



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Аница М. Петковић

**Ефекти директних оралних антикоагуланаса на
глобалну хемостазу код пацијената са атријалном
фибрилацијом**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2020



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Anica M. Petkovic

**Effects of direct oral anticoagulants on global
hemostasis in patients with atrial fibrillation**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2020

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Аница Петковић
Датум и место рођења: 11.10.1992., Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Асистент на предмету Фармацеутска технологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Докторска дисертација
Наслов: Ефекти директних оралних антикоагуланаса на глобалну хемостазу код пацијената са атријалном фибрилацијом
Број страница: 101
Број слика: 4 слике, 19 табела, 23 графика
Број библиографских података: 217
Установа и место где је рад израђен: 1. Каролинска Институт, Стокхолм, Шведска 2. Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Коментори: др сци. мед. Јован Антовић, ванредни професор др сци. мед. Владимир Јаковљевић, редовни професор
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 30.10.2018.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-182/14 од 12.03.2019.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Марко Фолић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник 2. Проф. др Милоје Томашевић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан 3. Проф. др Слободан Обрадовић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Марко Фолић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник 2. Проф. др Милоје Томашевић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан 3. Проф. др Слободан Обрадовић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
Датум одбране дисертације:

Имати ову књигу у рукама за мене је доказ не само доприноса науци, него и доказ да се поред дивних људи, који су непрекидно били уз мене, снови остварују.

Када сам пре осам година крочила на врата Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију којом руководи проф. др Владимир Јаковљевић и сусрела са људима пуним знања, ентузијазма и креативности када је научно-истраживачки рад у питању, знала сам да ћу полако упловити у свет науке.

Од мојих првих истраживачких корака па до данашњег дана, неизмерну захвалност дугујем свом ментору, човеку огромног срца и широког знања, професору Владимиру Јаковљевићу. Драги професоре, хвала на несебично пруженом знању, драгоценим професионалним и пријатељским саветима, непресушној мотивацији и разумевању не само приликом израде ове докторске дисертације већ и кроз цео мој професионални пут. Желим да Вам се захвалим на указаном поверењу, нарочито приликом мог одласка на Каролинска Институт ради израде ове докторске дисертације. Учинили сте ми велику част и задовољство што сам део Вашег тима који непрестано помера границе науке.

Велику захвалност дугујем ментору проф. др Јовану Антовићу, који ми је отворио врата своје лабораторије и уз чију сам несебичну помоћ и подршку успела да сваки део овог истраживања спроведем успешно. Велико хвала на свим идејама, добронамерним саветима и уложеном труду.

Желим да се захвалим члановима истраживачког тима на Каролинска Институту у Стокхолму: проф. др Александри Антовић, Иви Прунер и Јанан Зонг на пруженој помоћи приликом израде ове дисертације.

Захваљујем се драгим колегама и пријатељима из Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију: Владимиру Живковићу, Ивану Срејовићу, Невени Јеремић, Јовани Брадић, Јовани Јеремић, Александри Стојановић, Марку Равићу, Тамари Николић Турнић, Исидори Милосављевић, Невени Драгинић, Маријани Анђић, Марини Ранковић, Катарини Радоњић, Маји Савић, Јасмини Сретеновић, Љиљани Ђоковић и Предрагу Равићу, за бројне стручне и пријатељске савете, пренесено знање и изврсну дугогодишњу сарадњу.

Такође се захваљујем својим колегама са Катедре за Фармацеутску технологију на разумевању приликом мог одсуства и подршци. Хвала пријатељу и колеги Душану Томашевићу на несебичној помоћи приликом техничког сређивања доктората.

Хвала мом драгом супругу Браниславу који свему даје смисао, за подршку, снагу и разумевање које ми свакодневно пружа.

Безусловна љубав, подршка и разумевање коју ми пружају родитељи и брат, је оно што ми је непрестано даје снагу да истрајем у својим животним циљевима. Хвала вам што ми својим примером показујете како треба да корачам кроз живот.

.....Мами Велини, тати Милуну и брату Андрији....

Ваша Аница

САЖЕТАК

Увод: Директни орални антикоагуланси (ДОАК) се користе за превенцију можданог удара код пацијената са невалвуларном атријалном фибрилацијом (АФ).

Циљ: Испитати ефекте две стандардне дозе ривароксабана и дабигатрана на стандардне рутинске и глобалне хемостатске тестове код пацијената са АФ и упоредити резултате ових метода са резултатима течне хроматографије у комбинацији са масеном спектрометријом.

Материјал и методе: Истраживање је обухватило 52 пацијента који су били на терапији ривароксабаном (15/20 mg), 50 пацијената на терапији дабигатраном (110/150 mg) и 70 здравих испитаника. Испитана су три глобална хемостатска теста: ендогени тромбински потенцијал (ЕТР), калибрисана аутоматизована тромбографија (САТ) и укупни хемостатски потенцијал (ОНР).

Резултати: Оба ДОАК су довела до смањења ЕТР док је ОНР био умањен само након терапије дабигатраном. Јака корелација је примећена између ЕТР параметара и концентрације ривароксабана (ЕТР, $r=-0,51$; c-max, $r=-0,85$; t-lag, $r=0,83$; t-max, $r=0,66$) као и концентрације дабигатрана у плазми (ЕТР, $r=-0,75$; c-max, $r=-0,74$; t-lag, $r=0,73$; t-max, $r=0,52$). Анализом концентрације дабигатрана испод 50 ng/ml показано је да ЕТР параметар има AUC-ROC вредност од 0,879. Терапија дабигатраном је парадоксално повећала вредности параметара AUC и реак док је терапија ривароксабаном допринела смањењу реак вредности.

Закључак: На основу добијених резултата можемо закључити да је САТ тест недовољно добар за утврђивање ефекта терапије дабигатраном и недовољно сензитиван код терапије ривароксабаном. ЕТР метод представља потенцијално одговарајући тест за одређивање глобалног хемостатског капацитета код оба ДОАК. Улога ОНР теста се мора испитати у додатним истраживањима.

Кључне речи: атријална фибрилација, дабигатран, глобални хемостатски тестови, ривароксабан.

ABSTRACT

Introduction: Direct oral anticoagulants (DOAC) are used for prevention of stroke in patients with non valvular atrial fibrillation (AF).

Aim: Evaluation the effects of two standard doses of rivaroxaban and dabigatran on standard routine and global hemostatic assays in patients with AF and comparison of these methods to results of liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Material and methods: The study included 52 patients treated with rivaroxaban (15/20 mg), 50 on dabigatran (110/150 mg), and 70 healthy individuals. Determination of three global hemostatic assays, namely endogenous thrombin potential (ETP), calibrated automated thrombogram (CAT) and overall hemostasis potential (OHP) was performed.

Results: Both DOACs reduced ETP while OHP was diminished only by dabigatran. Strong correlations were noticed between ETP parameters and the plasma concentrations of rivaroxaban (ETP, $r=-0.51$; c-max, $r=-0.85$; t-lag, $r=0.83$; t-max, $r=0.66$) as well as with plasma concentration of dabigatran (ETP, $r=-0.75$; c-max, $r=-0.74$; t-lag, $r=0.73$; t-max, $r=0.52$). Analysis of dabigatran concentrations under 50 ng/ml showed that ETP parameter has AUC-ROC value of 0.879. Dabigatran treatment paradoxically increased AUC and peak values while rivaroxaban decreased peak values.

Conclusions: Based on our results we may conclude that the CAT assay is inappropriate for estimation of dabigatran effects and is not fully sensitive as regards rivaroxaban. The ETP assay can potentially be the appropriate method for estimation of global hemostatic capacity as regards both DOACs. The role of OHP needs to be confirmed in additional studies.

Key words: atrial fibrillation, dabigatran, global hemostatic assays, rivaroxaban.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	2
1.1. ХЕМОСТАЗА	2
1.2. ХИПЕРКОГУЛАБИЛНОСТ	3
1.3. АТРИЈАЛНА ФИБРИЛАЦИЈА (АФ).....	4
1.3.1. Историја	4
1.3.2. Дефиниција	4
1.3.3. Преваленца и инциденца	4
1.3.4. Патофизиолошки и генетски аспекти	5
1.3.5. Дијагноза	5
1.3.6. Класификација.....	6
1.3.7. Лечење.....	6
1.4. АНТИКОАГУЛАНТНА ТЕРАПИЈА.....	8
1.4.1. Историја	8
1.4.2. Механизам дејства и подела антикоагуланаса	8
1.4.3. Парентерални анткоагуланси.....	9
1.4.3.1. Хепарини.....	9
1.4.4. Орални антикоагуланси.....	10
1.4.4.1. Директни орални антикоагуланси (ДОАК)	11
1.4.4.1.1. Индикације.....	12
1.4.4.1.2. Дабигатран	12
1.4.4.1.3. Ривароксабан.....	14
1.4.4.1.4. Апиксабан	15
1.4.4.1.5. Едоксабан	16
1.5. ТЕСТОВИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ ХЕМОСТАЗЕ	17
1.5.1. Стандардни и специфични коагулациони тестови.....	17
1.5.1.1. Протромбинско време (РТ)	17
1.5.1.2. Активирано парцијално тромбoplastинско време (аРТТ).....	18
1.5.1.3. Течна хроматографија са масеном спектрометријом (LC-MS/MS).....	19
1.5.1.4. Специфични коагулациони тестови	20
1.5.2. Глобални тестови хемостазе	20
1.5.2.1. Тест генерације тромбина (ТГТ).....	21
1.5.2.2. Тромбоеластографија (ТЕГ)	22
1.5.2.3. Укупни хемостатски потенцијал (ОНР).....	23
2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ	25
2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ	25
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	27
3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ И ПОПУЛАЦИЈА	27
3.2. УЗОРКОВАЊЕ	28
3.3. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ.....	29
3.3.1. Индиректно одређивање концентрације у плазми помоћу коагулационих стандардних метода	29
3.3.1.1. Активирано парцијално тромбoplastинско време (аРТТ).....	29
3.3.1.2. Протромбинско време (РТ-INR)	29

