecular-weight heparin.

Seznam okrajšav

ADP	adenozindifosfat
AKS	akutni koronarni sindrom
aPTČ	aktivirani parcialni tromboplastinski čas
GP	glikoprotein
GVT	globoka venska tromboza
HIT	s heparinom inducirana trombocitopenija (<i>ang. Heparin-induced thrombocytopenia</i>)
INR	mednarodno umerjeno razmerje (<i>ang. International Normalised Ratio</i>)
KIKKB	Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo
KOŽB	Klinični oddelek za žilne bolezni
NMH	nizkomolekularni heparin
oGFR	ocena glomerulne filtracije
PE	pljučna embolija
TF4	trombocitni faktor 4
TXA ₂	tromboksan A ₂
UKC	Univerzitetni klinični center
VTE	venska tromboembolija
vWF	von Willebrandov faktor

1. Uvod

1.1. Hemostaza

Hemostaza pomeni preprečitev izgube krvi oz. ustavljanje krvavitve. Ta proces poteka med beljakovinami v krvi in žilni steni, med celičnimi elementi krvi in žilno steno (1).

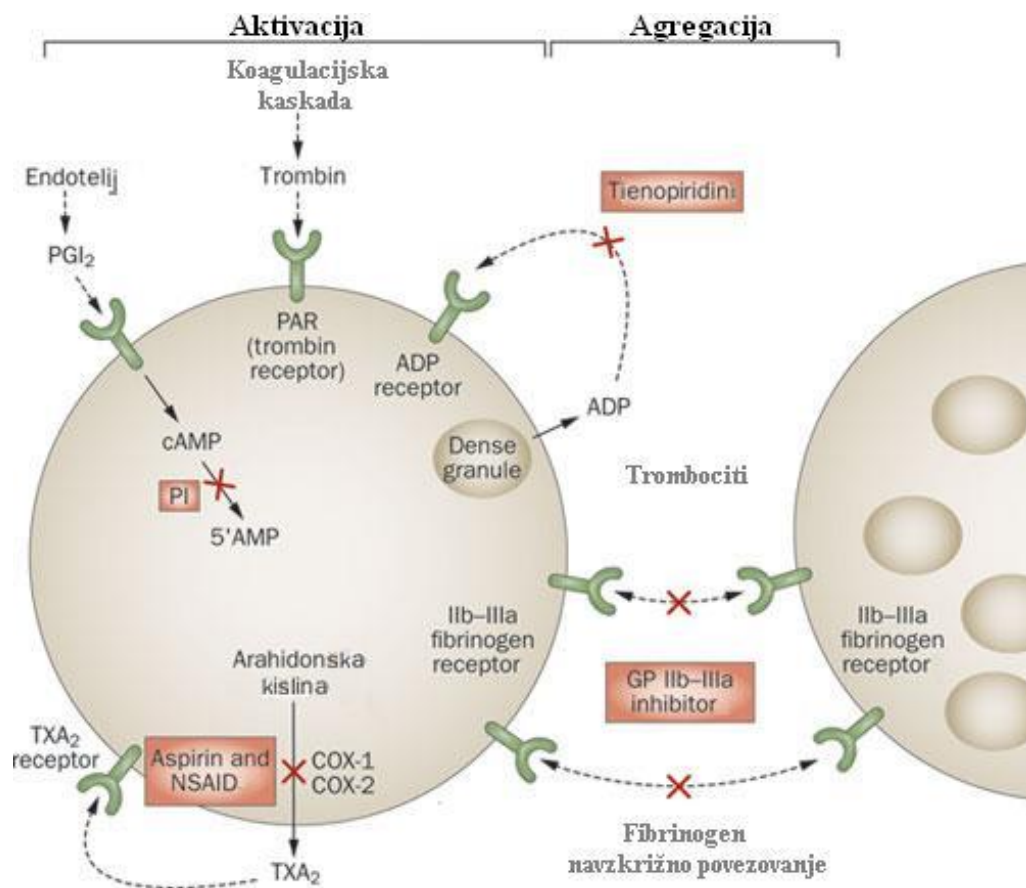
Delimo jo na primarno in sekundarno hemostazo. Oba sistema pa sta med sabo tesno povezana.

1.1.1. Primarna hemostaza

Primarno hemostazo sestavljajo kontrakcija žilne stene, adhezija trombocitov in nastanek primarnega trombocitnega čepa.

Ob poškodbi žilne stene pride do aktivacije simpatičnega dela živčevja in posledične vazokonstrikcije, ki omogoči adhezijo trombocitov na subendotelijski matriks. Pri adheziji gre za povezovanje trombocitov na mesto žilne poškodbe preko trombocitnega membranskega glikoproteina (GP) Ib s von Willebrandovim faktorjem (vWF), ki se veže na kolagen, za povezovanje trombocitnih membranskih GP Ia/IIa (pogosto imenovanega integrin $\alpha 2\beta 1$) in za povezovanje GP VI neposredno s kolagenom. Za nastanek stabilnega, večslojnega agregata, je potrebna aktivacija trombocitov, ki poveča afiniteto trombocitnih membranskih receptorjev GP IIb/IIIa za fibrinogen, preko katerega se aktivirani trombociti navzkrižno povežejo. Trombociti imajo na površini receptorje za agoniste, ki aktivirajo trombocite. To so adrenalin, ADP (adenozindifosfat), trombin, faktor, ki aktivira trombocite (PAF), kolagen in tromboksan A_2 (TXA_2). ADP se izloča iz gostih zrn v trombocitih, trombin pa nastaja v koagulacijski kaskadi iz protrombina.

Kolagen je sestavina večine zunajceličnih komponent vezivnih tkiv, nahaja pa se tudi znotraj nekaterih celic. TXA_2 nastaja iz arahidonske kisline ob sodelovanju encima ciklooksigenaze-1, PAF pa je produkt vnetnih celic (nevtrofilcev, makrofagov, trombocitov). Trombin ali izpostavljenost večjim količinam kolagena, sama po sebi sprožita aktivacijo trombocitov, medtem ko šibki aktivatorji potrebujejo dodatne ojačevalne mehanizme. Pri aktivaciji trombociti spremenijo obliko iz diskoidne v sferično s psevdopodiji in izločijo snovi iz zrnca α (β -tromboglobulin, trombocitni faktor 4, faktor V, fibrinogen, vWF, trombospondin, fibronektin, vitronektin, PAI-1 in rastne faktorje trombocitov) in iz gostih zrnca (ADP, ATP, kalcij, serotonin). Izločanje ADP iz gostih zrnca v trombocitih ter proizvodnja TXA_2 sta najpomembnejša ojačevalna mehanizma. ADP posredno aktivira receptorje GP IIb/IIIa oz. poveča njihovo afiniteto za fibrinogen tako, da se veže na trombocitne receptorje P2Y1 in P2Y12. Vzdraženje P2Y1 je le šibko in za kratek čas pospeši aktivacijo trombocitov, močan odziv pa povzroči vezava ADP na receptor P2Y12, ki preko zmanjšanja znotrajcelične koncentracije cikličnega adenzin monofosfata (cAMP) zavre fosfoprotein. S tem sproži aktivacijo GP IIb/IIIa. TXA_2 se veže na specifične tromboksanske receptorje in prav tako posredno aktivira fibrinogenske receptorje GP IIb/IIIa. Posledica je vezava dveh receptorjev GP IIb/IIIa na dveh sosednjih trombocitih, ki jih poveže molekula fibrinogena med seboj (slika 1). Tako se strdek povečuje (1, 2).



Slika 1: Mehanizem aktivacije in agregacije trombocitov. (Povzeto po viru 3)

Napake v žilni steni, trombocitopenije in motnje funkcije trombocitov vodijo do nastanka motenj v primarni hemostazi. Najpogostejša prirojena motnja funkcije trombocitov je von Willebrandova bolezen, ki jo povzroči odsotnost, pomanjkanje ali motnja v delovanju vWF.

Pridobljene motnje so pogoste in jih lahko razdelimo v tri skupine:

- motnje pri sistemskih boleznih, med katerimi je ledvična odpoved z uremijo in jetrne bolezni,
- motnje pri krvnih boleznih, kot so mieloproliferativne bolezni, monoklonska imunoglobulinemija in mielodisplastični sindrom,

- motnje zaradi učinka različnih zdravil (nesteroidna protivnetna zdravila, nekateri antibiotiki, antiagregacijska zdravila) (4).

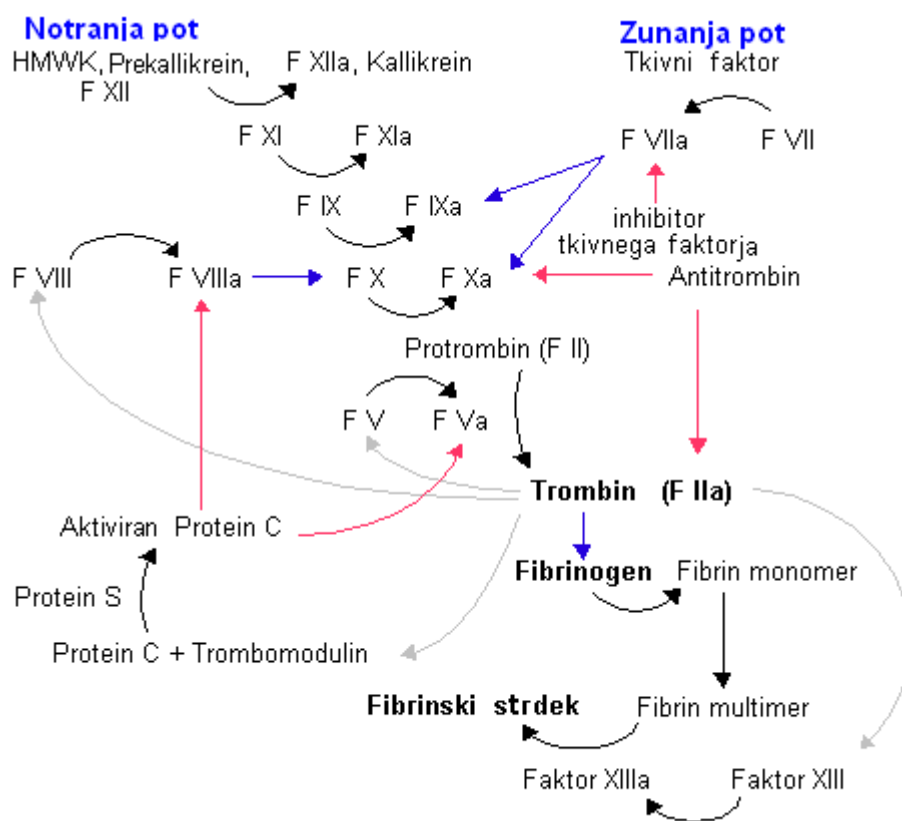
1.1.2. Sekundarna hemostaza

Sekundarna hemostaza oz. tako imenovana koagulacijska kaskada, je sestavljena iz zaporedja encimskih reakcij, ki potekajo na membranski površini aktiviranih trombocitov. Zaključni se z navzkrižno povezanim fibrinom na mestu žilne poškodbe. Fibrinske niti se prepletejo s čepom trombocitov in tako učvrstijo primarni strdek. Zaradi lažjega razumevanja delimo sekundarno hemostazo na notranjo (intrinzično) in zunanjo (ekstrinzično) pot.

Intrinzična pot se prične z aktiviranjem faktorja XII, ki se aktivira z delno proteolizo. Za reakcijo sta potrebna kalikrein in visokomolekularni kininogen (HMWK, angl. High Molecular Weight Kininogen). Faktorji notranje poti, FXII, FXI, FIX in FX, se aktivirajo drug za drugim. FVIIIa skupaj s fosfolipidi in kalcijem pospeši aktivacijo FX v FXa.

Z aktivacijo faktorja VII in tkivnega faktorja se prične zunanja pot hemostaze. Namen zunanje poti je ojačanje intrinzičnega dela in pospešitev koagulacije. FVIIa aktivira FIX in FX. Ob prisotnosti anionskih fosfolipidov, kalcija in kompleksa IXa/VIIIa nastane velika količina FXa.

Oba procesa vodita v aktivacijo FX in s tem se prične skupna pot koagulacije. Faktor Xa skupaj s fosfolipidi, faktorjem Va, kalcijem kot kofaktorjem in trombocitnim faktorjem 3, tvori encimski kompleks, imenovan protrombinaza, ki pretvori protrombin (FII) v trombin (FIIa). Trombin je glavni aktivator koagulacije, saj sodeluje v večini procesov koagulacije in jo lahko pospešuje ali zavira. Trombin pretvarja fibrinogen v fibrin, zato nastaja na mestu žilne poškodbe fibrinski strdek. Netopljivi fibrin, ki je strukturna snov krvnega strdka, se oblikuje iz fibrinskih monomerov s polimerizacijo ob prisotnosti aktiviranega faktorja XIII in kalcija (slika 2). Tako fibrinski strdek pridobi na trdnosti (1,5).