3.3.2. Директно одређивање концентрације ДОАК у плазми	30
3.3.2.1. Течна хроматографија са масеном спектрометријом (LC-MS/MS).....	30
3.3.3. Глобални хемостатски тестови	31
3.3.3.1. Тест за мерење ендогеног тромбинског потенцијала (ЕТР)	31
3.3.3.2. Калибрисана аутоматозована тромбографија (САТ).....	33
3.3.3.3. Укупни хемостатски потенцијал	34
3.3.3.4. Анализа формирања угрушка (турбидиметријски подаци)	36
3.3.4. Снага студије и величина узорка	37
3.3.5. Статистичка обрада података.....	37
4. РЕЗУЛТАТИ	39
4.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА	40
4.1.1. Демографске карактеристике испитаника	40
4.1.2. Демографске карактеристике испитаника на основу дозе ДОАК.....	40
4.2. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ	43
4.2.1.1. Директно одређивање концентрације ДОАК у плазми помоћу LC-MS/MS	43
4.2.1.2. Индиректно одређивање концентрације у плазми помоћу стандардних коагулационих метода	43
4.3. ГЛОБАЛНИ ХЕМОСТАТСКИ ТЕСТОВИ.....	45
4.3.1. ЕТР тест.....	45
4.3.2. САТ тест.....	50
4.3.3. ОНР тест.....	55
4.3.4. Анализа турбидиметријских података	59
4.4. КОРЕЛАЦИЈЕ.....	60
4.4.1. Корелација концентрације ДОАК у плазми и клиничких карактеристика	60
4.4.2. Корелација концентрације ДОАК у плазми и стандардних коагулационих метода	60
4.4.3. Корелација концентрације ДОАК у плазми и глобалних хемостатских тестова	62
4.5. ЕФЕКТИ ДОАК КОД ПОЈЕДИНАЧНИХ ПАЦИЈЕНАТА.....	66
4.6. ПАРАМЕТРИ ГЛОБАЛНИХ ХЕМОСТАТСКИХ ТЕСТОВА И НИСКЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ДОАК У ПЛАЗМИ	67
5. ДИСКУСИЈА	71
5.1. ДОАК И КЛИНИЧКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА	72
5.2. ЕФЕКТИ ДОАК НА СТАНДАРДНЕ КОАГУЛАЦИОНЕ ТЕСТОВЕ	75
5.3. ЕФЕКТИ ДОАК НА ГЛОБАЛНУ ХЕМОСТАЗУ	78
5.4. ЕФЕКТИ РИВАРОКСАБАНА И ДАБИГАТРАНА НА ПАРАМЕТРЕ ЕТР ТЕСТА	79
5.5. ЕФЕКТИ РИВАРОКСАБАНА И ДАБИГАТРАНА НА ПАРАМЕТРЕ САТ ТЕСТА	81
5.6. ЕФЕКТИ РИВАРОКСАБАНА И ДАБИГАТРАНА НА ПАРАМЕТРЕ ОНР ТЕСТА	82
5.7. БЕЗБЕДАН НИВО КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ДОАК У ПЛАЗМИ И ЕТР ТЕСТ	83
5.8. БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА	85
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	87
7. ЛИТЕРАТУРА.....	89

І

УВОД

1. УВОД

1.1. ХЕМОСТАЗА

Хемостаза представља физиолошки механизам који омогућава организму да одржи нормалну конзистенцију крви, доприноси опоравку оштећених крвних судова и уклања крвне угрушке након успостављања васкуларног интегритета. Пре више од 60 година, научник *Astrup* је први описао феномен хемостатске равнотеже (1). Још тада се веровало да се под утицајем фибринолитичке активности уништава угрушак који настаје након повреде. Данас се сматра да крв има велику склоност ка згрушавању али и да интактна васкулатура захтева снажан антитромботски систем у циљу спречавања настанка угрушка (2).

Хемостазу чине три главна система: примарна хемостаза, секундарна хемостаза и фибринолиза. Приликом повреде крвних судова, прво се јавља вазоконтриктија глатких мишићних ћелија васкуларног зида. Потом се тромбоцити везују за колаген и фон Вилебрандов фактор у субендотелијуму, након чега им се мења облик (из глатког облика у бодљикаву сферну структуру) и долази до њихове активације. Активација тромбоцита започиње под утицајем колагена, тромбина, аденозиндифосфата и тромбоксана А₂. Након процеса активације следи везивање тромбоцита за молекуле фибриногена што представља процес агрегације. Активирани тромбоцити ослобађају неколико врста гранула који даље имају улогу у активацији других тромбоцита. По завршетку примарне хемостазе, почиње секундарна хемостаза која осликава процес коагулације плазме. Коагулациони систем представља каскадни систем ензима у ком ензими активирају следећи проензим путем протеолитичког цепања. Када се оштети крвни суд долази до експримирања ткивног фактора (ТФ), преко оштећених ендотелних и субендотелних ћелија, који се даље везује за фактор VIIа (3). Приликом формирања комплекса ТФ и фактора VIIа врши се активација фактора X и превођење у фактор Xа. На површини активираних тромбоцита, фактор Xа и фактор Va активирају протромбин и омогућавају његов прелазак у тромбин. Овај процес представља иницијалну фазу коагулационе каскаде приликом које се стварају мале количине тромбина и фибрина (4). Потом следи фаза амплификације у којој се формира комплекс између тромбоцита и следећих фактора: XIа, VIII и V. Након активације фактора X у фактор Xа следи везивање за фактор V што даље доводи до превођења протромбина у тромбин (3). Настали тромбин преводи фибриноген у фибрин чиме се завршава коагулациона каскада. У овој фази се ствара велика количина тромбина и фибрина, стога постоји већа тенденција настанка крвног угрушка. Фаза пропагације се одвија на мембрани активираних тромбоцита, у којој се процес коагулације убрзава помоћу специфичних фосфолипида и ензимских комплекса који доводе до стварања огромних количина тромбина. Тромбин има централну улогу у коагулационом систему, цепа молекуле фибриногена при чему настају фибрински мономери из којих се даље ствара фибрин. Такође, улога тромбина јесте да врши стабилизацију фибринског угрушка и тиме спречава његову превремену разградњу (4).

С друге стране, неколико механизма антикоагулантног система је задужено за смањено стварање тромбина. Када тромбин доспе до интактног ендотела, везује се за мембранске протеине заједно са инхибитором коагулације - протеином Ц. Удруженом активацијом протеина Ц са протеином С инактивирају се фактори Va и VIIа. Такође ТФ спречава активацију комплекса који чине ТФ, фактори Xа и VIIа (3).

Процес фибринолизе започиње истовремено са коагулационом каскадом преко више ендогених активатора плазминогена укључујући: ткивни активатор плазминогена (tPA), урокиназни активатор плазминогена (uPA), неутрофилну еластазу, каликреин.

Плазминоген се налази складиштен на фибринским влакнима унутар тромба док активатори плазминогена улазе у тромб, цепају плазминоген приликом чега настаје плазмин. Плазмин даље разлаже фибрин на различите деградационе продукте као што је Д-димер. Повећане вредности Д-димера говоре у прилог стварања тромба и активацији фибринолизе истог (5).

1.2. ХИПЕРКОГУЛАБИЛНОСТ

Стање приликом којег се јавља поремећена равнотежа прокоагуланаса и антикоагуланаса као и протромботских и антитромботских сила у крви се назива хиперкоагулабилно стање. До хиперкоагулабилности такође може доћи услед повећаног ослобађања разних биохемијских маркера приликом процеса инфламације, тромбофилије, васкуларних повреда, антифосфолипидног синдрома, присуства ендотоксина или канцера. Заправо је хиперкоагулабилно стање код пацијената повезано са повећаним ризиком за настанак артеријске или венске тромбозе у поређењу са здравом особом истог пола, старости и телесне масе (6).

Сматра се да је управо хиперкоагулабилност одговорна за повећани ризик од тромбоемболијских компликација (нпр. možданог удара), изненадне смрти или срчане инсуфицијенције код пацијената са атријалном фибрилацијом (АФ). Заправо, ова суправентрикуларна тахикардија доприноси стази крви у преткомори, самим тим и последичном формирању преткоморског тромба и настанку тромбоемболијских компликација (7). Претходна истраживања су показала да се код пацијената са АФ уочава повећање маркера тромбина и активности тромбоцита (8), пораст нивоа системског фибриногена, фибрина и Д-димера (9), повећање вон Вилебрандовог фактора (10) као и абнормална фибринолиза (11).

Након бројних студија које су спроведене у овој области, показано је да хиперкоагулабилно стање може допринети настанку атријалне фиброзе која погоршава АФ. Од давнина је показано да значајну улогу у коагулационом систему има тромбин. Наиме, запажено је да тромбин активира сигналне путеве протеаза-активираниог рецептора (ПАР) у преткоморским фибробластима путем фосфорилације Akt, Erk, и p38 молекула. Уједно тромбин повећава експресију профибротичких молекула: актин глатких мишића и трансформишући фактор раста b1 као и проинфламаторних ефектора: интерлеукин-6 и моноцитни хемоатрактантни протеин-1. Занимљиво је да се претходно наведени ефекти тромбина могу ублажити *in vitro* третманом атријалних фибробласта употребом дабигатрана (7).

Додатно, атријална фибрилација се карактерише повећаном концентрацијом фрагмента 1+2 која осликава *in vivo* продукцију тромбина а успешно се супримира применом антикоагулантних лекова (12). Постоје јасни докази да генерализованом протромботском стању након епизода АФ доприноси преткоморско оштећење миокарда, активација инфламаторних ћелија и тромбоцита као и експресија протромботских фактора на ендотелној површини преткомора. Сходно томе, преткоморском и системском активацијом коагулационог система се може делимично објаснити зашто кратке епизоде АФ доприносе већем ризику од možданог удара (13, 14).

1.3. АТРИЈАЛНА ФИБРИЛАЦИЈА (АФ)

1.3.1. Историја

Још из времена древне Кине датира најранији запис о АФ, тачније налази се у књизи интерне медицине Кинеског жутог императора (15). Древни лекари су АФ описивали као неправилност пулса који је праћен лошом прогнозом. Својевремено је Хипократ описао пацијента са лошом прогнозом и силовитим палпитацијама срца 400 година пре нове ере, иако је то могла бити било која друга аритмија (16). Феномен „делиријум срца” потиче из периода осамдесетих година, када је *Nothnagel* први пут снимиио таласе пулса АФ. Описао је ову форму аритмије као ирегуларне откуцаје срца у којима се притисак и дужина појединачног пулса константно мењају. Средином 19. века је први пут примећена повезаност између струје и АФ након увођења јаких електричних струја у преткомору на моделу срца пса (17). Тридесет година касније *Mackenzie* је показао да се преткоморски таласи измерени у југуларној вени губе приликом појаве перзистентног ирегуларног атријалног пулса. Међутим када пулс поново постане нормалан таласи постају физиолошки (18).

1.3.2. Дефиниција

Атријална фибрилација представља једну од најозбиљнијих аритмија која се одликује дуготрајним поремећајем ритма а који је праћен неконтролисаним активношћу преткомора и последичним поремећајем механичке функције. Са електрофизиолошког аспекта, карактерише се високом стопом атријалне асинхроне деполаризације (19). Заправо, ова суправентрикуларна тахикардија подразумева одсуство правилне активности синоатријалног чвора (СА) (20). У физиолошким условима, стимулус СА чвора деполаризује ћелије изазивајући контракције преткоморе које омогућавају да се финалних 30% крви допреми из преткомора у коморе што се назива "преткоморски ударац". Код АФ тог такозваног "преткоморског ударца" нема што се манифестује смањеним допремањем крви до артеријске и коронарне циркулације (21).

1.3.3. Преваленца и инциденца

Крајем двадесетог и почетком двадесетпрвог века, преваленца АФ у општој популацији се кретала између 0,5% и 1% а варира у зависности од година и пола. Међутим, данас се сматра да је преваленца порасла на чак 2% у општој популацији (22). Инциденца АФ се повећава са мање од 0,1% код људи млађих од 40 година на преко 1,5% годишње код жена и 2% код мушкараца преко 80 година старости. Инциденца АФ се повећала 13% у последње две деценије (23). Код пацијената без историје кардиопулмоналних болести учесталост настанка АФ је мања и износи 12%. Међутим код пацијената са конгестивном срчаном инсуфицијенцијом или валвуларном болести срца преваленца се значајно повећава (24).

Сматра се да пацијенти са АФ имају пет пута већи ризик од можданог удара (25). Мождани удари повезани са АФ доприносе већем морталитету, већем броју хендикепа и рецидива него мождани удари који нису повезани са АФ. Пароксизмална АФ доводи до истог ризика од можданог удара као и перманентна и перзистентна (26). Уопштено, очекује се да ће се преваленца АФ дуплирати до 2050. године због старења популације и повећане стопе преживљавања пацијената са срчаним коморбидитетима (27).

1.3.4. Патофизиолошки и генетски аспекти

Сматра се да је неколико механизма одговорно за настанак АФ, међутим тачан узрок још увек није познат. Неки од фактора ризика који доприносе настанку АФ јесу коронарна артеријска болест, конгестивна срчана инсуфицијенција, хипертензија, валвуларна болест срца и/или старост пацијента који даље могу да доведу до прогресивног процеса ремоделовања преткоморе (28). АФ се може јавити и код пацијената са атријалним септалним дефектом, хипертиреозом или хроничном бубрежном инсуфицијенцијом, дијабетес мелитусом (21, 29).

Најчешће промене које се јављају код пацијената са АФ јесу фиброза преткомора и губитак преткоморске масе. Међутим, код многих пацијената је примећено да процес структурног ремоделовања почиње и пре настанка АФ. Такође описани су бројни знакови карактеристични за АФ као што су: инфламаторни инфилтрати, хипертрофија миоцита, масна преткоморска инфилтрација, некроза и амилоидоза (30-32). Поред свега наведеног, приликом атријалне фибрилације јављају се електричне и структурне промене у преткомори као што је скраћење преткоморског рефракторног периода и дужине трајања циклуса аритмије због нисходне регулације унутрашње струје Ca^{2+} и усходне регулације унутрашње струје K^{+} (33, 34). Различити Ca^{2+} -везујући протеини могу да фосфорилишу и допринесу повећаном спонтаном ослобађању Ca^{2+} и покретању активности која узрокује ектопију и промовише АФ. Према фокалној теорији, иницијални фокус се налази у региону плућних вена а аблацијом овог извора се може супримирати поновна АФ (35, 36).

Примећено је да 30% пацијената са АФ има породичну историју АФ. Разлог томе може бити наслеђивање или комбиновани ефекат многих гена (14). Недавно су откривени гени који су укључени у моногенско наслеђивање, укључујући *KCNQ1* и *SCN5A* гене (35).

1.3.5. Дијагноза

Велику улогу за постављање дијагнозе АФ имају узимање анамнезе и обављање физикалног прегледа. Да би се потврдило постојање АФ, користи се електрокардиографски (ЕКГ) запис који се одликује заменом конзистентних Р таласа пре сваког QRS комплекса, брзим осцилацијама или фибрилаторним таласима који варирају у величини, облику и времену. Преткоморска фреквенца се може кретати од 350 до 600 откуцаја у минути. Због појаве апсолутно неправилних RR таласа ова врста аритмије се назива и апсолутна аритмија (20, 36). У зависности од појаве или непостојања симптома, АФ може бити симптоматска или асимптоматска. Најчешћи симптоми који се могу јавити јесу палпитације, болови у грудима, краткотрајни удах на напор, умор, вртоглавица. Иако је клиничка слика АФ хетерогена и може бити повезана са исхемијском, хипертензивном или реуматском болешћу срца, тиреотоксикозом, неадекватним коришћењем алкохола, кардиомиопатијом, операцијама на срцу, хроничном пулмоналном болешћу, може бити и идиопатске природе (20, 21).

Код пацијената са АФ од великог је значаја испитати функцију штитасте жлезде, бубрега и јетре као и крвну слику. Такође у неким ситуацијама је потребно урадити трансезофагеалну ехокардиографију (због утврђивања присуства тромба), холтер-мониторинг (да би се утврдио тип аритмије), шестоминутни тест ходања (испитивање фреквенце), тест физичког оптерећења (испитивање фреквенце и за АФ изазвану физичким напором) и електрофизиолошка испитивања (ради проналажења места за евентуалну аблацију) (37-39).

1.3.6. Класификација

До данас је познато више начина класификације атријалне фибрилације. Први систем класификације се односи на ЕКГ налаз, други на епикардиална или ендокавитарна снимања или распоређивање преткоморске електричне активности (40). Такође, предложено је више клиничких класификација међутим ни једна од њих није у потпуности примењива (41-43). Према препорукама европског друштва кардиолога, атријална фибрилација се може поделити на следеће типове (на основу презентације, дужине трајања и спонтаног завршавања епизода): први пут дијагностикована, пароксизмална, перзистентна, дуготрајна перзистентна и перманентна, "усамљена" и невалвуларна АФ (39).

Под новонасталом АФ се подразумева прво јављање пацијента лекару. Уколико пацијент има две или више епизода АФ сматра се да је АФ рекурентна (понављана). Епизоде које се завршавају спонтано кроз седам дана (обично у року од 24 часа) се сматрају пароксизмалном АФ. Непароксизмална АФ се карактерише абнормалним окидачима који су обично екстра-преткоморски или абнормалним преткоморским миокардом. Даља класификација непароксизмалне АФ се односи на перзистентну и перманентну. Обе трају више од 7 дана и за њих је неопходна кардиоверзија. Код 25% пацијената, пароксизмална АФ напредује у хроничну или перманентну АФ у периоду од 5 година (39, 14, 43). Термин „усамљена АФ” се односи на пацијенте млађе од 60 година, без историје структурне болести срца. Разликује се од осталих форми идиопатских АФ у смислу старости пацијента и одсуства кардиоваскуларних болести (43). Према конвенцији, невалвуларна АФ се односи на случајеве код којих се поремећај ритма дешава у одсуству реуматске болести митралних или простетичких залиска (44).

1.3.7. Лечење

Третман АФ се односи на лечење саме аритмије и/или превенцију тромбоемболијских догађаја (нпр. мождани удар). Постоје два приступа којима се може лечити АФ: успостављање и одржавање синусног ритма или контрола вентрикуларне фреквенце (45).

Приликом лечења АФ, акценат се ставља на регулисање вентрикуларне фреквенце. Заправо, циљ терапије јесте смањење срчане фреквенце испод сто откуцаја у минути. Сходно томе, одређене групе лекова се користе са циљем контролисања ритма: антагонисти калцијумских канала (верапамил, дилтиазем) и дигоксин. Међутим код пацијената са АФ након операције или са високим адренергичким тоном, ефикаснији су антагонисти бета адренергичких рецептора (метопролол, пропранолол, есмолол, ателолол, пиндолол, надолол) (46).

С друге стране, успостављање нормалног синусног ритма код пацијената са АФ се може постићи електричном или фармаколошком кардиоверзијом. Једну од поменуте две кардиоверзије је неопходно применити уколико се новонастала АФ не заврши спонтано код пацијената који су хемодинамски нестабилни (47). За фармаколошку конверзију користе се антиаритмици из класе Ia (прокаинамид, хинидин, дизопирамин), класе Ic (флекаинид, пропafenон), класе II (ибутилид, амјодарон, соталол) који постижу ефикасну кардиоверзију код 47-84% пацијената. Међутим, хинидин и прокаинамид могу изазвати тешку хипотензију. Фатална аритмија *torsade de pointes* се јавља приликом примене лекова као што су соталол, хинидин, прокаинамид, антагонисти калијумових канала. Код пацијената са хроничном АФ главни циљ је контрола вентрикуларне фреквенце и симптома. Терапија је слична као код акутне АФ.

Дигоксин се сматра првим избором за контролу вентрикуларне фреквенце код акутне и хроничне АФ. Међутим истовремена примена антагониста бета адренергичких рецептора и антагониста калцијумских канала може ефикасно учествовати у контролисању вентрикуларне фреквенце (48). Антагонисти калцијумских канала су лекови избора код пацијената са хипертензијом и коронарном артеријском болешћу док се код конгестивне срчане инсуфицијенције не примењују услед повећаног морталитета (49).

Када су у питању епизоде АФ које трају дуже од 48 сати, није неопходна хитна кардиоверзија већ се вентрикуларна фреквенца подешава употребом антагониста калцијумских канала, антагониста бета адренергичких рецептора или дигоксина. Код оваквих пацијената постоји високи ризик од формирања преткоморског тромба који може емболизовати до мозга, резултујући можданим ударом (50). Пацијенти са невалвуларном АФ се класификују према CHA₂DS₂-VASc систему. Овај систем додељује 1 поен за свако срчано обољење: конгестивна срчана инсуфицијенција, историја хипертензије, старост пацијента изнад 75 година, и дијабетес, док се 2 поена према овој скали додељују за историју можданог удара или транзиторног исхемијског удара (ТИА). Збир поена по пацијенту одређује CHA₂DS₂-VASc скор. Уколико је резултат скорa 0, пацијентима није неопходно увођење антикоагулантне терапије. Међутим ако је резултат скорa ≥ 1 , пацијенти су погодни кандидати за антикоагулантну терапију (51-53).

1.4. АНТИКОАГУЛАНТНА ТЕРАПИЈА

1.4.1. Историја

У древном Египту, као први вид антикоагулантне терапије, користиле су се медицинске пијавице (54) које су римљани потом назвали Хирудо. Британски физиолог Џон Бери Хејкрафт је 1884. године установио да се из плјувачне жлезде пијавица лучи једињење које има особине снажног антикоагуланса. Двадесет година касније Џејкоб је изоловао то једињење и назвао га хирудин. Хирудин представља једињење које се састоји од 65 аминокиселина стабилизоване дисулфидним мостовима. Остварује своје дејство тако што се везује за активни домен и домен 1 тромбина и тиме инхибира процес коагулације. Данас се хирудин производи рекомбинантном технологијом (54, 55). Није прошло много времена након изоловања хирудина, откривена је друга супстанца за коју се веровало да има антикоагулантна својства. Изоловао ју је студент медицине Џеј Мек Леан из јетре пса 1916. године. Вилијам Хери Ховел, физиолог и професор овог студента, је дао назив супстанци: *хепарин*. Непосредно након тога и почиње његова производња у фармацеутским индустријама. Међутим у истраживању спроведеном у *Мауо* клиници у Минесоти примећена су нежељена дејства као што су главобоља, повишена температура и мучнина. То је био довољан разлог да научници Чарлс Бест и Дејвид Скот 1933. године представе протокол за пречишћавање хепарина. Ерик Јорпес, шведски биохемичар и професор на Каролинска Институту је 1936. године је први успешно пречистио хепарин. Данас је хепарин ниске молекуларне тежине заменио нефракционисани хепарин због лакше примене и предвидивог ефеката (56).

Фасцинантна прича о откривању варфарина почиње 1920. године када су два фармера из предела Канаде и равница Северне Америке увидела да убуђало сено доводи до обољевања животиња. Извршили су експеримент тиме што су сено избацили из исхране животиња или пак извршили трансфузију свеже крви животињама које крваре, и приметили су да долази до побољшања. Дведесет година касније из сена је изолован дикумарол. Од неколико десетина врста кумарина, варфарин се показао као најактивнији. Првенствено је се употребљавао као родентицид а десет година касније уведен је под именом кумадин у терапију (56).