Slika 2: Koagulacijska kaskada. (Povzeto po viru 6)

1.1.3. Fibrinoliza

Fibrinoliza je sistematično in postopno raztapljanje fibrinskih strdkov med celjenjem žilne stene in omejuje njihovo širjenje po tem, ko so že opravili svojo fiziološko vlogo. Hkrati je namen fibrinolize tudi omejitev krvnega strdka, a le na mestu poškodovane žile.

V procesu fibrinolize tkivni aktivator plazminogena (t-PA) ali urokinazni aktivator plazminogena (u-PA) pretvori neaktivni plazminogen v plazmin, ki razgrajuje fibrin (slika 3) (1, 7).



Slika 3: Fibrinoliza. (Povzeto po viru 8)

1.2. Heparin

Prvi antikoagulant heparin je odkril Jay McLean kot študent medicine, in sicer leta 1916. Ker so bila jetra (gr. hepar) med prvimi organi, iz katerih so to snov izolirali, so jo po tem organu poimenovali. Standardni oz. nefrakcionirani heparin so začeli uporabljati približno 30 let pozneje (9).

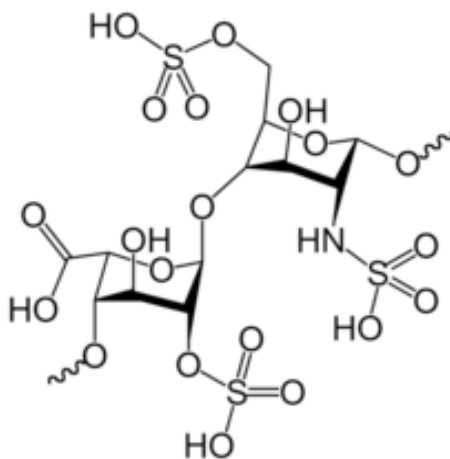
Heparin je kisel mukopolisaharid. Sestavljata ga D-glukozamin in uronska kislina z različno stopnjo sulfatacije. Komercialno dostopni heparin pridobivajo z ekstrakcijo iz govejih pljuč ali mukoze svinjskega črevesa (10).

Heparin uporabljamo za akutno zdravljenje trombotičnih zapletov in v nekaterih primerih, ko zaradi različnih razlogov začasno prekinemo zdravljenje s kumarini. Kumarini so antagonisti vitamina K, ki imajo zelo ozko terapevtsko okno, vendar so edini na voljo v peroralni obliki. Kumarini zavrejo delovanje encima reduktaze vitamina K in tako preprečijo karboksilacijo od vitamina K odvisnih faktorjev koagulacije FII, FVII, FIX in

FX. Nastanejo delno karboksilirani ali dekarboksilirani faktorji koagulacije, ki imajo nepopolni koagulacijski učinek (11).

1.2.1. Nefrakcionirani heparin

Nefrakcionirani heparin je visoko sulfatiran glukozamin z veliko molekulsko maso od 5.000 do 35.000 g/mol in je najbolj kislina v našem organizmu (slika 4) (10).



Slika 4: Kemijska struktura nefrakcioniranega heparina. (Povzeto po viru 12)

Zaradi številnih ioniziranih skupin se heparin ne absorbira iz prebavil, zato ga je potrebno aplicirati intravensko ali subkutano. Po intravenski aplikaciji delovanje nastopi takoj, po subkutani aplikaciji pa po eni uri. Razpolovna doba heparina je odvisna od odmerka zdravila in od načina dajanja, znaša pa 30-150 minut (13).

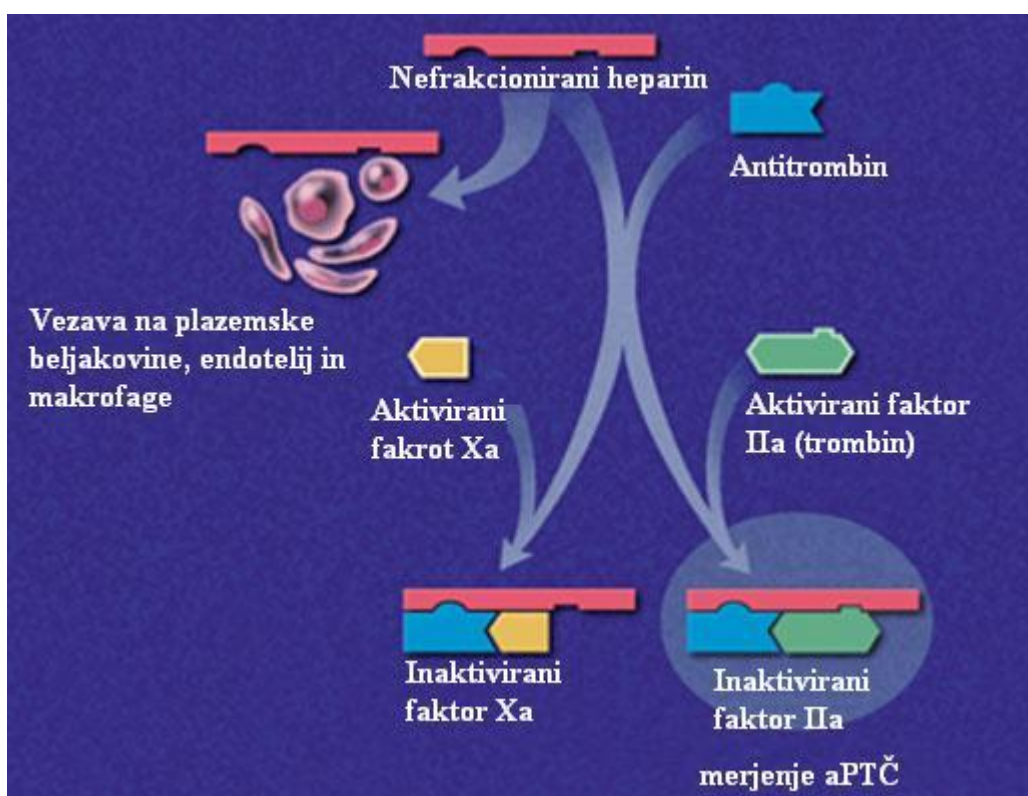
Približno 90% molekul heparina se po vstopu v krvni obtok veže na plazemske beljakovine, endotelijske celice in makrofage, nadaljnja presnova pa poteka v jetrih. Le 10% nefrakcioniranega heparina se izloči preko ledvic.

Pomemben del molekule heparina je sekvenca pentasaharida, ki mu omogoča specifično vezavo na antitrombin. Ta vezava je ključna za antikoagulacijski učinek nefrakcioniranega heparina. Heparin povzroči konformacijsko spremembo molekule antitrombina in

posledično povzroči, da se antitrombin hitreje in trdneje veže na koagulacijske faktorje. Kompleks heparin–antitrombin se z največjo afiniteto veže na faktorja koagulacije IIa (trombin) in Xa, v manjši meri tudi na faktorje IXa, XIa in XIIa (slika 5).

Antikoagulacijski učinek nefrakcioniranega heparina pa ni le posledica inaktivacije z antitrombinom, temveč tudi neposredne vezave na trombin in posledičnega nastanka terciarnega kompleksa heparin-antitrombin-trombin.

Heparin zavira faktor Xa le preko vezave na antitrombin, zato je zaviranje FXa približno 10-krat šibkejše kot afiniteta vezave trombina.



Slika 5: Vpliv nefrakcioniranega heparina na faktor Xa in IIa. (Povzeto po viru 14)

Učinek nefrakcioniranega heparina nadziramo z merjenjem aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (15).

Poleg vpliva na koagulacijo ima heparin še številne druge učinke. Ima sposobnost vezave na trombocite, endotelijske celice, makrofage in plazemske beljakovine. Povzroča

trombocitno agregacijo, poveča propustnost kapilar, zavira proliferacijo gladkih mišičnih celic in podaljša čas krvavitve (12).

Resen stranski učinek je s heparinom povzročena trombocitopenija (HIT, ang. Heparin-induced thrombocytopenia). Gre za imunsko reakcijo na zdravilo heparin ali njemu podobne molekule. Heparin se v krvi veže na trombocitni faktor 4 (TF4), heparin nevtralizirajoči protein. Kompleks heparin-TF4 povzroči nastajanje imunoglobulinov IgG, ki se skupaj s kompleksom heparin-TF4 veže na trombocite. To povzroči aktivacijo in agregacijo trombocitov. Posledica aktivacije trombocitov je nadaljnje pospešeno sproščanje TF4, kar pospeši nastajanje trombina. Celotno dogajanje vodi v trombocitopenijo. HIT nastane po petih ali več dneh zdravljenja s heparinom in poteka asimptomatsko. Posledica je povečana aktivacija trombocitov, njihovo pospešeno odstranjevanje in trombocitopenija. Navadno število trombocitov pade na 50% prvotne vrednosti med petim in desetim dnevom po izpostavitvi heparinu in se po ukinitvi heparina v 4–14 dneh poveča. Ocenjujejo, da HIT nastopi pri 2,4% bolnikov, ki prejemajo terapevtski odmerek heparina, in pri 0,3% bolnikov, ki prejemajo profilaktični odmerek heparina. Pri sumu na HIT se morajo prenehati uporabljati vsi heparini ter heparinsko obdelani katetri. Vsekakor moramo pri sumu na HIT obvezno zamenjati antikoagulacijsko zdravljenje in uporabiti zdravila, ki inhibirajo nastanek trombina, torej neposredne ali posredne zaviralce trombina (15).

Osteoporoza se lahko pojavi ob dolgotrajnem zdravljenju s heparinom. Redki zapleti pa so še: nekroza kože, alopecija, hipersenzitivne reakcije in hipoaldosteronizem (13).

1.2.2. Nizkomolekularni heparin

Kemijska ali encimska hidroliza heparina vodi do nastanka nizkomolekularnih fragmentov z molekularno maso med 4.000 in 5.000 g/mol (16).

Nizkomolekularni heparin (NMH) je glede na klinične znake vsaj enako učinkovit kot standardni heparin. Prednost NMH pred nefrakcioniranim heparinom je predvsem v predvidljivem antikoagulacijskem učinku in v manj stranskih učinkih. Ima boljše farmakokinetične lastnosti, in sicer zaradi manjše sposobnosti vezave na plazemske beljakovine in celice. Zaradi tega se NMH izločajo skoraj izključno preko ledvic. NMH

ima dva do štiri krat daljšo razpolovno dobo kot standardni heparin. Razpolovna doba NMH pa je pomembno podaljšana pri bolnikih z zmanjšanim delovanjem ledvic in pri tistih, ki se zdravijo s hemodializo.

Slabost NMH v primerjavi s standardnim heparinom je v tem, da v primeru predoziranja nimamo antidota, medtem ko lahko učinek nefrakcioniranega heparina hitro zavremo s protamin sulfatom.

NMH se med sabo razlikujejo po molekularni masi, ki vpliva na farmakokinetične in antikoagulacijske lastnosti. Zato posamezni NMH med seboj niso zamenljivi. Običajno odmerjamo NMH glede na telesno težo v enem in le izjemoma v dveh dnevni odmerkih v obliki podkožnih injekcij. Zdravljenje traja praviloma pet do sedem dni. Za dolgotrajno zdravljenje venske tromboze z NMH se odločimo tedaj, ko je zdravljenje s kumarini kontraindicirano (npr. nosečnost) ali neučinkovito (npr. rezistenca na heparin). Pri uporabi NMH so podobni zapleti kot pri nefrakcioniranem heparinu, le da so nekateri med njimi redkejši. Glavni zaplet zdravljenja je krvavitev. Razvoj HITa ob uporabi NMH je redkejši. Tudi pojav osteoporoze naj bi bil med dolgotrajnim zdravljenjem z NMH redkejši kot ob uporabi standardnega heparina (12).