1.4.2. Механизам дејства и подела антикоагуланаса

Антикоагулантни лекови остварују дејство путем неколико механизма. Главни циљ им је спречавање настанка тромба, а уколико је тромб већ настао да онемогуће његово ширење и смање могућност емболизације. Терапија антикоагулансима је ефикасна у превенцији венског и артеријског тромбоемболизма као и у превенцији можданог удара код пацијената са АФ. Међутим, да би се остварио исти антикоагулантни ефекат код различитих пацијената или код једног пацијента током времена, доза ових лекова може да варира чак и до 10 пута. Терапија није ефикасна уколико су пацијенти субдозирани, док ако се пацијенти предозирају постоји велика шанса за настанак крвављења. Стога се пацијенти на терапији антикоагулансима морају пажљиво пратити а доза прилагођавати (57, 58).

На основу начина примене, антикоагуланси се деле на парентералне и оралне док се на основу механизма дејства деле у зависности на који део каскадног коагулационог система делују. Варфарин и други представници групе антагониста витамина К су били најчешће коришћени орални антикоагуланси током последњих 65 година. Такође су у употреби хепарини који потенцирају активност антитромбина (АТ), инхибирају активност тромбина и фактора Ха (хепарин, еноксапарин, далтепарин).

Касније су развијени директни орални антикоагуланси у које се убрајају: директни инхибитори тромбина (дабигатран, аргатробан, бивалирудин) и директни инхибитори фактора Ха (ривароксабан, апискабан, едоксабан) (59).

1.4.3. Парентерални антикоагуланси

Парентерални антикоагуланси обухватају индиректне и директне инхибиторе тромбина. У индиректне антикоагулансе који своје дејство остварују преко антиромбина (АТ) се убрајају нефракционисан хепарин, хепарини мале молекулске тежине (LMWH, low molecular weight heparins) и синтетски аналози хепарина (фондапаринукс). У групу директних парентералних инхибитора тромбина, који остварују дејство везивањем за тромбин и последичном блокадом његове интеракције са супстратима, спадају аргатробан, бивалирудин, хирудин и други (60).

1.4.3.1. Хепарини

Хепарин представља природни полисахарид (гликозаминогликан) који се састоји од варијабилно сулфатисаних дисахаридних субјединица које се понављају. Сви хепарини имају специфичну пентасахаридну секвенцу која се веже и активира АТ који даље инхибира неколико активираних фактора коагулације. Након везивања за АТ, хепарин повећава брзину којом АТ инактивира тромбин (фактор IIa) и факторе коагулације: IXa, XIa и Xa. Хепарин остварује свој ефекат само на слободан тромбин. Тромбин, као мултифункционални ензим, поседује три главна домена за везивање лекова: активни (серин протеаза каталитички) домен, и два преостала домена (1 и 2). За домен 1 се везује фибрин док се за домен 2 везује хепарин. Користи се у превенцији и лечењу дубоке венске тромбозе, емболија, акутној емболији плућа, акутном инфаркту миокарда, атријалној фибрилацији, нестабилној ангини пекторис, оклузији периферних артерија (61).

Нефракционисани хепарини - UFH имају дужину ланца од 45 сахаридних јединица док хепарини ниске молекулске масе - LMWH имају дужину ланца од 15 сахаридних јединица. Фондапаринукс је синтетско једињење које се састоји само од пентасахаридне секвенце неопходне за везивање за АТ. Такође је специфичан за инхибицију фактора Xa што даље инхибира формирање тромбина и настанак тромба (61). Праћење пацијената који су на терапији нефракционисаним хепарином није једноставно и скопчано је са проблемом односа дозе и одговора на терапију. Стога је неопходно прецизно проверавати активирано парцијално тромбoplastинско време (aPTT). Дозирање пацијената се мора разликовати у зависности од стања, од протокола високог интензитета код венског тромбоемболизма до протокола ниског интензитета код акутног коронарног синдрома (62). Потреба за честим праћењем пацијената који су на терапији нефракционисаним хепарином представља један од недостатака његове примене. Додатно, хепарини доприносе настанку хеморагијске компликације: хепарином индукована тромбоцитопенија (ХИТ). ХИТ је имунолошка компликација која настаје приликом формирања антитела на комплекс хепарина и тромбоцитног фактора 4 (ТФ4). Након формирања антитела долази до њиховог везивања за комплекс који чине хепарин и ТФ4 на површини тромбоцита, потом се активирају путем унакрсног повезивања FcγIIA рецептора. Активирани тромбоцити повећавају експресију ТФ4 путем позитивне спреге стога долази до активације још већег броја тромбоцита. Последично се повећава продукција тромбина, активација моноцита и других инфламаторних ћелија што доприноси хиперкоагулабилном стању пацијената. ХИТ може довести до тромбоемболијских компликација, венских и/или артеријских

као што су дубока венска тромбоза (ДВТ), плућни емболизам (ПЕ), инфаркт миокарда и оклузије лимбичке артерије што захтева ампутацију. Друге компликације ХИТ укључују некротизирајуће кожне лезије, акутне системске реакције (температура, хипертензија, тахикардија, бол у грудима, диспнеја) (63, 64).

Међутим, приликом примене LMWH и фондапаринукса, ризик од настанка ХИТ је значајно мањи или га готово нема. Стога могу бити адекватна замена хепарину у многим ситуацијама. Такође, предности LMWH се огледају у томе да се примењује једном дневно субкутано, као и да се терапија не мора пратити као код нефракционисаног хепарина (65, 66). Међутим, приликом дуготрајне примене LMWH (дуже од 24 месеца поготово код старијих или онколошких пацијената) се препоручује праћење дебљине костију, унос витамина Д и калцијума као и функције јетре. У многим студијама је потврђено да дуготрајна примена LMWH (дужа од три месеца) повећава ризик од фрактура костију код трудница (67).

Фондапаринукс има минимални афинитет према ТФ4, те представља алтернативу нефракционисаном хепарину и хепарину ниске молекулске масе. Поуздано се примењује код пацијената са историјом ХИТ. Нежељена дејства која изазива јесу: главобоља, мучнина, повраћање, и ретко крвављење (71). Уколико се предозира као антидот се користи протамин сулфат који брзо неутралише антикоагулантни ефекат хепарина, делимично LMWH али не и активност фондапаринукса.

За разлику од нефракционисаног хепарина, директни инхибитори тромбина могу инхибирати тромбин везан за фибрин и продуктне разградње фибрина. Пошто се не везују за протеине плазме, делују поузданије од хепарина. Хирудин је представљао прототип директних инхибитора тромбина међутим употреба му је значајно смањена након развоја рекомбинантних молекула као што је бивалирудин. Бивалирудин и аргатробан се користе код извођења перкутане коронарне интервенције (РСi) и могу се користити код пацијента са ХИТ (59, 60).

1.4.4. Орални антикоагуланси

Антагонисти витамина К се примењују у клиничкој пракси више од пет деценија. Најчешће коришћен антикоагулантни лек широм света, антагонист витамина К, јесте варфарин (познат као кумадин). Механизам дејства остварује инхибицијом ензима јетре-витамин К епоксид редуктазе. Овај ензим врши редукцију витамина К који се даље користи као коензим у посттранслационој карбоксилацији неколико фактора коагулације (протромбин, фактор VII, IX, X) као и антикоагулантних протеина (протеин Ц, протеин С). Смањењем синтезе ових фактора последично се спречава прелазак фибриногена у фибрин (72).

Варфарин је нашао примену у лечењу и превенцији ДВТ и ПЕ, превенцији можданог удара пацијената са невалвуларном АФ, код пацијената са механичким или биолошким срчаним залисцима, код акутног инфаркта миокарда и васкулопатија. У клиничкој пракси, иницијална доза износи 2-5 mg једном дневно док је доза одржавања 2-10 mg на дан. Примена варфарина се сматра јако изазовном с обзиром на његов узак терапијски прозор. Имајући у виду да антикоагулантни ефекат варфарина није дозно предвидив, ефекат варфарина се мора пратити путем Интернационалног Нормализованог Односа (INR). Код пацијената са АФ, INR интервал би требало да буде између 2,0-2,5 како би ризик од можданог удара био што мањи (69, 70).

Варфарин се метаболише путем P450 система, стога активација или инхибиција овог изоензима може променити вредности INR-а. Бројни фактори утичу на ефекат варфарина: поврће богато витамином К, лекови (амјодарон, антибиотици, статини), генетски фактори, старост, болести срца, бубрега, јетре али и туморска обољења. Код

пацијената на терапији са малигним обољењима долази до великих осцилација INR-а али и честих тромботских догађаја и крвављења. Додатан и клинички важан проблем с варфарином се јавља код пацијената са малигним обољењима приликом припреме за хируршку интервенцију. Примена варфарина се мора обуставити неколико дана пре интервенције, које могу бити често непредвидиве, а разлог томе јесте одложен почетак деловања лека и успорен клиренс (71). Стога су спроведена истраживања која су показала да је примена LMWH (71) и ДОАК (72) безбеднија код ове групе пацијената него примена варфарина. Најзначајније нежељено дејство јесте крвављење а ризик од крвављења се повећава када је INR > 5 (69). У циљу спречавања крвављења користи се витамин К (фитонадион). Док се у јако хитним стањима могу се дати свежа смрзнута плазма или концентрат протромбинског комплекса (73).

Према мета-анализама рандомизираних истраживања, варфарин је показао да у већем проценту смањује ризик од можданог удара код пацијената са АФ у поређењу са плацебом (64%) и аспирином (40%). Међутим, ризик од крвављења се повећао (апсолутни ризик повећан 0,2%) док су узроци смрти смањени за 0,5% годишње (57). Такође, рандомизирана ВАФТА студија је утврдила да варфарин смањује ризик од можданог удара у поређењу са пацијентима који су били на терапији аспирином, код пацијената са АФ старијих од 75 година, док се ризик од крвављења и морталитета није значајно мењао (74).

1.4.4.1. Директни орални антикоагуланси (ДОАК)

Антагонисти витамина К (најчешће варфарин) и хепарини су били темељ антикоагулантне терапије док директни орални антикоагуланси (ДОАК) нису откривени и уведени у клиничку праксу. Мета за истраживаче који су се бавили овим лековима била је инхибиција тромбина (директни инхибитори тромбина као што су ксимелагатран и дабигатран етексилат) и инхибиција активаног фактора X (инхибитори фактора Xа као што су ривароксабан, апиксабан, едоксабан) (75).

Први покушај увођења директног инхибитора тромбина, ксимелагатрана, у праксу десио се 2004. године. Ксимелагатран представља пролек директног инхибитора тромбина, мелагатрана. Претклиничка испитивања су показала да има већу терпијску ширину од варфарина и предвидив антикоагулантни ефекат. Две године након тога повучен је из употребе због високе инциденце хепатотоскичности (76). Клиничке студије које су се бавиле испитивањем ксимелагатратрана су показале да се орални антикоагуланси могу користити у фиксним дозама, без потребе за редовном лабораторијском контролом (77). Неколико година касније, 2008. године, дабигатран је добио лиценцу од Европске Агенције за лекове (ЕМА) на основу треће фазе клиничког истраживања која се бавила превенцијом венског тромбоемболизма код пацијената са индикацијом за ортопедску операцију (78-80). Две године касније, превенција можданог удара код пацијената са невалвуларном АФ постаје нова индикација за дабигатран (81). С друге стране, први директни инхибитор фактора Xа, ривароксабан је одобрен за употребу 2008. године на основу резултата треће фазе RECORD студије за лечење ДВТ. Поред тога, регистрован је 2011. године у Европи и САД за превенцију можданог удара и системског емболизма код пацијената са АФ на основу ROCKET-AF студије док је за сада само у Европи регистрован за лечење ДВТ на основу треће фазе EINSTEIN студије (82, 83).

За разлику од варфарина, ДОАК имају повољније фармакокинетичке особине, бољу ефикасност и безбеднији профил. ДОАК представљају погодну алтернативу варфарина због мањег броја интеракција са храном и лековима јер делују само на један

фактор коагулације. Иако је ризик од крвављења мањи у поређењу са варфарином, постоје стања (предозирање или трауматска повреда) када је неопходно применити антидот (84). У мају 2018. године одобрен је антидот за директне (ривароксабан и апиксабан) као и за индиректне инхибиторе фактора Ха (фондапаринукс, ендоксапарин). Користи се приликом акутних и животно угрожавајућих крвављења. Наиме, антидот-андексанет алфа представља рекомбиновани фактор Ха који остварује своје дејство везивањем за инхибиторе фактора Ха чиме се спречава њихово деловање на ендогени фактор Ха, тј. поништава антикоагулантни ефекат ових лекова. Андексанет алфа се примењује у виду интравенске инјекције или инфузије. Доза се прерачунава на основу последње дате дозе ривароксабана/апиксабана и времена када је примењена последња доза. Време полу живота овог антидота је један сат. Међутим, два сата након престанка примене антидота ефекат се губи тј. долази до "rebound" феномена. Волумен дистрибуције износи око 5 литара док је средње време полу елиминације 5-7 часова. Употреба овог антидота је повезана са настанком уринарних инфекција или пнеумоније (85).

Приликом терапије директним инхибиторима тромбина тј. дабигатраном се могу јавити крвављења па је неопходно применити антидот, идаруцизумаб (Pradaxibind®). Идаруцизумаб представља фрагмент хуманог антитела који се везује само за молекул дабигатрана и неутралише његов ефекат без дејства на коагулациону каскаду. Примењује се интравенски и сматра се да доза од 5 mg може да неутралише активност свих форми дабигатрана (везаног за протеине, слободног или активне метаболите). Брзо остварује свој ефекат али након четири сата од примене у потпуности се елиминише из организма путем бубрега (86). Примена свеже смрзнуте плазме, концентрата протромбинског комплекса или рекомбинантни фактор Ха да би се антагонизовало дејство дабигатрана, није у потпуности испитана и разјашњена (87).

1.4.4.1.1. Индикације

Најчешћа индикација за употребу ДОАК јесте превенција можданог удара код пацијената са АФ/флатером. Такође се користи у превенцији и лечењу венског тромбоемболизма која се може манифестовати као ДВТ и/или ПЕ (88).

1.4.4.1.2. Дабигатран

Дабигатран етексилат представља пролек који се након оралне примене конвертује путем неспецифичног ензима јетре (микрозомалне карбоксиестеразе) преко два интермедијера, B1BR 1087 SE и B1BR 951 BS, до активне форме - дабигатрана. Механизам којим остварује дејство јесте селективна, реверзибилна и концентрацијски зависна инхибиција тромбина која последично ремети коагулациону каскаду, спречава конверзију фибриногена у фибрин, формирање угрушка и настанак тромба. За разлику од хепарина, дабигатран инхибира слободан и везан тромбин. Заправо, дабигатран се везује за активни домен тромбина те му није неопходан одређени фактор за његово деловање. Индикуван је у превенцији венског тромбоемболизма код пацијената након ортопедске операције (на основу RE-NOVATE, RE-MODEL, и RE-MOBILIZE студија), потом за превенцију можданог удара и системског емболизма код пацијената са АФ (на основу RE-LY студије) (78-81).

Након оралне примене дабигатран се брзо апсорбује из танког црева и његова апсолутна биорасположивост износи 6,5%. Апсорпција из гастроинтестиналног тракта је олакшана формулацијом капсула које садрже вишеструке пелете са омотачем направљеним од винске киселине. Међутим сматра се да је винска киселина одговорна

за диспепсију код 6-12% пацијената лечених дабигатраном. Након операције, максималне концентрације у плазми се постижу након шест сати а код здравих пацијента између 1,5-3 сати. Иако на биорасположивост дабигатран етексилата не утиче унос хране, храном се одлаже време постизања максималне концентрације лека у плазми за два сата (87, 88). Волумен дистрибуције за дабигатран износи 60-70 литара. Дозира се два пута дневно. Везује се за протеине плазме у релативно малом проценту (35%). Метаболизам дабигатрана је независтан од цитохрома P450, стога су интеракције с другим лековима ретке. С друге стране, серумска концентрација дабигатрана се повећава уколико је пацијент на терапији инхибиторима П-гликопротеина: верапамил, амјодарон и хинидин (87, 89). Главни пут елиминације дабигатрана јесте путем бубрега (80%), стога се не препоручује употреба код пацијената са реналном инсуфицијенцијом. Примена дабигатрана је контраиндикувана код пацијената са тешком инсуфицијенцијом јетре јер се 20% излучује путем жучи после конјугације у активне метаболите (89, 90). Најчешће нежељене реакције дабигатрана подразумевају диспепсију или гастроинтестинална крвављења (89).

Произвођач дабигатрана је дизајнирао 3 велика истраживања (RE-NOVATE, RE-MODEL, и RE-MOBILIZE) са циљем да се покаже ефикасност дабигатрана у превенцији венског тромбоемболизма (VTE) после ортопедске операције (78-80). У све три студије, дабигатран се показао као подједнако ефикасан и безбедан у поређењу са еноксапарином. Стопа обилних крвављења код пацијената са VTE била је слична са једним фаталним ретроперитонеалним крвављењем код пацијента на терапији дабигатраном (78). Приликом поређења дабигатрана (у дози од 150 mg два пута дневно) и варфарина, у RE-COVER студији примећено је да не постоји значајна разлика у инциденци поновног VTE (2,1% према 2,4%) или када је реч о обилним крвављењем (1,6% према 1,9%) (91).

У циљу превенције можданог удара или системског емболизма спроведена је RELY студија која је укључила 18 000 пацијената са невалвуларном АФ који су били на терапији дабигатраном (110 mg или 150 mg два пута дневно). Након двогодишњег праћења ових пацијената, закључено је да терапија дабигатраном у дози од 110 mg два пута дневно није обезбедила одговарајућу превенцију као што се постизало варфарином (стопа настанка можданог удара или системског емболизма 1,53% према 1,69%). Међутим терапија дабигатраном је довела до значајног смањења ризика од крвављења у односу на терапију варфарином (2,71%, у односу на 3,36%; $p < 0,01$). С друге стране, нижа стопа можданог удара и системског емболизма је примећена код пацијената на терапији 150 mg дабигатрана два пута дневно (1,11%) у односу на терапију варфарином (1,69%; $p < 0,001$) (92).

У другој фази RE-DEEM студије је примећена појава малих и великих крвављења као и смањење нивоа Д-димера код пацијената са акутним коронарним синдромом на терапији дабигатраном (50-150 mg два пута дневно) и на антиагрегационој терапији (аспирин, клопидогрел). Показано је да дабигатран значајно снижава ниво Д-димера у поређењу са плацебмом ($p < 0,001$) али је утврђено да се ризик од крвављења повећава у зависности од дозе (7,8% према 2,2%, $p < 0,001$) (93).

Стандардна доза дабигатрана у Европи и Сједињеним Америчким Државама (САД) за пацијенте са АФ или VTE са нормалном бубрежном функцијом износи 150 mg два пута дневно. Међутим када треба дати пацијенту нижу дозу, препоруке између ова два континента се разликују. У Европи код пацијената са повећаним ризиком од крвављења, старијим од 80 година, доза се мора смањити на 110 mg два пута дневно. У САД, пацијентима са АФ и клиренсом креатинина (CrCl) од 15-30 ml/min се препоручује доза од 75 mg на сваких 12 сати (94). Такође, примена дабигатрана није индикувана код пацијената са високим ризиком од крвављења или алергијом на

дабигатран. Од 2012. године, примена дабигатрана се не препоручује код пацијената са механичким протетичким срчаним записцима. Истраживање је прекинуто због велике инциденце можданог удара приликом примене дабигатрана упркос праћењу плазма концентрација које гарантују терапијске нивое лека. Стога варфарин остаје лек избора код ових пацијента (95). У неким студијама је показано да дабигатран има већу стопу крвављења у поређењу са варфарином (96, 97) док је у неким истраживањима стопа крвављења слична (98-100).

1.4.4.1.3. Ривароксабан

Ривароксабан, оксазолидинонски дериват, је први орални директни инхибитор фактора Ха. Иреверзибилном инхибицијом фактора Ха спречава се преводње протромбина (фактор II) у тромбин (фактор IIa) који је неопходан за претварање фибриногена у фибрин. Интересантно је да се ривароксабан везује за фактор Ха, слободан и везан за угрушак. Инхибитори фактора Ха су јако корисни у фази амплификације с обзиром да један молекул фактора Ха може да доведе до настанка хиљаду молекула тромбина. Ефикасност ривароксабана је повезана са примењеном концентрацијом лека. Иако ривароксабан нема директан ефекат на агрегацију тромбоцита, индиректно смањује тромбином изазвано формирање угрушка путем инхибиције фактора Ха (75, 101).

За разлику од дабигатрана, ривароксабан има високу биорасположивост (80%) након оралне примене у дози од 10 mg. Апсорпција се одвија брзо и максималне концентрације лека у плазми се постижу у року од два до четири сата. Биорасположивост ривароксабана примењеног у дози од 20 mg може се повећати уносом хране (75, 102). Волумен дистрибуције у равнотежном стању износи 50 литара. Ривароксабан се везује у високом проценту за протеине плазме (92-95%). Метаболизам зависи од цитохрома CYP3A4, CYP3A5, CYP2J2 и CYP-независних механизма. Такође представља супстрат за П-гликопротеин и ABCG2 (Vcsp) ефлукс транспортне протеине. Елиминација се обавља преко урина (2/3) и фецеса (1/3). Терминално време полуелиминације износи 5-9 сати док код старијих особа износи 11-13 часова. Захваљујући својим фармакокинетским и фармакодинамским карактеристикама, ривароксабан се примењује у фиксним дозама без потребе за рутинском контролом пацијената (103, 104).

Крвављење представља једно од нежељених дејстава ривароксабана. Сходно томе, нека истраживања су показала да је ризик од крвављења нижи код пацијената на терапији дабигатраном или апиксабаном што није случај приликом примене ривароксабана када се упореде са применом варфарина (105). Уочено је да лечење ривароксабаном (20 mg једном дневно) доприноси настанку интракранијалних и екстракранијалних крвављења приликом поређења са дабигатраном (150 mg два пута дневно) (106, 107).