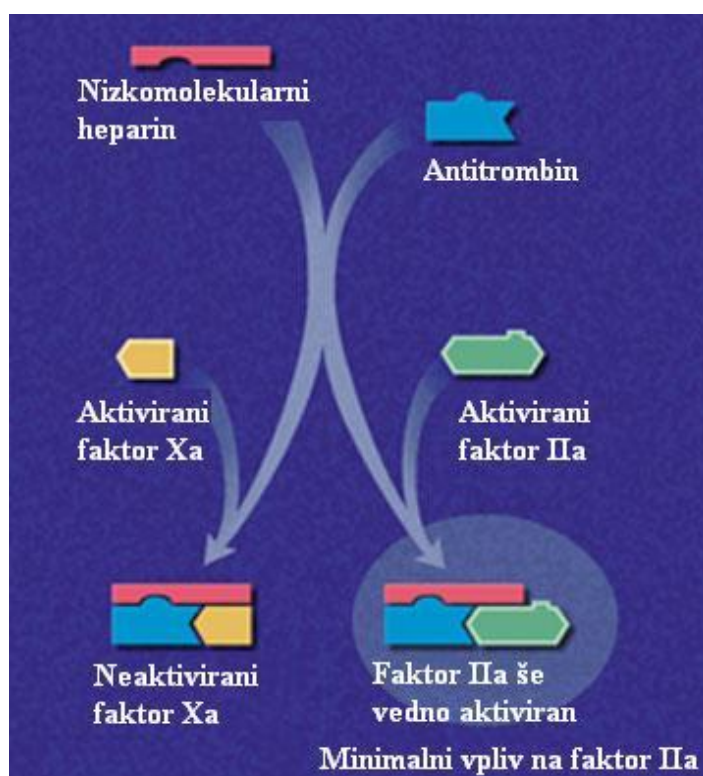
Po anatomsko-terapevtsko-kemični (ATC) klasifikaciji zdravil spadajo NMH med zdravila za zdravljenje bolezni krvi in krvotvornih organov (preglednica I) (17).

Preglednica I: Pregled nizkomolekularnih heparinov, ki so na trgu v Sloveniji.

Ime zdravila	Učinkovina	Farmacevtska oblika	Proizvajalec
Clexane	enoksaparin	raztopina za injiciranje	Sanofi-Aventis S.A, Španija
Clivarine	reviparin	raztopina za injiciranje	Abbott GmbH&Co.KG, Nemčija
Fragmin	dalteparin	raztopina za injiciranje	Pfizer, Belgija
Fraxiparine	nadroparin	raztopina za injiciranje	GSK Pharmaceuticals S.A., Poljska
Zibor	bemiparin	raztopina za injiciranje	LABORATORIOS

			FARMACÉUTICOS ROVI, Španija
--	--	--	--------------------------------

Tudi antikoagulacijski učinek NMH temelji na vezavi molekule heparina z antitrombinom. NMH inhibirajo predvsem FXa, trombin pa le v manjši meri, saj je nastanek terciarnega kompleksa heparin-antitrombin-trombin zaradi kratkih verig NMH otežen (slika 6) (13). Učinek NMH preverjamo z merjenjem aktivnosti anti-Xa. Anti-Xa nam pove učinek NMH na faktor Xa.



Slika 6: Vpliv nizkomolekularnega heparina na faktor Xa in IIa. (Povzeto po viru 15)

1.3. Zdravljenje s heparini

Heparini so zdravila, ki jih zelo pogosto uporabljamo tako pri zdravljenju kot tudi pri preprečevanju trombolitičnih zapletov.

1.3.1. Globoka venska tromboza in pljučna embolija

Globoka venska tromboza (GVT) in pljučna embolija (PE) sta dve manifestaciji iste bolezni. Kadar strdek nastane v globokih venah, ponavadi v venah nog, govorimo o GVT. Venska trombembolija (VTE) nastane, če se del strdka odtrga in potuje po venah, odtrganemu delu strdka pa pravimo embolus. Pogosta posledica VTE je pljučna embolija, pri kateri se embolus zagozdi v pljučnih arterijah.

V primeru, ko je vena zamašena le delno, so lahko simptomi GVT popolnoma odsotni. Simptomi in znaki, ki se pojavijo ob popolni zamašitvi vene so:

- čvrsta oteklina prizadetega uda,
- bolečina,
- temno modrikasto obarvan ud,
- topla koža,
- nabrekanje podkožnih ven.

PE lahko nastopi neopazno, brez izrazitih težav, lahko pa je resna in življenje ogrožajoča. Najpogostejši simptomi so dispneja, bolečina v prsnem košu, kašelj in izkašljevanje krvi. Pojavita se tahipneja in tahikardija.

V akutnih fazah GVT in PE nastanejo velike količine trombina in fibrina. Z visokimi odmerki heparina, z bolus injekcijo, inaktiviramo trombin neposredno. Kadar pa je kaskada strjevanja v normalnem ravnovesju, je možno trombin preko inaktivacije faktorja Xa z manjšimi odmerki heparina indirektno inaktivirati. Z inaktivacijo relativno majhnih količin faktorja Xa indirektno preprečimo nastanek večje količine trombina, kar je osnova za profilakso z NMH po operacijah ali v primerih daljše imobilizacije. Temeljno zdravilo za

nadaljevalno zdravljenje venske tromboze so kumarini, med katerimi najpogosteje uporabljamo varfarin. Zdravljenje z njim začnemo že v prvih 24-ih urah po postavitvi diagnoze. Sočasna terapija traja, dokler ne dosežemo ciljnega terapevtskega območja mednarodnega umerjenega razmerja INR (ang. International Normalised Ratio), ki je običajno med 2.0 in 3.0. INR je razmerje med protrombinskim časom bolnika in srednjim referenčnim protrombinskim časom pri zdravih ljudeh, upoštevajoč občutljivost uporabljenega tromboplastina. Nato NMH ukinemo, zdravljenje z varfarinom pa v odvisnosti na indikacijo in sprožilni dejavnik nadaljujemo še 6 do 12 mesecev. Pri bolnikih z rakom traja začetno zdravljenje z NMH dlje, zdravljenje z varfarinom pa traja pet let (18).

1.3.2. Akutni koronarni sindrom

Akutni koronarni sindrom (AKS) je glavni vzrok za obolevanje in umiranje bolnikov s koronarno boleznijo. AKS je posledica delne in popolne zapore koronarne arterije in njene veje, najpogosteje zaradi erozije ali rupture aterosklerotične lehe in nastanka krvnega strdka na tem mestu. Drugi redkejši vzroki AKS so lahko prirojene anomalije, zloraba kokaina, vnetja, poškodbe in spazem koronarnih arterij.

Skupna značilnost bolnikov z AKS je ishemična srčna bolečina, ki lahko nastopi v mirovanju ali ob najmanjšem telesnem naporu. Bolečina se lahko širi v vrat, levo roko ali zgornji del trebuha. Po aplikaciji nitroglicerina bolečina bistveno ne popusti.

Pojem AKS zajema tri različna klinična stanja: nestabilno angino pektoris, akutni miokardni infarkt z ali brez dviga ST spojnice ter nenadni srčni zastoj. ST spojnica predstavlja interval med valoma S in T na elektrokardiogramu in pomeni periodo, v kateri so ventrikli uniformno vzdraženi. Ko gre za nestabilno angino pektoris in miokardni infarkt brez dviga ST spojnice, bolnike v začetni fazi zdravimo s kombinacijo antiagregacijskih zdravil (acetilsalicilna kislina v kombinaciji s klopidogrelom ali prasugrelom ali tikagrelom), antitrombinskimi (standardni heparin ali NMH) in antiishemičnimi zdravili (kisik, nitrat, zaviralci beta receptorjev). Bolniki dvakrat dnevno podkožno do osem dni prejemaajo odmerek NMH, prilagojen telesni teži in stopnji ledvične

odpovedi. Hkratna uporaba NMH in nefrakcioniranega heparina ali menjavanja med njima zaradi tveganja krvavitve ni priporočljiva. Pri miokardnem infarktu z dvigom spojnice ST se začne zdravljenje s podkožno injekcijo NMH (19, 20).

1.3.3. Prilagoditev heparinskega zdravljenja glede na delovanje ledvic

Ob oslabiljenem delovanju ledvic lahko pride do kopičenja NMH, saj se le-ti izločajo preko ledvic. Zaradi tega moramo pri bolnikih biti posebej previdni pri odmerjanju in odmerke prilagoditi meritvam INR. Pri bolnikih s hudo ledvično odpovedjo in veliko možnostjo krvavitve je priporočljiva uporaba nefrakcioniranega heparina, ki se ne izloča preko ledvic in lahko njegov antikoagulacijski učinek hitro zavremo. V vseh ostalih primerih lahko nefrakcionirani heparin nadomestimo z NMH. Nadroparin je pri hudi ledvični insuficienci kontraindiciran, terapijo z dalteparinom pa je v tem primeru pomembno prilagoditi tako, da se vzdržuje terapevtska aktivnost anti-Xa 1 i.e./mL, merjeno štiri do šest ur po injekciji dalteparina. Če je aktivnosti anti-Xa pod terapevtskim območjem ali nad njim, je potrebno odmerek dalteparina povečati oz. zmanjšati ter merjenje ravni anti-Xa ponoviti po treh do štirih novih odmerkih. Prilagoditev odmerka je potrebno ponavljati, dokler ne dosežemo terapevtske ravni anti-Xa. Odmerjanje enoksaparina je pri hudi ledvični okvari potrebno prilagoditi glede na predpisano shemo (preglednica II) (21).

Preglednica II: Prilagoditev odmerjanja enoksaparina pri hudi ledvični okvari. (18)

Standardno odmerjanje	Huda okvara ledvic
1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) s.c. dvakrat na dan	1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) s.c. enkrat na dan
1,5 mg/kg (150 anti Xa i.e./kg) s.c. enkrat na dan	1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) s.c. enkrat na dan
Za zdravljenje akutnega miokardnega infarkta z dvigom spojnice ST pri bolnikih <	

75 let	
enkrat 30-mg (3.000 anti Xa i.e.) bolus intravensko in obenem odmerek 1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) subkutano, nato 1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) subkutano dvakrat na dan (Največ 100 mg za vsakega od prvih dveh subkutanih odmerkov)	enkrat 30-mg (3.000 anti Xa i.e.) bolus intravensko in obenem odmerek 1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) subkutano, nato 1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) subkutano enkrat na dan (Največ 100 mg za prvi subkutani odmerek)
Za zdravljenje akutnega miokardnega infarkta z dvigom spojnice ST pri bolnikih \geq 75 let	
0,75 mg/kg (75 anti Xa i.e./kg) subkutano dvakrat na dan brez uvodnega bolusa (Največ 75 mg za vsakega od prvih dveh subkutanih odmerkov)	1 mg/kg (100 anti Xa i.e./kg) subkutano enkrat na dan brez uvodnega bolusa (Največ 100 mg za prvi subkutani odmerek)

1.4. Merjenje koncentracije heparina v plazmi

1.4.1. Merjenje aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa

Biološka uporabnost in antikoagulacijski učinek nefrakcioniranega heparina sta nepredvidljiva, zato moramo zdravljenje nadzirati s koagulacijskimi testi. Antikoagulacijski učinek nefrakcioniranega heparina običajno nadziramo z meritvijo aktiviranega parcialnega tromboplastinskega časa (aPTČ) (1).

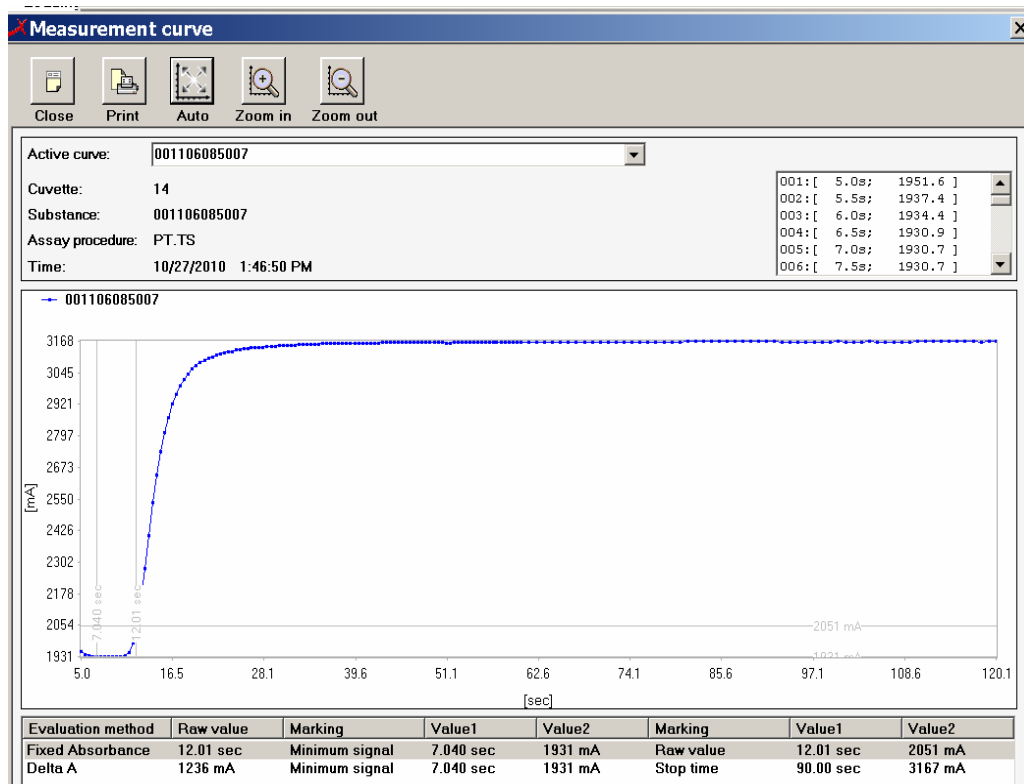
aPTČ je presejalna preiskava, s katero ocenimo notranjo in skupno pot koagulacije. Je občutljiv kazalec zaviralnega učinka heparina na trombin ter na koagulacijska faktorja X in IX. APTČ prvič izmerimo 4-6 ur po začetku zdravljenja, potem pa vsaj 1-krat dnevno. Zdravljenje je uspešno takrat, ko je aPTČ podaljšan za 1,5- do 2,5-kratno normalno

vrednost, kar ustreza koncentraciji serumskega heparina 0,2 do 0,4 i.e./ml. Med zdravljenjem s heparinom, moramo nadzirati še število trombocitov na dva do tri dni (16).