У све четири претходно поменуте RECORD студије, ривароксабан је показао предност у односу на еноксапарин у превенцији ВТЕ, са релативно сличним ризиком од озбиљних крвављења (108-111). Улога ривароксабана у лечењу ВТЕ је испитана током три велике рандомизирани студије (EINSTEIN-DVT, EINSTEIN-PE, EINSTEIN-продужена студија). У првобитној EINSTEIN студији, ривароксабан (примењен у дози од 15 mg два пута дневно прве три недеље а потом 20 mg једном дневно) се доказао подједнако добар као и стандардна терапија (еноксапарин и варфарин). У EINSTEIN-продуженој студији ривароксабан од 20 mg дневно је био значајно ефикаснији у превенцији рекурентне венске тромбозе у поређењу са плацебом ($p < 0,001$). На основу треће фазе ове три велике студије ривароксабан је добио одобрење за лечење и

превенцију ДВТ и ПЕ. Када је реч о мањим и обимнијим крвављењима код пацијената са ВТЕ, није постојала значајна разлика међу пацијентима у ривароксабан групи и пацијената на стандардној терапији/плацебом. Међутим значајно смањење обимнијих крвављења је забележено у групи пацијената која је била на терапији ривароксабаном у поређењу са групом на стандардној терапији код пацијената са ПЕ (1,1% у односу на 2,2%) (83, 112).

На основу студије ROCKET AF одређена је доза за пацијенте са АФ. Пацијенти укључени у ову студију су били на терапији 20 mg ривароксабана дневно (или 15 mg уколико је клиренс креатинина од 30-49ml/min) или на терапији варфарином. Са аспекта превенције можданог удара или системског емболизма, ривароксабан није био супериорнији у поређењу са варфарином (2,1 % у поређењу са 2,4 %). Лака и тешка крвављења су се јавила код лечења ривароксабаном (14,9%) у односу на пацијенте који су на терапији варфарином (14,5%) на годишњем нивоу. Међутим приликом примене ривароксабана уочено је значајно смањење интракранијалних крвављења (0,5% према 0,7%) и по живот опасних крвављења (0,2% према 0,5%) (82).

Важно је споменути да је ривароксабан једини нови орални антикоагуланс за који је у Европи одобрена примена у секундарној превенцији акутног коронарног синдрома (АКС). Захтев је поднет на основу ATLAS ACS 2- TIMI студије која се бавила поређењем примене ривароксабана (2,5 и 5 mg два пута дневно) с плацебом код пацијената са АКС који су били на стандардној антиагрегационој терапији (аспирин, клопидогрел). Резултати студије су показали да ривароксабан примењен у дози од 2,5 mg, значајно смањује укупни и кардиоваскуларни морталитет ($p = 0,002$) (113).

Препоручена доза ривароксабана код пацијената са акутним ВТЕ је 15mg два пута дневно током прве три недеље третмана. Након три недеље терапије, пацијенти са АФ и пацијенти са ВТЕ прелазе на дозу од 20 mg дневно. Уколико пацијенти имају реналну инсуфицијенцију (клиренс од 30-49 ml/min), доза лека се мора смањити на 15 mg дневно код пацијената са АФ. Након великих ортопедских интервенција, тромбопрофилактичка доза ривароксабана износи 10 mg дневно (53). Употреба ривароксабана није индикована код пацијената млађих од 18 година и са тешком реналном дисфункцијом (клиренс креатинина <3 0ml/min) (83).

1.4.4.1.4. Апиксабан

Апиксабан је директни и селективни инхибитор фактора Ха, слободног или везаног за протромбиназу независно од антитромбина III. Оваквом инхибицијом се смањује стварање тромбина и даље превођење фибриногена у фибрин. Одобрен је за лечење АФ на основу ARISTOTLE истраживања, 2011. године (114).

У AVERROES и ARISTOTLE истраживања су укључени пацијенти са АФ са повећаним ризиком од можданог удара. AVERROES истраживање је прекинуто због јасне предности апиксабана над аспирином када је у питању превенција можданог удара и системског емболизма (1,6% у поређењу са 3,7%). Обимна крвављења јављају у обе групе у сличном проценту (1,2% према 1,4%) (115). У ARISTOTLE студији терапија апиксабаном је смањила стопу мозданог удара и системског емболизма у поређењу са терапијом варфарином (1,27% према 1,60%). Додатно стопа морталитета код пацијената на терапији апиксабаном је мања у односу на пацијенте на терапији варфарином. Пацијенти на терапији апиксабаном имају мању стопу крвављења у поређењу са пацијентима на терапији варфарином (2,13% у односу на 3,09%). Управо на основу ових истраживања уведена је стандардна доза од 5 mg код пацијената са АФ. Међутим, код пацијената старијих од 80 година, оних који имају телесну масу мању од

60 килограма или ниво серумског креатинина већи од 133 $\mu\text{mol/l}$ доза се мора смањити (116).

1.4.4.1.5. Едоксабан

Едоксабан је представник ДОАК-а који се од 2015. године користи за превенцију можданог удара код пацијената са АФ и третман акутне ВТЕ. Дејство остварује инхибицијом фактора Ха. Студија која се бавила пацијентима са АФ (ENGAGE AF-TIMI) обухватила је пацијенте на терапији едоксабаном од 60 mg или 30 mg (у случају да је $\text{CrCl} < 50 \text{ ml/min}$, телесна маса мања од 60 kg или су били на истовременој терапији инхибиторима П-гликопротеина (верапамил или хинидин)). Едоксабан се није показао ефикаснијим приликом превенције можданог удара или системског емболизма али је примећена мања стопа крвављења и смрти од кардиоваскуларних болести у поређењу са варфарином. Међутим, приликом примене веће дозе едоксабана, уочена је повезаност са већим процентом гастроинтестиналних крвављења у односу на терапију варфарином (117).

У ENSURE-AF студији едоксабан је успешније превенирао мождани удар, системску емболију, инфаркт миокарда и кардиоваскуларни морталитет од варфарин/еноксапарин терапије (118). Додатно, резултати HOKUSAI студије указују на то да је једна доза едоксабана ефикаснија од варфарина као и да је забележен мањи ризик од крвављења приликом примене едоксабана у односу на стандардну терапију (119). С друге стране, према истраживању *Rogoni* и сарадника, едоксабан није био супериорнији у превенцији можданог удара и системског емболизма код пацијента са невалвуларном АФ али је примећена смањена стопа интракранијалног крвављења. Стога, едоксабан представља исплативију алтернативу у односу на варфарин када је реч о овим пацијентима (120).

1.5. ТЕСТОВИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ ХЕМОСТАЗЕ

Терапија директним оралним антикоагулансима, укључујући дабигатран, ривароксабан, апиксабан и едоксабан, код пацијената са невалвуларном АФ се показала ефикаснијом и безбеднијом поређењу са стандардном дуготрајном терапијом (варфарином). У медицинским круговима влада консензус да приликом употребе директних оралних антикоагуланаса није обавезно рутинско лабораторијско праћење. С друге стране, истраживања су указала да постоји повезаност између високих концентрација ДОАК у плазми са крвављењем док је стопа можданог удара у директној корелацији са ниским концентрацијама ДОАК у плазми. Имајући то у виду, постоје стања за која је препоручено праћење терапије овим лековима: акутна/хронична бубрежна инсуфицијенција, трауме, хитне операције или инвазивне процедуре, недавни мождани удар, потенцијално увођење тромболитичке терапије, клинички значајно крвављење, примена антидота. Ниво ДОАК у плазми је корисно измерити код старијих особа, пацијената са екстремном телесном масом, гастроинтестиналним малабсорптивним поремећајем и сумњивих лек-лек интеракција (121-123). С обзиром да је употреба ДОАК све већа у клиничкој пракси, велики значај има контрола крвављења код пацијената и утврђивање који су лабораторијски тестови најпогоднији за праћење пацијената на терапији овим лековима.

Будући да су се током времена развијали различити тестови који могу помоћи у праћењу пацијената на терапији антикоагулансима, можемо их поделити на:

- Стандардне тестови хемостазе уз помоћ којих се може брзо утврдити присуство или одсуство лека (нпр. пре примене тромболитика или хитне операције)
- Квантитативне тестови (директно и индиректно мерење концентрације лека у крви)
- Тестови за одређивање глобалне хемостазе

1.5.1. Стандардни и специфични коагулациони тестови

1.5.1.1. Протромбинско време (РТ)

Протромбинско време (РТ) представља рутински коагулациони тест који служи за мерење активности спољашњег и заједничког пута коагулације, праћење дефицита фактора коагулације: II, V, VII, X, фибриногена као и за праћење пацијената који су на терапији оралним антикоагулансима. Почетком двадесетог века професор Арманд Квик је развио овај тест. Убрзо након тога примећен је недостатак ове методе који се огледао у добијању вредности протромбинског времена које варирају од лабораторије до лабораторије због коришћења различитих реагенаса (тромбопластина) и различитих инструмената (124, 125). Како би се превазишли недостаци Квикове методе, 15 година касније, Пуел Оврел је представио комбиновани тромбопластин (Тромботест). Оврелова метода се користи у Скандинавским земљама, земљама Бенелукса и Јапану (125). Тада се протромбинско време изражава у односу на време коагулације код здравих пацијента (% од стандардне вредности). С друге стране, за Квикову методу се не може извршити оваква врста калибрације. Због претходно наведене интерлабораторијске варијабилности, у циљу прецизнијег одређивања протромбинског времена, Светска Здравствена Организација (СЗО) је 1983. године увела интернационални нормализовани однос (INR). Заправо, да би се резултати изразили преко INR-а, неопходно је било израчунати интернационални индекс сензитивности (ISI) за сваку комбинацију реагенса и инструмента. INR се израчунава према формули:

$$\text{INR} = [\text{Пацијентов РТ} / \text{Средња вредност РТ}]^{\text{ISI}}$$

Средња вредност РТ представља геометријску средину РТ добијену на основу резултата најмање 20 здравих испитаника оба пола. Терапеутски опсег за већину индикација код пацијената на оралној антикоагулантној терапији износи 2,0-3,0. Једноставност, исплативост и доступност су неке од предности овог теста. Међутим мана ове методе јесте коришћење различитих реагенаса тј. тромбoplastина који могу да реагују са инактивним факторима коагулације и изазову потешкоће приликом калибрације (126, 127).

Литература нам указује на то да терапија ривароксабаном највише утиче на продужење вредности протромбинског времена у поређењу са другим инхибиторима фактора Ха (апискабан, едоксабан). Иако примена ривароксабана доприноси концентрацијски зависном продужењу протромбинског времена, употреба различитих тромбoplastина утиче на крајње резултате. Резултати варирају због различите сензитивности тромбoplastина на ривароксабан. Стога се препоручује да се овај тест користи само код пацијената на терапији ривароксабаном у хитним ситуацијама уз употребу најсензитивнијих реагенаса (123, 128). С друге стране, референтне вредности РТ се могу детектовати чак и при терапијским концентрацијама дабигатрана у крви. Из тог разлога протромбинско време није метода избора пацијената на терапији дабигатраном (128).

1.5.1.2. Активирано парцијално тромбoplastинско време (аРТТ)

Активирано парцијално тромбoplastинско време (аРТТ) представља тест који се користи за праћење активности унутрашњег и заједничког пута коагулације крви. Уједно се употребљава за праћење дефицита многих фактора коагулације: FXII, FXI, FX, FIX, FVIII, FV, FII и фибриногена. аРТТ је тест избора за пацијенте са конгениталним и наследним поремећајима крвављења, са лупусом антикоагулансом или пацијенте који су на антикоагулантној терапији (хепарином или хирудином). Педесетих година 20. века осмишљен је аРТТ тест који се заснива на формирању угрушка у плазми. Заправо аРТТ представља време које је неопходно да се изврши процес коагулације приликом додавања ендогеног фосфолипида: цефалина и калцијум хлорида. Осам година касније, овај тест је модификован како би се смањило варирање резултата (129).