Citratno plazmo preiskovanca inkubiramo z ustrežno količino fosfolipidov (sintetični fosfolipidi, kefalin) in aktivatorjem kontaktne faze (npr. delci silike, celit, elagična kislina). Aktivirata se FXII in FXI. Po dodatku ionov kalcija merimo čas do nastanka strdka. Referenčna vrednost je 26–36 sekund.

Čas do nastanka strdka lahko izmerimo z metodo turbidimetrije ali nefelometrije. Pri turbidimetriji, ki jo uporabljamo v laboratoriju KIKKB (Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo) in KOŽB (Kliničnega oddelka za žilne bolezni), merimo prepustnost svetlobe skozi vzorec, ki pade na detektor, ki je glede na vir svetlobe nameščen pod kotom 0° - detektor je v ravnini s testno cevko. Pri nefelometriji pa merimo intenzivnost razpršene svetlobe vzorca. Detektor je glede na vir svetlobe nameščen pod kotom 90° .

Danes nam nekateri avtomatizirani analizatorji s primerno programsko opremo preko foto-optičnega sistema omogočajo spremljanje dinamike nastajanja fibrinskega strdka in s tem tudi določanje aPTČ (slika 7). Pri tem spremljamo graf odvisnosti absorbance od realnega časa. Absorbanca, ki je odvisna od motnosti vzorca, se povečuje z rastjo fibrinskega strdka. Po določenem času absorbanca doseže plato, kar pomeni, da je prišlo do tvorbe fibrinske mreže (22).



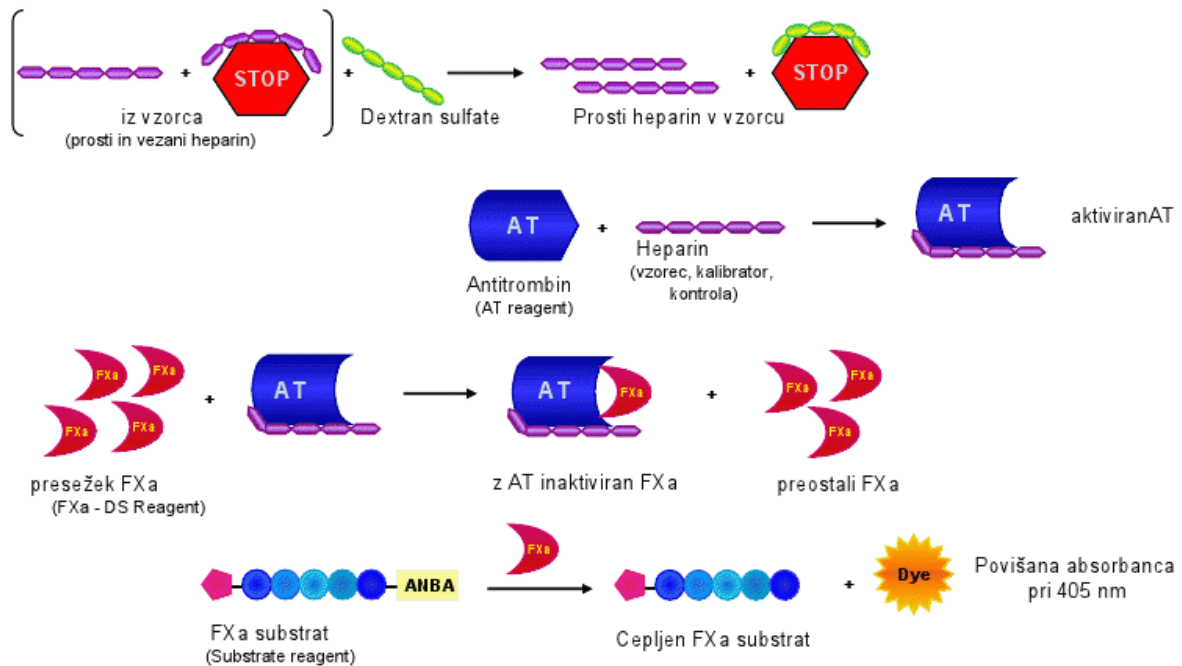
Slika 7: Spremljanje dinamike nastajanja fibrinskega strdka pri preiskavi aPTČ na analizatorju BCS XP.

1.4.2. Merjenja anti-Xa v plazmi

Antikoagulacijski učinek frakcioniranega heparina nadziramo z anti-Xa testom. Anti-Xa test nam pove aktivnosti heparina proti faktorju Xa.

Citratni plazmi dodamo dekastran sulfat, ki sprostí vezan heparin v vzorcu. Po dodatku antitrombina III se tvori kompleks heparin-antitrombin, ki v naslednji stopnji reakcije inaktivira faktor Xa, ki ga dodamo v prebitku. Količino preostalega FXa izmerimo kinetično s kromogenim substratom kot porast absorpcije pri 405 nm (slika 8).

Horvat M.: Vpeljava preiskave anti-Xa v 24-urnem laboratoriju, za namen spremljanja uspešnosti terapije bolnikov na nizkomolekularnem heparinu. Diplomsko delo.



Slika 8: Reakcija merjenja aktivnosti heparina proti faktorju Xa. (23)

Anti-Xa moramo določiti 3 do 4 ure po zadnjem odmerku NMH pri odmerjanju na 12 ur. V tem primeru so ciljne vrednosti 0,6–1,0 i.e./mL. Kadar NMH odmerjamo na 24 ur, moramo anti-Xa določiti 4 do 6 ur po zadnjem odmerku NMH, ciljne vrednosti pa so 1,0–2,0 i.e./mL (16).

1.5. Uvedba nove metode v medicinski laboratorij

Medicinski laboratorij je laboratorij v katerem preiskujemo biološke vzorce vzete iz človeškega telesa z namenom pridobiti podatke za postavitve diagnoze, zdravljenje ali preventivo. Vodenje in izvajanje preiskav sta osnovna procesa v medicinskem laboratoriju. Kakovostne laboratorijske preiskave so pomemben člen pri postavljanju diagnoze in odločitvi za ustrezno terapijo. Zato se morajo laboratoriji ravnati v skladu s Pravilnikom o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine, ki ga je izdalo Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije.

Pravilnik določa, da mora medicinski laboratorij za preiskovanje vzorcev uporabljati le znanstveno preizkušene priznane metode. Laboratoriji so dolžni pred uvedbo nove metode v svojo rutinsko prakso potrditi natančnost in točnost rezultatov ter njihovo ujemanje s staro metodo.

Vse laboratorijske preiskave morajo biti opisane v pisni obliki in vedno na voljo laboratorijskemu osebju. Dokument o preiskavi mora vsebovati:

- namen preiskave,
- način in postopek uporabljene metode,
- varnostne ukrepe,
- vrste preiskovanih vzorcev,
- referenčne in kritične vrednosti,
- potrebno opremo, reagente, testne komplete,
- kontrolne postopke, pogostnost njihovega izvajanja,
- vrednotenje rezultatov,
- način podajanja rezultatov,
- strokovne vire (literaturo).

Vsako uvajanje novih postopkov in njihovih sprememb mora biti dokumentirano in nadzirano in pred uvedbo v rutinsko uporabo odobreno s strani vodja medicinskega laboratorija (24).

1.5.1. Ujemanje testne metode s primerjalno metodo

Pri uvajanju nove metode v laboratorij moramo testno metodo primerjati s primerjalno metodo. Priporočljivo je, da je primerjalna metoda referenčna metoda. Pri merjenju moramo uporabiti najmanj 40 različnih vzorcev bolnikov in izvesti meritve po obeh metodah. Ti vzorci morajo biti izbrani tako, da zavzamejo celotno delovno območje metode. Delovno območje metode je območje koncentracij, znotraj katerega lahko potrdimo, da je metoda linearna, natančna in točna (25).

Glavna prednost velikega števila vzorcev je, da omogočajo prepoznavo interferenc, ki motijo meritve. To pride v poštev predvsem, ko nova metoda temelji na drugačni kemijski reakciji ali ima drugačen princip merjenja. Od 100 do 200 vzorcev je priporočljiva številka, če želimo doseči oceno specifičnosti nove metode.

Običajna praksa je, da naredimo eno meritev z enim vzorcem. Kadar pa je mogoče, naredimo meritve v dvojniku. S tem proučimo odstopanje med dvema setoma rezultatov. Tako preverimo, če so le-ti sprejemljivi. Večje odstopanje od pričakovanega, na primer odstopanje večje od navedene ponovljivosti metode, nakazuje na možne napake v analiznem sistemu. Če meritve nismo izvedli v dvojniku, sta ključnega pomena primerjava rezultatov s povprečjem rezultatov in ponovna meritev tistih vzorcev, pri katerih je ugotovljeno veliko odstopanje.

Vzorci moramo po obeh metodah analizirati v roku dveh ur, razen če je znano, da imajo vzorci krajšo stabilnost, kot npr. amonijak ali laktat. Stabilnost vzorcev je pri nekaterih testih mogoče podaljšati z dodatkom konzervansov ali zamrzovanjem, vendar moramo biti pri tem pozorni na to, da spremenljivke pri ravnanju z vzorcem ne vplivajo na rezultate meritev (25).

Znanstveniki si niso enotni, kakšna je pravilna statistična obdelava rezultatov primerjalne in nove metode. V nadaljevanju bomo na kratko podali smernice statistične obdelave dveh metod.

❖ Grafični prikaz rezultatov meritev

Grafični prikaz pripomore k lažji vizualni predstavitvi podatkov. Na X osi podamo vrednosti primerjalne metode, na Y os pa vrednosti testne metode. Skozi točke na grafu potegnemo linearno črto, tako da je polovica vrednosti nad črto, polovico pa pod njo. Iz takšnega grafa lahko razberemo, pri katerih vzorcih gre za večja odstopanja. Pri vseh večjih odstopanjih moramo meritev ponoviti, s čimer potrdimo, da so odstopanja dejanska in niso posledica napake v zapisu vrednosti.

Na splošno je graf koristen za prikazovanje analitičnega nabora podatkov, linearnosti metode in na splošnem za ugotavljanje razmerja med metodama (25).

❖ Izračunane statistične vrednosti

▪ Linearna regresija

Ko primerjamo dve metodi pri različnih koncentracijah analitov, navadno uporabimo metodo linearne regresije. Na X os regresijskega grafa nanašamo rezultate, ki smo jih dobili z novo metodo, na Y os pa za rezultate, ki smo jih dobili z uporabo primerjalne metode. Naklon regresijske premice in njegova varianca sta matematična parametra linearnosti, medtem ko je odsek na Y osi merilo za morebitno sistematično napako metode (25).

Regresijska premica ima obliko:

$$y' = a \cdot X + b, \quad (\text{Enačba 1})$$

kjer parametra a in b izračunamo po metodi najmanjših kvadratov. Parameter a je naklon regresijske premice, b pa odsek premice na ordinatni osi.

Če vsak vzorec da identični rezultat pri obeh analiznih metodah, bo imela regresijska premica odsek nič ter naklon in korelacijski faktor 1. V praksi se to nikoli ne zgodi, tudi če so sistematske napake popolnoma odsotne. Razlog da dve analizni metodi ne dajeta enakih rezultatov, ki bi se ujemali pri vseh vzorcih, so slučajne napake.

Mogoče je, da bo imela regresijska premica naklon 1, ampak imela bo odsek, ki ne bo nič. To pomeni, da lahko ena metoda analize poda rezultat, ki je višji ali nižji kot ostali. Takšna napaka se lahko pojavi, če je bil signal ozadja pri eni metodi narobe izračunan. Druga možnost je, da je naklon regresijske premice manjši ali večji od 1, kar lahko nakazuje na to, da se sistematska napaka pojavlja samo pri eni metodi merjenja. Nadaljnje možne vrste sistematskih napak se pokažejo tudi, če je grafični prikaz krivulja (25).

- Korelacijski koeficient

Pearsonov korelacijski koeficient r opredeljuje moč povezave med spremenljivkama. Koeficient lahko zavzame vrednosti med -1 in +1, pri čemer njegova negativna vrednost označuje negativno korelacijo, kjer pri porastu ene spremenljivke druga upada, pozitivna vrednost pa pozitivno korelacijo, kjer pri porastu ene spremenljivke narašča tudi druga. Vrednost 0 označuje ničelni vpliv ene spremenljivke na drugo (preglednica III) (25).

Preglednica III: Lestvica za korelacijski koeficient (26).

Absolutna vrednost koeficienta korelacije	Stopnja linearne korelacije
0,0 – 0,3	Ni korelacije
0,3 – 0,5	Nizka korelacija
0,5 – 0,7	Srednja korelacija
0,7 – 0,9	Visoka korelacija
0,9 – 1,0	Zelo visoka korelacija

Na splošno velja, da mora biti r 0,97 ali več, ob vpeljavi nove metode v laboratorij, ko primerjamo primerjalno metodo z novo.

Pearsonov koeficient r izračunamo po enačbi:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}, \quad (\text{Enačba 2})$$

kjer sta x in y dejanski vrednosti dane spremenljivke, \bar{x} in \bar{y} pa vzorčni srednji vrednosti.

- T-test

Najpogostejša uporabljena statistična metoda za preverjanje hipotez pri majhnih vzorcih je t-test. S t-testom lahko preverimo hipotezo, kot je »med izmerjenimi rezultati primerjalne in testne metode obstajajo statistično signifikantne razlike«. T-test predpostavlja normalno porazdelitev obeh vzorcev, kar preverimo s Kolmogorov - Smirnovim testom.

Kolmogorov-Smirnov test primerja empirično porazdelitev s testno porazdelitvijo. Testna statistika je produkt kvadratnega korena velikosti vzorca in največje absolutne razlike med empirično in teoretično komulativno porazdelitvijo. Ko je stopnja značilnosti večja od stopnje tveganja govorimo o normalni porazdelitvi rezultatov.

V primeru, ko imamo normalno porazdelitev rezultatov nadaljujemo s t-testom. Običajno najprej oblikujemo ničelno hipotezo H_0 , ki pravi, da ne obstaja razlika med parametri, ki jih primerjamo. Če pa že obstaja kakšna razlika, le-ta ni statistično značilna in je le slučajna. Alternativna hipoteza H_1 ničelni nasprotuje. V naslednji stopnji določimo stopnjo tveganja α , ki je lahko 0.001, 0.01 in 0.05 ter izračunamo testno statistiko t za odvisna vzorca:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x} - \mu_0|}{s} \cdot \sqrt{N}, \quad (\text{Enačba 3})$$

kjer je \bar{x} in μ_0 povprečje razlik obeh spremenljivk, s standardna deviacija razlik ter N število parov.

Ničelno hipotezo zavrnamo, če je izračunana vrednost $t_{exp} > t_{tab}$, $p < \alpha$ pri $d.f. = N - I$, kjer je $d.f.$ število prostostnih stopenj. T_{tab} je tabelarična t vrednost in jo odčitamo iz statistične tabele za porazdelitev t (25).

2. Namen dela

Rutinske kontrole aktivnosti anti-Xa navadno niso potrebne, vendar lahko kontrole aktivnosti anti-Xa pridejo v poštev pri bolnikih zdravljenih z NMH, ki imajo večje tveganje za krvavitve (npr. bolniki z okvaro ledvic, starejši bolniki ali bolniki s skrajnostmi telesne mase), bolniki z aktivno krvavitvijo ter nosečnicah.

Namen diplomske naloge je vpeljati preiskavo merjenja aktivnosti heparina proti faktorju Xa v 24-urni laboratorij, saj je zaradi zgoraj navedenih indikacij v kliniki nujna 24-urna dostopnost preiskave.

Preiskavo bomo vpeljali s primerjavo rezultatov meritev anti-Xa iz laboratorija KOŽB s 24-urnim laboratorijem KIKKB v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani (UKC). Tako bomo vzporedno primerjali rezultate, dobljene na dveh različnih lokacijah, na različnih analizatorjih, vzorci krvi in metoda pa bodo isti. Aktivnost anti-Xa v plazmi v KOŽB bomo merili na analizatorju CS-2100i proizvajalca SYSMEX. V KIKKB pa bomo uporabili analizator BCS XP proizvajalca DADE BEHRING. Z obema analizatorjema bomo aktivnost heparina proti faktorju Xa merili z isto kolorimetrično metodo.

Iz dobljenih rezultatov meritev bomo izračunali Pearsonov korelacijski koeficient, t-test in ponovljivost v seriji in podali oceno o ujemanju oz. neujemanju meritev na obeh analizatorjih. Ugotavljali smo tudi vpliv zamrzovanja plazme na rezultate meritev ter vpliv delovanja ledvic na aktivnost anti-Xa.

3. Eksperimentalno delo

3.1. Opis skupine pacientov

V raziskavo smo vključili 44 vzorcev plazme. Vzorci so bili iz več virov: od bolnikov, hospitaliziranih na KOŽB in drugih oddelkih UKC, ali onkološkega inštituta ter nosečnic, ki morajo v času nosečnosti prejemati preventivne odmerke NMH. Preiskovano skupino je sestavljajo 13 moških (30%) in 31 žensk (70%).

3.2. Opis zbiranja vzorcev

Kri je bila odvzeta v 4,5mL in 1,8mL epruvete s 3,2 % Na-citratom kot antikoagulantnim sredstvom. Celice smo od plazme ločili s 30 minutnim centrifugiranjem s 3200 obrati (2000g) pri 4°C. Preiskave v KOŽB smo opravili iz sveže in zamrznjene plazme, v KIKB pa smo uporabili samo zamrznjeno plazmo. Vzorce plazme smo zamrznili in jih hranili pri -20°C. Stabilnost vzorcev pri tej temperaturi je največ 30 dni. Pred uporabo smo vzorce odtalili.

3.3. Metoda določanja aktivnosti heparina proti faktorju Xa v plazmi

Z anti-Xa testom merimo aktivnost heparina proti faktorju Xa. Rezultate podamo v i.e./mL (mednarodnih enot na mililiter).

Anti-Xa merimo s kolorimetrično metodo, katere princip merjenja temelji na specifični kemični reakciji. Produkt reakcije ima značilno rumeno barvo. Intenziteto barve izmerimo pri predpisani valovni dolžini.

Dekstran sulfat sprosti vezani heparin v vzorcu in hkrati eliminira različne interference. Po dodatku antitrombina III se tvori kompleks heparin-antitrombin, ki v naslednji stopnji reakcije inaktivira faktor Xa, ki ga damo v prebitku. Produkt reakcije ima značilno rumeno barvo. Intenziteto barve izmerimo pri predpisani valovni dolžini. Količino preostalega FXa izmerimo kinetično s kromogenim substratom kot porast absorpcije pri 405 nm.

3.4. Reagenti

Za merjenje anti-Xa smo uporabili tovarniško pripravljene reagente proizvajalce Dade Behring, Nemčija, in sicer:

- Faktor Xa reagent: liofiliziran, frakcija humane plazme z dodatkom Tris, natrijevega klorida in EDTA. Konzervans: natrijev azid (< 1 g/L)
- Dekstran sulfat reagent: liofiliziran
- Antitrombin reagent: liofiliziran, 1 i.e./mL
- Substrat reagent: liofiliziran, 4 mmol/L Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-methyl amid

- LMW heparin kalibrator: liofiliziran, vsebuje nizko molekularni heparin ($\leq 1,5$ i.e./ml) in humano plazmo
- Heparinska kontrola 1 in 2: liofilizirana, vsebujeta NMH iz črevesne sluznice prašiča ($\leq 0,5$ i.e./ml) in humano plazme
- Standard humana plazma

Dekstran sulfat reagent smo pred uporabo raztopili v 10 ml destilirane vode. To raztopino smo dodali faktorju Xa, narahlo premešali in pustili stati vsaj 15 minut. Antitrombin reagent smo raztopili z 1ml, substrat reagent pa z 2 mL destilirane vode. Preden smo reagente vstavili v analizator, smo jih narahlo premešali, pri čemer smo pazili, da se reagenti niso spenili. Morebitne mehurčke smo odstranili.

Po navodilih proizvajalca so reagenti obstojni dva tedna, hranjeni v originalni embalaži pri temperaturi +2 do +8°C. Pri temperaturi nižji od -20°C so obstojni 2 meseca. Pred uporabo reagente segrevamo 10 minut na 37°C. Odmrznjene reagente ne smemo ponovno zamrzniti (10).

V KOŽB in 24-urnem laboratoriju smo uporabili enake reagente.

3.5. Aparature

- ❖ Za merjenje aktivnosti anti-Xa v KOŽB smo uporabili analizator CS-2100i, proizvajalca SYSMEX, Japonska (slika 9).



Slika 9: Analizator CS-2100i, proizvajalca SYSMEX. (27)

Pred začetkom analize je bilo potrebno pripraviti instrument, reagente in vzorce. Pripravljene reagente, kontrole, standarde in vzorce smo vstavili v posebna stojala v analizatorju. Analizator je preko čitalca črtnih kod prepoznal reagente in vzorce. Vstavili smo tudi prazne kivete, ki jih je sistem potreboval za redčenje vzorcev in dodajanje reagentov. Pipetor je vsrkal določen volumen plazme, jo prenesel v merilno celico, drugi pipetor pa je dodal reagent. Ko je inkubacija potekla, se je začelo kolorimetrično merjenje. Nastali produkt je rumeno obarvan kromofor, izmerjena absorbanca pa je obratno sorazmerna s koncentracijo heparina v vzorcu.

- ❖ Za merjenje aktivnosti heparina proti faktorju Xa smo v 24-urnem laboratoriju uporabili analizator BCS XP proizvajalca Dade Behring, Nemčija (slika 10).



Slika 10: Analizator BCS XP, proizvajalca Dade Behring. (28)

Vzorci plazme smo vstavili v eno od pozicij za nosilce. Na računalniku smo izbrali želeno analizo, v našem primeru meritev aktivnosti anti-Xa in analizator je pričel z delom. Pipetorska roka je določeno količino kontrol, standardov in reagentov transportirala v merilne rotorje, sestavljenih iz reakcijskih kivet. V kivetah je potekla reakcija, nato pa se je po končani inkubaciji izmeril analit na mestu za merjenje. Koncentracijo anti-Xa v vzorcu smo izmerili s kolorimetrično metodo.

3.6. Kalibracija

Kalibracijski material je material za umerjanje instrumentov ali analitičnega postopka. Kalibracijo izvedemo z referenčnimi kalibratorji pred začetkom dela in po potrebi med delom v skladu z navodili proizvajalca. Kalibratorji imajo točne vrednosti, ki jih lahko smatramo za pravo vrednost in jih uporabljamo za določevanje pravilnosti oziroma točnosti metod. Pravilnost označenih vrednosti je ponavadi definirana z večkratnimi meritvami z referenčno metodologijo, ki je slabše ponovljiva kot avtomatizirane metode, ki so v klinični uporabi (29).

Kalibrator smo pripravili tako, da smo komercialno pripravljenemu LMW kalibratorju dodali 1 mL destilirane vode. Previdno smo premešali, tako da se niso tvorili mehurčki. Tako pripravljen kalibrator smo pri sobni temperaturi pustili stati najmanj 30 minut. Pred uporabo smo ga ponovno rahlo premešali in ga postavili v nehlajeni del analizatorja. Zraven kalibratorja smo dali še standard humane plazme, na računalniku izbrali funkcijo kalibracija in analizator je pričel s kalibriranjem.

3.7. Kontrolni vzorci

Kontrolne vzorce uporabljamo za preverjanje analitičnega postopka ali instrumenta po umeritvi s kalibracijskim vzorcem.