Данас се за мерење аРТТ-а користе следећи реагенси: фосфолипиди (који су замена за тромбоците јер се користи тромбоцитима сиромашна плазма) и активатор (суспензија негативно наелектрисаних честица каолина или силике) без калцијум хлорида. Каолин се везује директно за фактор XII доводећи до преласка у XIIa који даље цепа фактор XI до XIa али у одсуству калцијума, активација наредног фактора није могућа. Активатори који се чешће користе аутоматизовану методу подразумевају употребу микронизоване силике и елагинске киселине (130). Недостатак ове методе је у томе што вредности аРТТ-а зависе од инструмената и реагенаса који се користе. Стога свака лабораторија мора да утврди нормалан опсег за који се сматра да је близу средине аРТТ од око 30 секунди (127).

аРТТ може да омогући квалитативно одређивање активности дабигатрана. Нека истраживања су показала линеарну корелацију концентрације дабигатрана у плазми и вредности аРТТ-а при концентрацијама лека у плазми већим од 200 ng/ml. Међутим, сензитивност овог теста зависи од реагенса и коагулометра који отежавају тумачење резултата. Такође у неколико студија је показано да је аРТТ у оквиру референтних

вредности у присуству ниских концентрација лека. С друге стране, повезаност концентрације ривароксабана у плазми и вредности аРТТ-а је слаба и зависна од реагенаса (123, 126, 127).

1.5.1.3. Течна хроматографија са масеном спектрометријом (LC-MS/MS)

Течна хроматографија представља технику за раздвајање компоненти сложених смеша на основу разлике у њиховој расподели између стационарне и мобилне фазе. Најчешће се користи за анализу нестабилних и термолабилних поларних анализа. Мобилна фаза у течной хроматографији може бити течна док стационарна фаза може бити течна или чврста. Узорци који се испитују морају бити претходно растворени у одговарајућем растварачу а потом се под високим притиском пуштају кроз колону. Појам ретенционо време представља време које је потребно да нека компонента смеше прође кроз колону при одређеним условима. Како би се постигло успешно раздвајање компоненти, мора се одабрати одговарајућа колона, добро дефинисати састав и проток мобилне фазе као и температура колоне. Генерално посматрано, ограничење хроматографије представља недовољна прецизност приликом идентификације компонента смеше која се заснива на поређењу ретенционих времена стандардних супстанци и састојака смеше (131, 132).

Масена спектрометрија представља аналитичку методу којом се постиже одвајање наелектрисаних честица на основу односа масе и наелектрисања. Метода се обавља под сниженим притиском како би се смањило међусобно реаговање јона, распршивање и неутрализација. Најчешће коришћена техника јонизације јесте електроспреј јонизација која је користи за јонизацију неиспарљивих и термонестабилних једињења. Као резултат добијају се јони узорка одвојени од растварача тј. протонирани или депротонирани молекули узорка у зависности од електричног поља. Анализа једињења са малом молекулском масом се олакшава овим типом јонизације. Међутим, масени спектри треба да буду довољно специфични да би идентификација била сигурна. Други проблем је представљала детекција ниских концентрација узорка у комплексним матрицама (131, 132).

Течна хроматографија са масеном спектрометријом (LC-MS/MS) представља златни стандард за одређивање концентрације лека у плазми. Комбинацијом течне хроматографије и масене спектрометрије превазиђени су недостаци ових метода када се користе појединачно. Кључна предност ове методе се огледа у високој селективности и сензитивности као могућности испитивања широког спектра супстанци мале и велике молекулске тежине. На ову технику не утиче ниво коагулационих фактора, присуство лупус антикоагуланса или преаналитичке варијабле. Додатно је показано да дабигатран, ривароксабан и аписксабан остају стабилни и након три месеца чувања на -20°C. Међутим уколико у припреми узорка не постоји корак концентровања узорка, сензитивност је ограничена на 1 ng/ml што је довољно за детектовање лекова и важних хормона. Неспецифичност расте када активни и инактивни метаболити неког лека имају идентичне молекулске масе. Најчешће се користи за квантификацију лекова, праћење терапијских концентрација лекова што је лекарима од великог значаја ради бољег разумевања равнотеже између крвављења и тромбоемболијских догађаја. Међутим ова техника одређивања концентрације ДОАК се не употребљава за рутинско праћење концентрације лекова јер мали број лабораторија има целодневни приступ овом апарату као и високо стручно особље (127, 133, 134).

1.5.1.4. Специфични коагулациони тестови

Сви стандардни коагулациони и хромогенски специфични есеји се заснивају на мерењу једне тачке која означава време згрушавања или цепања специфичног субстрата. У специфичне коагулационе тестове за детекцију специфичних лекова се убрајају тромбинско време у разблаженој плазми, време згрушавања екарина и екарин хромогени есеј, анти-IIIа хромогени есеј за дабигатран као и анти-Ха хромогени есеј за ривароксабан. Хромогени есеји имају добар аналитички профил и корелирају одлично са концентрацијом лека у плазми мереном помоћу LC-MS/MS. Додатно, ови тестови не пружају информације о динамици коагулације и фибринолизе што је један од недостатака (135-137).

Када говоримо о тромбинском времену у разблаженој плазми (dTT) онда мислимо на једноставан, брз и сензитиван квантитативан метод за мерење концентрације директних инхибитора тромбина у плазми. У односу на стандардни тест мерења тромбинског времена, код тромбинског времена у разблаженој плазми се нормална пулована плазма помеша са разблаженом тест плазмом док се као иницијатор реакције користи хумани α -тромбин. Ранија истраживања су показала да постоји линеарна повезаност концентрације дабигатрана у плазми (у опсегу од 50-500 ng/ml) и тромбинског времена у разблаженој плазми. Предност ове методе је та што се може изводити на различитим коагулометрима (138).

Екарин представља металопротеиназу која цепа протромбин на меизотромбин. Време згрушавања екарина (ECT) је метода која се користи за мерење активности дабигатрана и показује линеарну корелацију са концентрацијом дабигатрана у плазми. Модификацијом ове методе, настала је нова метода која је независна од фибриногена, названа екарин хромогенски тест (ЕСА), који такође показује линеарну корелацију са веома ниским (<50 ng/ml) и терапијским концентрацијама дабигатрана од 47-943 ng/ml. Примећена је повезаност између анти-IIIа хромогеног есеја и екарин хромогенским тестом у узорцима пацијената који су примали дабигатран (138).

За одређивање нивоа инхибитора фактора Ха (ривароксабан, апиксабан, едоксабан) у крви, може се користити анти-Ха хромогени есеј са одговарајућим калибраторима. Уочена је линеарна повезаност овог теста са концентрацијом ривароксабана у плазми. Приликом ниских концентрација ривароксабана, прецизност се смањује. У односу на конвенционалне тестове, на овај не утичу преаналитички фактори и ниво коагулационих фактора. Међутим проблем може бити недоступност свим болницама као и да примена хепарина утиче на резултате ове методе. Стога се не могу користити код истовремене примене или примене терапије премешавања хепарином (128, 138).

1.5.2. Глобални тестови хемостазе

Глобалним хемостатским тестовима се испитује могућност интеракције компоненти хемостазе. Иако су ови тестови познати деценијама, нове технологије су омогућиле једноставнију примену и корисне податке. Заправо, глобални хемостатски тестови одсликавају равнотежу и интеракције између свих компоненти хемостатског система током фазе иницијације, пропагације и инактивације. Идеалан глобални метод који може да детектује све врсте хипер- и хипокоагулабилности још увек није пронађен. Зато ова област представља значајну сферу интересовања научницима. Процес коагулације се код глобалних тестова најчешће изазива агенсима који садрже негативно наелектрисане партикуле (каолин, силика, елагинска киселина) или реагенсе који садрже ТФ. Најчешће коришћени и описани глобални хемостатски тестови су они

који се заснивају на мерењу целокупне количине и кинетике генерације тромбина током времена (ендогени тромбински потенцијал (ЕТР), калибрисана аутоматозована тромбографија (САТ)) или на одређивању стопе формирања фибрина и његове деградације из пуне крви (ТЕГ/РОТЕМ) или из плазме укупни хемостатски потенцијал (ОНР) (138-140).

1.5.2.1. Тест генерације тромбина (ТГТ)

Имајући у виду да тромбин представља кључни молекул у регулацији хемостатских процеса, метод којим се континуирано мери протеолитичка активност тромбина формираног у плазми помоћу хромогеног или флуоресцентног субстрата назива се тест генерације тромбина (ТГТ). Значај ТГТ-а се огледа у процени клиничког стања као и ефеката терапије код пацијената са поремећајем хемостазе (141). Први пут је описан 1953. године као пионирски рад *Macfarlane* и *Biggs*. Да би се покренуо процес коагулације, плазми или пуној крви су се додавали ТФ или цефалин (извор фосфолипида) са калцијум хлоридом. У епруветама које су садржале фибриноген, праћено је време које је неопходно да узорак коагулише. Добијена времена коагулације су даље коришћена да би се конструисала калибрациона крива из које се одређивала активност тромбина. Потом је 1986. године Хемкер извршио измене тиме што је заменио фибриноген хромогеним субстратом специфичним за тромбин, увођењем дефибринације плазме змијским отровом пре тестирања и софтвера који израчунава параметре из криве настанка тромбина (тромбограма). Неколико година касније извршена је промена од великог значаја када је хромогени субстрат замењен флуоресцентним субстратом. Коришћењем хромогеног субстрата, који се помоћу тромбина разлаже на п-нитроанилин, неопходна је дефибринација плазме док увођењем флуоресцентног субстрата тај процес није неопходан (142, 143).

Најчешће су у употреби ендогени тромбински потенцијал (ЕТР) где се користи хромогени субстрат и калибрисана аутоматозована тромбографија (САТ) код које се користи флуоресцентни субстрат. Као резултат ових анализа настаје тромбограм и могу се израчунати релевантни параметри. Најважнији параметри тромбограма јесу:

- време у минутима/секундама од додавања окидача коагулације до почетка стварања тромбина (lag time),
- максималан ниво тромбина (nmol/L или %),
- време постизања максималног нивоа тромбина (минути/секунде)
- површина испод криве која се дефинише као ендогени тромбински потенцијал – ЕТР (изражен као nmol/L тромбина у минути или %) (142).

Време до почетка стварања тромбина заправо представља време коагулације у традиционалним коагулационим тестовима, али је много осетљивије јер је систем разблаженији. Пик представља највећу концентрацију тромбина која може настати. Време до постизања пика представља брзину настанка тромбина. Неки пацијенти постижу пик брже или спорије што одсликава хипокоагулабилност или хиперкоагулабилност. ЕТР представља укупну количину тромбина у плазма узорку која се ствара током присуства про и антикоагуланаса. Може бити тестирана плазма сиромашна и богата тромбоцитима (144).