Kakovost reagentov smo preverjali s tovarniško pripravljenimi kontrolami – heparin kontrola 1 in 2, in sicer eno v referenčnem območju 0,3–0,5 i.e./mL ter drugo v referenčnem intervalu 0,8–1,0 i.e./mL . Kontrolni, ki sta bili v liofiliziranem stanju, smo najprej razredčili z 1mL destilirane vode. Previdno smo premešali, tako da se niso tvorili mehurčki. Pri sobni temperaturi smo ju pustili stati najmanj 30 minut. Pred uporabo smo ju ponovno rahlo premešali

3.8. Validacija metode

3.8.1. Meja zaznavnosti

Meja zaznavnosti je najnižja koncentracija analita, ki jo lahko z našo metodo zaznamo, ni pa nujno, da jo kvantitativno določimo.

Meja zaznavnosti za heparine je 0,05 i.e./mL (30).

3.8.2. Selektivnost oz. specifičnost

Selektivnost oz. specifičnost metode je sposobnost metode, da nedvoumno loči posamezen analit v prisotnosti drugih komponent v vzorcu.

Študije za nadzorovanje motečih snovi so pokazale, da na samo metodo ne vplivajo nobene interference (30).

3.8.3. Natančnost

Natančnost nekega postopka nam pove, kako se ponavljajo rezultati, ki smo jih dobili na povsem enak način. Prikazuje nam sipanje oz. ponovljivost rezultatov. S koeficientom variacije (CV), ki je statistični kazalec in prikazuje razpršitev statističnih enot okoli aritmetične sredine njihove statistične populacije, lahko primerjamo natančnost posameznih analiznih metod in natančnost dela med posameznimi laboratoriji. Večji kot je CV, večja je variabilnost preučevane spremenljivke.

Natančnost oz. ponovljivost znotraj serije smo določili z meritvami tako imanovanega pool vzorca, z dvajsetkratnimi ponovitvami testiranja anti-Xa. Pool vzorec je vzorec, sestavljen iz več različnih vzorcev plazme združenih skupaj. Združili smo prvih 30 vzorcev plazme in na ta način s CV ocenili ponovljivost v seriji.

Za določanje ponovljivost med serijami smo imeli premalo plazme. Zato smo za oceno ponovljivosti med serijami izmerili koncentracijo kontrole 1 in 2 v obeh serijah z dvakratno ponovljivostjo in z rezultatom CV kontrol ocenili natančnost med serijami.

3.8.4. Linearnost

Linearnost je opredeljena kot sposobnost metode, da v danem območju dobi sprejemljivo linearno korelacijo med rezultati in koncentracijo merjene snovi v vzorcih. Kot rezultat lahko podamo koeficient variacije.

Koeficient variacije v seriji meritev lahko znaša do 5%, med serijami meritev pa do 7,1% (25).

4. Rezultati in razprava

Z vsakim analizatorjem smo izmerili aktivnost heparina proti faktorju Xa v plazmi 44-ih pacientov. 31 pacientom smo zraven aktivnosti anti-Xa izmerili še koncentracijo kreatinina v serumu in izračunalni oceno glomerulne filtracije (oGFR) kreatinina. OGFR smo nato primerjali z vrednostmi anti-Xa. Paciente smo razdelili v dve skupini, in sicer tiste z oGFR ≥ 65 mL/min v skupino zdravi, ter z oGFR < 65 mL/min v skupino bolni.

Meritve smo statistično ovrednotili. Statistično vrednotenje dobljenih rezultatov smo opravili s statističnim programom SPSS in Windows Excel.

4.1. Rezultati meritev za izračun ujemanja nove metode s primerjalno metodo

Meritve smo naredili v dvojniku, in sicer je bila prva meritev v laboratoriju KOŽB narejena iz svežega vzorca, ostale meritve pa iz zamrznjene plazme (preglednica IV).

Preglednica IV: Rezultati meritev aktivnosti anti-Xa v KOŽB in KIKKB.

Št.	1. meritev anti-Xa v KOŽB (i.e./mL)	2. meritev anti-Xa v KOŽB (i.e./mL)	Povprečje meritev anti-Xa v KOŽB (i.e./mL)	1. meritev anti-Xa v KIKKB (i.e./mL)	2. meritev anti-Xa v KIKKB (i.e./mL)	Povprečje meritev anti-Xa v KIKKB (i.e./mL)
1	0,64	0,66	0,65	0,82	0,78	0,80
2	0,91	1,00	0,96	1,05	0,97	1,01
3	0,75	0,76	0,76	0,70	0,69	0,70
4	1,13	1,13	1,13	1,18	1,14	1,16
5	0,73	0,75	0,74	0,75	0,74	0,75
6	0,45	0,36	0,41	0,44	0,43	0,44

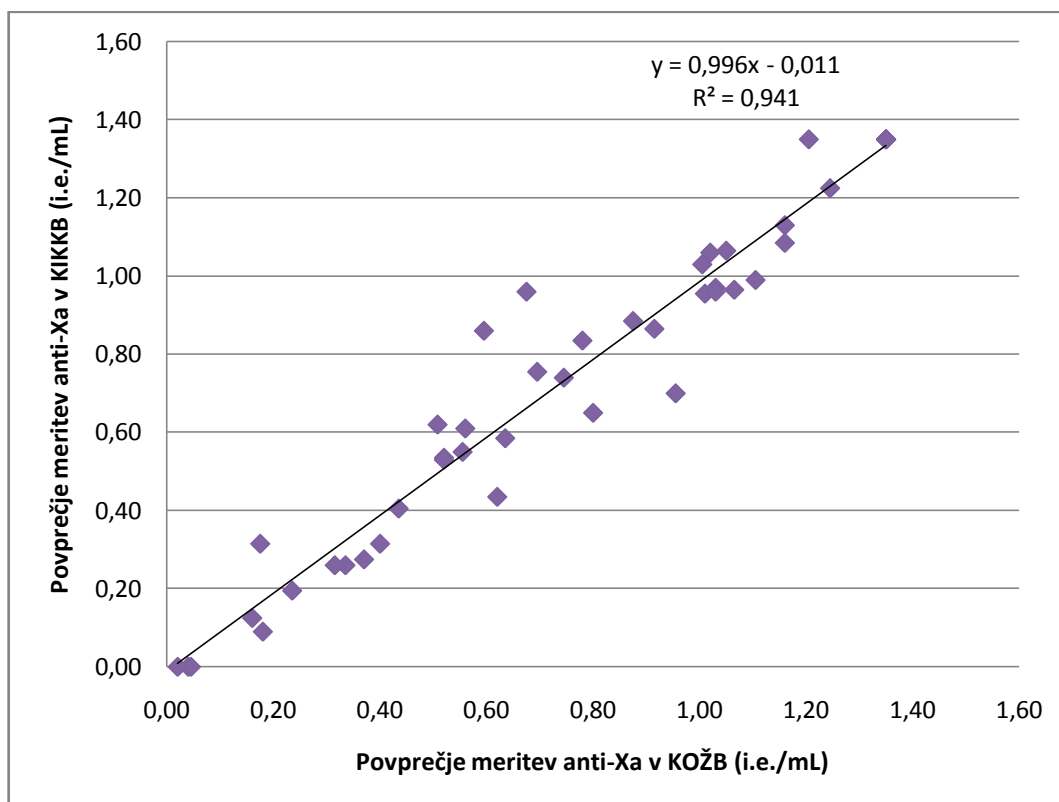
7	0,10	0,15	0,13	0,17	0,15	0,16
8	0,30	0,33	0,32	0,41	0,39	0,40
9	0,55	0,55	0,55	0,57	0,54	0,56
10	0,84	1,08	0,96	0,72	0,63	0,68
11	0,00	0,00	0,00	0,05	0,03	0,04
12	0,34	0,29	0,32	0,18	0,17	0,18
13	0,00	0,00	0,00	0,04	0,05	0,05
14	0,23	0,29	0,26	0,34	0,33	0,34
15	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
16	0,25	0,27	0,26	0,32	0,31	0,32
17	1,09	1,04	1,07	1,07	1,03	1,05
18	0,93	1,01	0,97	1,06	1,00	1,03
19	0,86	0,81	0,84	0,79	0,77	0,78
20	1,12	1,05	1,09	1,18	1,14	1,16
21	0,94	0,98	0,96	1,05	1,01	1,03
22	1,03	1,09	1,06	1,04	1,00	1,02
23	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,02
24	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
25	0,88	0,89	0,89	0,90	0,85	0,88
26	0,53	0,54	0,54	0,53	0,51	0,52
27	0,58	0,59	0,59	0,66	0,61	0,64
28	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
29	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35	1,35
30	0,89	0,84	0,87	0,94	0,89	0,92
31	1,28	1,17	1,23	1,21	1,28	1,25
32	0,04	0,14	0,09	0,17	0,19	0,18
33	0,36	0,51	0,44	0,57	0,67	0,62
34	0,26	0,29	0,28	0,36	0,38	0,37
35	0,98	1,00	0,99	1,11	1,10	1,11
36	0,57	0,83	0,70	0,96	0,95	0,96
37	0,97	0,96	0,97	0,98	1,15	1,07
38	0,97	1,09	1,03	0,86	1,15	1,01
39	0,50	0,56	0,53	0,42	0,62	0,52
40	0,12	0,27	0,20	0,10	0,37	0,24
41	0,57	0,67	0,62	0,50	0,52	0,51
42	0,88	0,84	0,86	0,59	0,60	0,60
43	1,27	1,43	1,35	1,21	1,20	1,21
44	0,62	0,60	0,61	0,55	0,57	0,56

- Pearsonov korelacijski koeficient

Preglednica V: Rezultat izračuna korelacijskega koeficienta med meritvami aktivnosti anti-Xa v KOŽB in KIKKB.

	N	Korelacija	Signifikantnost
KOŽB & KIKKB	44	0,971	0,000

Vrednost korelacijskega koeficienta je 0,971, kar kaže na zelo visoko pozitivno povezavo med meritvami (preglednica V). Glede na ta rezultat lahko sklepamo, da nam oba analizatorja dajeta med sabo zelo podobne rezultate meritev, kar nam omogoča vpeljavo testa v 24-urni laboratorij ob primerni ponovljivosti rezultatov meritev v seriji in med serijami.



Slika 11: Regresijska premica meritev anti-Xa v KOŽB in KIKKB.

- T-test

T-test predpostavlja normalno porazdelitev obeh vzorcev. Ali je ta pogoj izpolnjen smo preverili s Kolmogorov - Smirnovim testom.

Preglednica VI: Rezultati testa normalnosti porazdelitve meritev anti-Xa v KOŽB in KIKKB.

	Kolmogorov-Smirnov test		
	Vrednosti	Df oz. št. prostostnih stopenj	Signifikantnost
KOŽB	0,109	44	0,200
KIKKB	0,121	44	0,112

Rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa kažejo, da so rezultati meritev anti-Xa na obeh analizatorjih normalno porazdeljeni ($p > 0,05$) (preglednica VI).

Nato postavimo hipotezi:

- ničelna hipoteza $H_0 = \mu = \mu_0$, pravi, da ni significantnih razlik med vrednostmi meritev z enim ali drugim analizatorjem.
- alternativna hipoteza nasprotuje ničelni $H_1 = \mu \neq \mu_0$ in pravi, da so significantne razlike med vrednostmi meritev na enem in drugem analizatorju.

Preglednica VII: Rezultati parnega t-testa.

	Statistične vrednosti					t	df	Signifikantnost (2-repna)
	Aritmetična sredina	SD	Standardna napaka aritmetične sredine	95% interval zaupanja				
				Najnižja meja	Najvišja meja			
KOŽB - KIKKB	-0,01409	0,0977	0,01474	-0,04382	0,01563	-0,956	43	0,344

Izračunana vrednost p znaša 0,344. Ker je p vrednost večja od stopnje tveganja α 0,05 ($p \geq \alpha$; $0,344 \geq 0,05$) ničelno domnevo obdržimo in s tem potrdimo, da se vrednosti meritev med analizatorjema ne razlikujejo (preglednica VII).

- Ponovljivost metode v seriji meritev

Natančnost oz. ponovljivost metode smo določili v seriji meritev.

Ponovljivost v seriji meritev (CV) izračunamo s pomočjo enačbe:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100, \quad (\text{Enačba 4})$$

kjer je SD standardna deviacija in \bar{x} aritmetična sredina.

Standardno deviacijo izračunamo s pomočjo enačbe:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}, \quad (\text{Enačba 5})$$

kjer je x_i posamezna vrednost in n število vrednosti.

SD opisuje povprečno oddaljenost vsakega rezultata (vsake točke v krivulji) od srednje vrednosti. SD je merilo natančnosti.

Za oceno ponovljivosti metode v seriji smo naredili tako imenovani pool vzorcev (preglednica VIII).

Preglednica VIII: Vrednosti anti-Xa, izmerjene iz tako imenovanega pool vzorca plazme, za določanje ponovljivosti metode v seriji.

Št. meritev	mA/min	Anti-Xa (i.e./mL)
1	201,2	0,916
2	186,5	0,984
3	190,1	0,967
4	193,0	0,950
5	184,4	0,995
6	197,5	0,933
7	186,8	0,983
8	189,3	0,971
9	189,9	0,968
10	192,9	0,955
11	190,5	0,965
12	192,7	0,955
13	196,9	0,936
14	191,8	0,959
15	196,3	0,938
16	196,7	0,936
17	195,8	0,941
18	194,7	0,946
19	198,4	0,929
20	191,3	0,962

Izračunane vrednosti:

$$\bar{x} = 0,954$$

$$SD = 0,020$$

$$CV = 2,1\%$$

Koeficient variacije znaša 2,1%, kar pomeni, da je ponovljivost v seriji dobra, saj mora biti CV pri uvajanju nove metode manjši od 5%.

- Ponovljivost metode med serijami meritev

Proizvajalec reagentov določa, da je koeficient variacije med serijami za kontrolo 1 lahko največ 2%, za kontrolo 2 pa 3%. V 24-urnem laboratoriju nismo izvedli meritev ponovljivosti med serijami, saj smo imeli na razpolago premalo plazme. V primeru, da bi plazme shranjevali, bi jih bilo potrebno najprej zamrzniti, potem iz njih narediti pool, alikvotirati in ponovno zamrzniti, kar bi vplivalo na točnost meritev zaradi dvakratnega zamrzovanja.

Ponovljivost metode med serijami bodo v KIKKB izmerili iz kontrol v času vpeljave preiskave, vsaj dva tedna, vsakih 24 ur.

Za primerjavo pa podajamo koncentracije heparinskih kontrol izmerjene znotraj serije (preglednica IX).

Preglednica IX: Izmerjene koncentracije heparinske kontrole 1 in heparinske kontrole 2.

Koncentracija kontrole 1 (i.e./mL)	Koncentracija kontrole 2 (i.e./mL)
0,37	0,78
0,37	0,78
0,36	0,82
0,37	0,78

Kontrola 1:

$$\bar{x} = 0,3675$$

$$SD = 0,005$$

$$CV = 1,4\%$$

Kontrola 2:

$$\bar{x} = 0,79$$

$$SD = 0,02$$

$$CV = 2,5\%$$

Iz rezultatov je razvidno, da sta koeficienta variacije za kontrolo 1 in 2 znotraj serije skladna s predpisom, ki ga zahteva protokol za oceno ustreznosti koeficienta variacije med serijami. Glede na ta rezultat sklepamo, da bo tudi koeficient variacije med serijami ustrezen.

4.2. Vpliv zamrzovanja plazme na rezultate meritev anti-Xa

Preglednica X: Meritve anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme v KOŽB.

Št.	1. meritev anti-Xa v KOŽB iz sveže plazme (i.e./mL)	2. meritev anti-Xa v KOŽB iz zamrznjene plazme (i.e./mL)	Število dni, ko je bil vzorec zamrznjen	Razlika v aktivnosti med zamrznjenim in svežim vzorcem
1	0,64	0,66	26	0,02
2	0,91	1,00	26	0,09
3	0,75	0,76	22	0,01
4	1,13	1,13	22	0,00
5	0,73	0,75	22	0,02
6	0,45	0,36	22	-0,09
7	0,10	0,15	21	0,05
8	0,30	0,33	21	0,03
9	0,55	0,55	21	0,00
10	0,84	1,08	21	0,24
11	0,00	0,00	21	0,00
12	0,34	0,29	21	-0,05

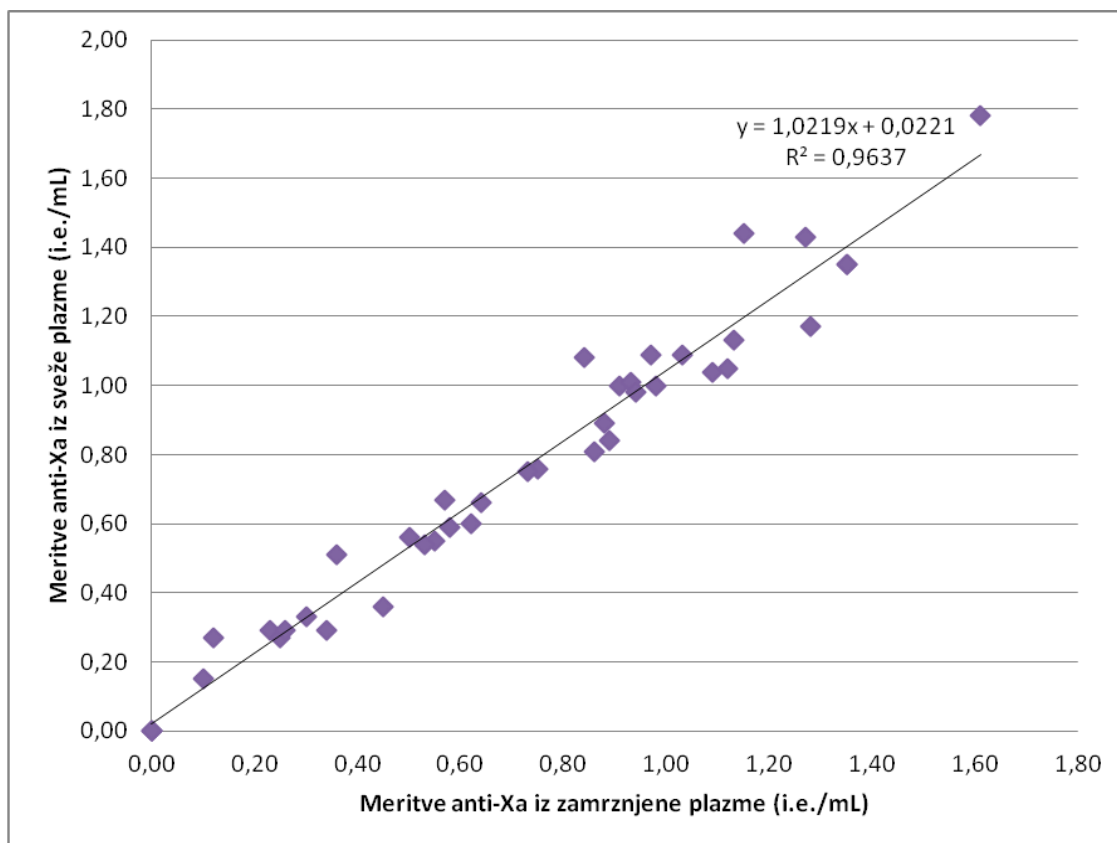
13	0,00	0,00	21	0,00
14	0,23	0,29	21	0,06
15	1,35	1,35	20	0,00
16	0,25	0,27	19	0,02
17	1,09	1,04	19	-0,05
18	0,93	1,01	18	0,08
19	0,86	0,81	18	-0,05
20	1,12	1,05	17	-0,07
21	0,94	0,98	17	0,04
22	1,03	1,09	17	0,06
23	0,00	0,00	17	0,00
24	1,35	1,35	17	0,00
25	0,88	0,89	12	0,01
26	0,53	0,54	12	0,01
27	0,58	0,59	12	0,01
28	1,35	1,35	11	0,00
29	1,35	1,35	8	0,00
30	0,89	0,84	8	-0,05
31	1,28	1,17	23	-0,11
32	0,04	0,14	23	0,10
33	0,36	0,51	23	0,15
34	0,26	0,29	23	0,03
35	0,98	1,00	23	0,02
36	0,57	0,83	23	0,26
37	0,97	0,96	17	-0,01
38	0,97	1,09	15	0,12
39	0,50	0,56	15	0,06
40	0,12	0,27	14	0,15
41	0,57	0,67	10	0,10
42	0,88	0,84	10	-0,04
43	1,27	1,43	2	0,16
44	0,62	0,60	2	-0,02

- Pearsonov korelacijski koeficient

Preglednica XI: Statistično ovrednotenje svežega in zamrznjenega vzorca plazme iz KOŽB.

	Povprečje	df	SD	Korelacija
SVEŽ	0,71	44	0,43	0,98
ZAMRZNJEN	0,73	44	0,41	

Vrednost korelacijskega koeficienta med svežo in zamrznjeno plazmo je 0,98, kar kaže na zelo visoko pozitivno povezavo med meritvami. Opazimo pa, da 77,3% vrednosti meritev zamrznjene plazme v primerjavi s svežo plazmo daje višje ali enake rezultate (preglednica X, XI).



Slika 12: Regresijska premica meritev anti-Xa v KOŽB iz sveže in zamrznjene plazme.

- T-test

Najprej preverimo ali se rezultati meritev anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme porazdeljujejo normalno.

Preglednica XII: Rezultati testa normalnosti porazdelitve aktivnosti anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme.

	Kolmogorov-Smirnov test		
	Vrednosti	df	Signifikantnost
SVEŽ	0,109	44	0,200
ZAMRZNJEN	0,098	44	0,200

Rezultati Kolmogorov-Smirnovskega testa kažejo, da so meritve anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme normalno porazdeljene ($p > 0,05$) (preglednica XII).

Nato postavimo hipotezi:

- ničelna hipoteza $H_0 = \mu = \mu_0$ pravi, da ni significantnih razlik med vrednostmi meritev anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme.
- alternativna hipoteza nasprotuje ničelni $H_1 = \mu \neq \mu_0$ in pravi, da so significantne razlike med vrednostmi meritev anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme.

Preglednica XIII: Rezultati parnega t-testa.

	Statistične vrednosti					t	df	Signifikantnost (2-repna)
	Aritmetična sredina	SD	Standardna napaka aritmetične sredine	95% interval zaupanja				
				Najnižja meja	Najvišja meja			
SVEŽ-ZAMRZNJEN	-0,02	0,12	0,02	-0,06	0,01	-1,37	43	0,18

Izračunana vrednost p znaša 0,18. Ker je p vrednost večja od stopnje tveganja α 0,05 ($p \geq \alpha$; $0,18 \geq 0,05$) ničelno domnevo obdržimo s tem potrdimo, da se vrednosti meritev anti-Xa med svežo in zamrznjeno plazmo signifikantno ne razlikujejo (preglednica XIII).

4.3. Vpliv okvare ledvic na aktivnost anti-Xa v plazmi

Številne študije so pokazale, da je NMH v primerjavi z nefrakcioniranim heparinom varnejši in učinkovitejši. Vendar pa je njihova uporaba omejena pri bolnikih z ledvično odpovedjo zaradi kopičenja NMH. NMH se izloča izključno preko ledvic, zato predvidevamo, da bo ob oslabiljenem delovanju ledvic anti-Xa aktivnost višja od anti-Xa aktivnosti zdravih ljudi.

Za ocenjevanje delovanja ledvic ter za opredelitev stopnje kronične ledvične bolezni uporabljamo tako imenovano oceno glomerulne filtracije (oGFR). Za izračun oGFR najpogosteje uporabljamo koncentracijo serumskega kreatinina.

Preglednica XIV: Meritve koncentracije kreatinina in anti-Xa v serumu ter izračunana ocena glomerulne filtracije zdravih preiskovancev.

<i>Zaporedna št. pacienta</i>	<i>Spol</i>	<i>Starost pacienta (leta)</i>	<i>Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>eGFR\geq65 (mL/min)</i>	<i>Anti-Xa (i.e./mL)</i>
1	M	31	44	90	0,65
2	Ž	82	62	80	0,74
3	Ž	32	41	90	0,13
4	Ž	28	65	90	0,32
5	Ž	33	31	90	0,55
6	Ž	32	35	90	0,96
7	Ž	31	50	90	0,26
8	Ž	61	61	87	0,26
9	M	31	46	90	0,89
10	Ž	37	45	90	0,54
11	M	80	76	88	0,59
12	Ž	29	65	90	1,35
13	M	76	81	80	0,87
14	Ž	26	82	90	0,09
15	Ž	37	43	90	0,99
16	Ž	29	62	90	0,70
17	Ž	32	48	90	0,97
18	Ž	31	80	90	1,03
19	Ž	32	48	90	0,53

Preglednica XV: Meritve koncentracije kreatinina in anti-Xa v serumu ter izračunana ocena glomerulne filtracije pacientov z ledvično okvaro.

<i>Zaporedna št. pacienta</i>	<i>Spol</i>	<i>Starost pacienta (leta)</i>	<i>Koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>eGFR <65 (mL/min)</i>	<i>Anti-Xa (i.e./mL)</i>
1	M	45	142	47	1,00
2	Ž	78	163	36	1,13
3	Ž	60	732	5	0,41
4	M	69	109	58	0,00
5	M	66	176	34	0,32
6	Ž	86	81	58	1,35

7	Ž	71	161	27	1,07
8	M	64	187	32	0,97
9	Ž	51	133	34	0,84
10	M	46	138	48	1,09
11	M	79	100	63	1,35
12	M	46	144	46	1,23
13	M	86	181	31	0,86

- Mann-Whitneyev U test in T-test

S Kolmogorov-Smirnovim testom smo preverili ali se meritve anti-Xa in izračuni oGFR porazdeljujejo normalno.

Preglednica XVI: Rezultati testa normalnosti porazdelitve meritev anti-Xa in izračunanega oGFR.

	Kolmogorov-Smirnov test		
	Vrednosti	df	Signifikantnost
oGFR - zdravi	0,451	19	0,000
oGFR - bolni	0,137	13	0,200
anti-Xa - zdravi	0,105	19	0,200
anti-Xa - bolni	0,217	13	0,094

Rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa kažejo, da se rezultati izračunov oGFR zdravih ljudi statistično značilno razlikujejo od normalne porazdelitve ($p < 0,05$) (preglednica XVI). Zato smo v nadaljevanju uporabili neparametrični Mann-Whitney U test za oceno razlik v povprečnih vrednostih med skupinama.

Anti-Xa vrednosti zdravih in bolnih ljudi so normalno porazdeljene ($p > 0,05$). Zato smo za izračun razlik v meritvah anti-Xa zdravih in bolnih ljudi uporabili t-test.

○ Mann-Whitneyev U test

Postavimo hipotezi o oGFR ledvic:

- ničelna hipoteza $H_0 = \mu = \mu_0$ pravi, da med zdravimi in bolnimi preiskovanci z ledvično odpovedjo ni statistično značilnih razlik v hitrosti glomerulne filtracije l.
- alternativna hipoteza nasprotuje ničelni $H_1 = \mu \neq \mu_0$ in pravi, da so signifikantne razlike v hitrosti glomerulne filtracije med zdravimi in bolnimi preiskovanci z ledvično odpovedjo.

Preglednica XVII: Rezultati Mann-Whitneyevega U testa.

	oGFR
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	78,000
Z	-4,824
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,000

Izračunana vrednost p znaša 0,000. Ker je vrednost p manjša od stopnje tveganja α 0,05 ($p < \alpha$; $0,00 < 0,05$) ničelno domnevo zavržemo in s tem potrdimo, da se izračunane vrednosti oGFR med zdravimi in bolnimi pacienti statistično signifikantno razlikujejo (preglednica XVII).

Preglednica XVIII: Statistične vrednosti oGFR zdravih in bolnih preiskovancev.

			Vrednosti	Std. napaka
oGFR - zdravi	Aritmetična sredina		88,0769	1,02820
	95% interval zaupanja za	Najnižja vrednost	85,8367	
	aritmetično sredino	Najvišja vrednost	90,3172	
	Minimum		80,00	
	Maksimum		90,00	
oGFR - bolni	Aritmetična sredina		39,9231	4,35075
	95% interval zaupanja za	Najnižja vrednost	30,4436	
	aritmetično sredino	Najvišja vrednost	49,4025	
	Minimum		50,00	
	Maksimum		63,00	

Aritmetična sredina oGFR pri zdravih pacientih je 88,1 mL/min, pri bolnih pacientih pa 39,9 mL/min (preglednica XVIII).

○ T-test

Postavimo hipotezi:

- ničelna hipoteza $H_0 = \mu = \mu_0$ pravi, da med zdravimi in bolnimi pacienti z ledvično odpovedjo ni statistično značilnih razlik v aktivnosti anti-Xa.
- alternativna hipoteza nasprotuje ničelni $H_1 = \mu < \mu_0$ in pravi, da imajo pacienti z ledvično odpovedjo višjo aktivnost anti-Xa, kot zdravi preiskovanci.

Preglednica XIX: Rezultati neodvisnega t-testa.

	Statistične vrednosti					t	df	Signifikantnost (1-repna)
	Aritmetična sredina	SD	Standardna napaka aritmetične sredine	95% interval zaupanja				
				Najnižja meja	Najvišja meja			
Anti-Xa	-0,24016	0,24016	0,13371	-0,51323	0,03291	-1,796	30	0,041

Izračunana vrednost p znaša 0,041 (preglednica XIX). Ker je p vrednost manjša od stopnje tveganja α 0,05 ($p < \alpha$; $0,041 \geq 0,05$) ničelno domnevo zavržemo in sprejmemo alternativno hipotezo. S tem smo potrdili številne farmakokinetične študije, da je aktivnost anti-Xa manjša pri zdravih ljudeh kot pri ljudeh z ledvično okvaro. Anti-Xa je negativno korelirana s kreatininskim očistkom.

Preglednica XX: Statistične vrednosti anti-Xa zdravih in bolnih preiskovancev.

			Vrednosti	Std. napaka
Anti-Xa - zdravi	Aritmetična sredina		0,6537	0,07840
	95% interval zaupanja za	Najnižja vrednost	0,4890	
	aritmetično sredino	Najvišja vrednost	0,8184	
	Minimum		0,09	
	Maksimum		1,35	
Anti-Xa - bolni	Aritmetična sredina		0,8938	0,11430
	95% interval zaupanja za	Najnižja vrednost	0,6448	
	aritmetično sredino	Najvišja vrednost	1,1429	
	Minimum		0,00	
	Maksimum		1,35	

Aritmetična sredina anti-Xa pri zdravih preiskovancih je 0,65 i.e./mL, pri bolnih pacientih pa 0,89 i.e./mL (preglednica XX).

5. Sklepi

V okviru diplomske naloge smo prišli do sklepov,:

- da CS-2100i, proizvajalca SYSMEX v KOŽB in BCS XP, proizvajalca DADE BEHRING v KIKKB dajeta med sabo zelo podobne rezultate meritev. To smo potrdili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom, ki znaša 0,97.
- da ni signifikantnih razlik med vrednostmi meritev anti-Xa med analizatorjema. To hipotezo smo potrdili s t-testom in izračunali, da je vrednost $p > \alpha$.
- da je ponovljivost metode v seriji, dobljena iz tako imenovanega pool vzorca, primerna za uvedbo anti-Xa v 24-urni laboratorij. Koeficient variacije v seriji je 2,1% in ustreza zahtevi, da mora biti pri uvajanju nove metode v laboratorij manjši od 5%.
- da bo potrebno narediti meritve ponovljivosti metode med serijami, ko se bo metoda uvajala v laboratorij. Glede na vrednost koeficienta variacije heparinske kontrole 1 in 2 v seriji domnevamo, da bodo vrednosti ponovljivosti kontrol med serijami ustrezne.
- da je korelacijski koeficient med meritvami anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme visok, in sicer znaša 0,98. Opazimo pa, da kar 77,3% meritev anti-Xa iz zamrznjene plazme v primerjavi s svežo plazmo daje višje oz. enake rezultate.

- da ni signifikantnih razlik med vrednostmi meritev anti-Xa iz sveže in zamrznjene plazme. To hipotezo smo potrdili s t-testom in izračunali, da je vrednost $p > \alpha$.
- da je hitrost glomerulne filtracije, izračunana iz serumske koncentracije kreatinina, pri bolnikih z ledvično odpovedjo zmanjšana. To smo potrdili z Mann-Whitneyev U testom. V naši študiji je bila aritmetična sredina oGFR pri zdravih pacientih za 48,2 mL/min višja kot pri bolnih pacientih.
- da hitrost glomerulne filtracije vpliva na aktivnost anti-Xa. Z neodvisnim t-testom smo potrdili, da je aktivnost anti-Xa manjša pri zdravih ljudeh kot pri ljudeh z ledvično okvaro.

6. Literatura

- 1) Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana 2005, 9-51.
- 2) Perme R, Blinc A: Neodzivnost na peroralno antiagregacijsko zdravljenje. Zdravniški vestnik 2006; 75: 635-43.
- 3) http://www.nature.com/nrurol/journal/v8/n9/fig_tab/nrurol.2011.106_F2.html, dostopno junij 2012.
- 4) Mlakar U, Preložnik-Zupan I, Strauch Rika: Ocena primarne hemostaze z analizatorjem trombocitne funkcije PFA-100. Zdravniški vestnik 2004; 73: 485-8.
- 5) Borovšak Z: problemi koagulacije po operaciji na srcu v enoti intenzivne terapije. 4. podiplomski seminar zdravljenje s krvjo v kirurgiji 2001; 63-64.
- 6) http://usmlewiki.org/index.php?title=USMLE_Wiki:Hemodynamic_Disorders, dostopno junij 2012.

- 7) Stecher A, Kremžar B: Mehanizem delovanja rekombinantnega faktorja VIIa in uporaba pri stanjih, ki jih spremlja huda krvavitev. Zdravniški vestnik 2006; 75: 241-6.
- 8) <http://www.thrombosisadviser.com/en/image.php?image=fibrinolysis-coag-cascade&category=coagulationcascade> , dostopno junij 2012.
- 9) Blackwell Publishing Ltd, British Journal of Haematology, Journal Compilation 2008; 141, 757-763.
- 10) Kikelj D: Antitrombotična zdravila pri starostnikih. Farmacevtski vestnik 2005; 79.
- 11) Yaroslav Winter, Richard Dodel, Alexei Korchounov, Martin Grond, Wolfgang H. Oertel, Tobias Back: Clinical and pharmacological properties of new oral anticoagulants for the prevention of cerebral thromboembolism: Factor Xa and thrombin inhibitors. World Journal of Neuroscience 2012, 2: 7-14.
- 12) <http://en.wikipedia.org/wiki/Heparin> , dostopno junij 2012.
- 13) Peternel P: Venska tromboza v: Kocijančič A, Mrevlje F; Interna medicina. Državna založba Slovenije, Ljubljana 1993, 229-231.
- 14) <http://www.aafp.org/afp/1999/0215/p945.html> , dostopno junij 2012.

- 15) Maličev E, Dovč-Drnovšek T, Rožman P: Serološke in funkcijske preiskave pri diagnosticiranju trombocitopenije, povzročene s heparinom (HIT). Zdravniški vestnik 2012; 81: 149-152.
- 16) Tratar G, Mavri A, Gubenšek M, Krevel B, Ježovnik M, Ostaševski N, Štalc M, Cuderman T: Antikoagulacijsko zdravljenje pri bolnikih z zmanjšanim ledvinim delovanjem. Zdravniški vestnik 2008; 77: 300-302.
- 17) <http://www.zdravila.net/> . Baza podatkov o zdravilih, dostopno: maj 2012.
- 18) http://www.klinika-golnik.si/uploads/klinika-golnik-files/golniski_simpozij_2011_klinicna_farmacija_zbornik_prispevkov.pdf, dostopno junij 2012.
- 19) http://www.sim.mf.uni-mb.si/katedre_sim_center/Katedra_za_interno_medicino/Simulacija_akutnega_korona_rnega_sindroma_SIM_CENT_2011.pdf , dostopno junij 2012
- 20) Elliot M. Antman, John W. Beasley, Robert M. Califf: ACC/AHA 2002 Guideline Update for the Management of Patients With Unstable Angina and Non–ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. Braunwald 2002: 1-76.
- 21) http://www.klinika-golnik.si/uploads/klinika-golnik-files/golniski_simpozij_2011_klinicna_farmacija_zbornik_prispevkov.pdf , dostopno junij 2012.
- 22) Xiaojie Zhang, Bing Bai: Correlation of fibrinogen level and absorbance change in both PT and APTT clotting curves on BCSXP. Journal of Nanjing Medical University 2008, 22(3):193-198.
- 23) Siemens, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., 2009.

- 24) Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine, 2004, Uradni list RS, št. 64/04, stran 8129.
- 25) <http://www.westgard.com> , dostopno: maj 2012.
- 26) Pfajfar L, Arh F: Statistika 1, Ekonomska fakulteta, Ljubljana, 1998: 195.
- 27) <http://www.sysmex.com.hk> , dostopno junij 2012.
- 28) <http://www.medical.siemens.com> , dostopno junij 2012.
- 29) Skitek M: Kontrola kvalitete rezultatov v laboratorijski hematologiji. Magistrsko delo. Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, 1989.
- 30) Navodila za uporabo. Siemens Healthcare Diagnostics, februar 2009.