ТГТ је веома осетљив на промене температуре стога услови морају бити оптимални. Супстанце које се додају као покретачи коагулације су много пута разблажене у односу на оне који се користе у стандардним методама (нпр. ТФ у ТГТ је разблажен 1:5000 да би се постигла концентрација од 1 pmol/L. Фосфолипиди су слични онима који се користе у аРТТ анализи али се примењују у мањој концентрацији. Фактори који утичу на резултате јесу начин прикупљања узорка, обрада и чување

истих. Током ових процеса може доћи до активације контактних фактора (фактор XII, кининоген мале молекуле масе и прекаликреин). Преостали тромбоцити у плазми могу да утичу на резултате ТГТ. Због њихове релативно мале густине, може доћи до повећања тромбocита у плазми уколико је брзина центрифугирања релативно мала. Циклус одмрзавања и замрзавања такође може утицати на ТГТ резултате (142-144).

1.5.2.2. Тромбоеластографија (TEG)

Путем тромбоеластографије се могу добити информације о динамици стварања угрушка, почевши од стварања до раста угрушка, еластичности угрушка и полимеризације фибрина у узорку пуне крви. Сматра се да пружа комплетну слику хемостатског потенцијала јер прати фазе коагулације и фибринолизе. Ова метода се изводи из узорка пуне крви али се у експерименталне сврхе може користити и плазма. Постоје две врсте апарата помоћу којих се може изводити тромбоеластографија: аутоматизована тромбоеластографија (TEG®) и ротациона тромбоеластометрија (ROTEM®). Подаци који се добијају из узорка пуне крви сталним праћењем вискозно-еластичних карактеристика у процесу стварања и деградације угрушка. Резултати се не могу поредити међусобно иако обе врсте апарата мере сличне параметре али постоје разлике у извођењу теста.

Параметри који се прате применом TEG®:

- R-време коагулације,
- K-брзина коагулације,
- α -кинетика полимеризације фибрина,
- MA-максимална амплитуда,
- CL-време лизе коагулума.

ROTEM® методом прате:

- CT- време коагулације,
- CFT-време формирања коагулума,
- α -кинетика полимеризације фибрина,
- MFC- максимална чврстина коагулума,
- ML- максимална лиза коагулума.

Једину препреку у обављању ове методе може представљати прикупљање и чување узорака, јер се морају узорци пуне крви употребити у року од 8 сати од венепункције (140, 145, 146).

Претходна *in vitro* истраживања су показала да дабигатран и ривароксабан имају дозно-зависни антикоагулантни ефекат на параметре есеја стварања тромбина у плазми (147). Затим, *ex vivo* студија спроведена на здравим испитаницима је показала да се lag time продужава, ETP и пик тромбина снижава након терапије ривароксабаном и дабигатраном (148). Према нашим сазнањима, само једна пилот студија се бавила поређењем антикоагулантне активности ривароксабана и дабигатрана али на малом броју пацијената и само једном дозном режиму (149).

1.5.2.3. Укупни хемостатски потенцијал (ОНР)

Укупни хемостатски потенцијал (ОНР) представља једноставан и брз глобални хемостатски тест који за разлику од других глобалних тестова омогућава праћење завршне фазе коагулације (стварање фибриноског угрушка) као и приступ процени коагулационе и фибринолитичке активности. Тест се заснива на понављаном спектрофотометријском мерењу нивоа фибрина у цитратној плазми која је сиромашна тромбоцитима а у коју су додате мале количине тромбина за активирање коагулације као и ткивног активатора плазминогена (t-РА) за активацију фибринолизе. Процеси у којима се приказује прелазак фибриногена у фибрин уз помоћ тромбина као и плазминогена у плазмин се представља кривом. Свака вредност апсорбанце (Abs) представља ниво фибрина у зависности од времена, а површина испод криве у испитиваном периоду означава равнотежу између генерације и протеолизе фибрина (ОНР). Друга површина испод криве стварања фибрина код плазме без ендогеног t-РА, представља укупни коагулациони потенцијал (ОСР). Разлика између ове две површине представља укупни фибринолитички потенцијал који се израчунава преко следећег обрасца: $(ОСР-ОНР)/ОСР \times 100$ (150).

На самом почетку развијања овог теста, користила се финална концентрација егзогеног тромбина од 0,2 IU/ml. Потом су извршене многе корекције концентрације тромбина, фосфолипида, t-РА. У ранијој методи су се вредности апсорбанце мериле сваког минута у току 40 минута на таласној дужини од 405 nm. Данас се ОНР тест спроводи помоћу микротитарске плоче и *ELISA* читача у року од сат времена на таласној дужини од 405 nm. На сваких 12 секунди се читавају вредности апсорбанце а прерачуни даље врше у Microsoft Excel програму (139, 150).

Ранија истраживања су отворила могућност коришћења ОНР теста код пацијената на терапији антикоагулансима. Овај тест се показао као добар за праћење хемостатске равнотеже након инјекције далтепарина код трудница са претходном ДВТ. (151). Смањене вредности ОНР-а су примећене код пацијената на терапији хепарином током операције уградње бајпаса (152). Такође, уочено је снижење вредности ОНР параметра код пацијената са ДВТ у току третмана хепарином и варфарином приликом поређења са здравим појединцима (139).

За разлику од тромбоеластографије, ОНР метода се изводи из узорака плазме а не пуне крви. Иако је брза, једноставна и исплатива метода, није комерцијално доступна. Стога је од великог значаја спровести истраживања користећи ову методу.

Узимајући о обзир претходно наведене чињенице, утицај ривароксабана и дабигатрана на глобалне хемостатске тестове још увек није у потпуности истражен. Иако је само неколико истраживачких група поредило ефекте глобалних хемостатских тестова са индиректно мереном концентрацијом ДОАК и даље нема довољно студија које се баве повезаношћу глобалних хемостатских тестова и директно мерене концентрације ДОАК помоћу LC-MS/MS, као и клиничких карактеристика пацијената са невалвуларном атријалном фибрилацијом.

II

**ЦИЉЕВИ
СТУДИЈЕ**

2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

1. Проценити место, улогу и значај тестова глобалне хемостазе (ЕТР, САТ и ОНР) у одређивању хемостатског потенцијала код пацијената са атријалном фибрилацијом на терапији ДОАК.
2. Испитати да ли су тестови глобалне хемостазе (ЕТР, САТ и ОНР) погодни за праћење терапије ДОАК код пацијената са атријалном фибрилацијом.
3. Испитати да ли концентрације ДОАК у плазми корелирају са тестовима глобалне хемостазе (ЕТР, САТ и ОНР), коагулационим методама (РТ и аРТТ) и клиничким карактеристикама пацијената са атријалном фибрилацијом.
4. Испитати повезаност тестова глобалне хемостазе (ЕТР, САТ и ОНР) и коагулационих метода (РТ и аРТТ) са клиничким карактеристикама пацијената са атријалном фибрилацијом који су на терапији ДОАК.
5. Утврдити на који начин тестови глобалне хемостазе (ЕТР, САТ и ОНР) одсликавају хемостатски капацитет у поређењу са плазма концентрацијом код појединачних пацијената са атријалном фибрилацијом на терапији ДОАК.
6. Утврдити који се од параметара глобалних хемостатских тестова (ЕТР, САТ и ОНР) може употребити као добар показатељ концентрације ДОАК у плазми, код пацијената са атријалном фибрилацијом, која је довољно ниска за безбедно извођење неких клиничких интервенција (нпр. тромболиза).

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ И ПОПУЛАЦИЈА

Ова клиничка проспективна, опсервациона студија пресека је спроведена у складу са принципима Хелсиншке Декларације и принципима Добре клиничке праксе. Студија је одобрена од стране Регионалног Етичког одбора у Стокхолму. Сви испитаници су дали усмени и писани пристанак пре самог почетка студије.

У ову студију је уључено сто седамдесет и два испитаника, из амбулантне кардиолошке клинике у Стокхолму, који су подељени у следеће групе:

- I група – контролна група, здрави испитаници (n=70)
- II група – пацијенти са дијагностикованом невалвуларном АФ који су на терапији дабигатраном 110/150 mg два пута дневно (n=14/36);
- III група – пацијенти са дијагностикованом невалвуларном АФ који су на терапији ривароксабаном 15/20 mg једном дневно (n=12/40);

Критеријуми за укључивање пацијената:

- пацијенти са дијагностикованом пароксизмалном или хроничном невалвуларном атријалном фибрилацијом,
- пацијенти са CHA₂DS₂-VASc скором најмање 1,
- пацијенти на терапији дабигатраном у дози од 110/150 mg два пута дневно,
- пацијенти на терапији ривароксабаном у дози од 15/20 mg једном дневно
- пацијенти који су праћени најмање 12 месеци док је континуирани третман ривароксабаном или дабигатраном трајао најмање 3 месеца пре укључивања у студију.

Критеријуми за искључивање пацијената:

- пацијенти са дијагностикованом валвуларном атријалном фибрилацијом (реуматска болест залисака, најчешће митрална стеноза или механички срчани залисци),
- пацијенти који су на терапији другим антиромботским лековима (антиромбоцитна терапија)
- пацијенти са перзистентном атријалном фибрилацијом припремљени за кардиоверзију.

Демографске и клиничке карактеристике као што су кардиоваскуларне болести и пропратна терапија су узети како од пацијената тако и из њихових медицинских картона. Бубрежна функција је процењена преко брзине гломеруларне филтрације (GFR) коришћењем *Cockcroft-Gault*-ове формуле. Тромбоемболијски ризик за сваког пацијента је израчунат коришћењем CHA₂DS₂-VASc скорa (Табела 1).

Табела 1 . Процена тромбоемболијског ризика путем CHA₂DS₂-VASc скорa

Слово	Фактор ризика	Скор
C	Конгестивна срчана болест/Дисфункција ЛК	1
H	Хипертензија	1
A₂	≥75 година	2
D	Диабетес мелитус	1
S₂	Мождани удар/ТИА/тромбо-емболизам	2
V	Васкуларне болести*	1
A	65-74 година	1
Sc	Пол (мушки, женски)	1
	Укупно	9

Конгестивна срчана болест/Дисфункција ЛК значи да је ејекциона фракција ЛК<40%. Хипертензија обухвата пацијенте који су тренутно на терапији антихипертензивима. *претходни инфаркт миокарда, периферна артеријска болест, аортни плак.

ЛК-лева комора, ТИА-транзиторни исхемијски удар

3.2. УЗОРКОВАЊЕ

Након дијагностиковања невалвуларне АФ, спроведено је узимање узорака крви ујутру, најмање 10 сати после узимања хране приликом рутинске посете пацијената тј. $3 \pm 2,07$ сати након последње дозе ДОАК. Крв је узета венепункцијом из регије кубиталне вене у вакутајнер епрувете које садрже 0,109 М натријум цитрата (Venosafe®, Tegimo, Belgium). Узорци су центрифугирани у што краћем временском периоду тј. у временском интервалу од 60 минута од узимања крви. Након 20 минута центрифугирања на 2000 g, добијена је плазма сиромашна тромбоцитима а затим подељена на делове од 500μl и замрзнута на температури од -80°C (153). Пре спровођења коагулационих тестова плазма је била загрејана 5 мин на температури од 37°C.

3.3. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Лабораторијске анализе су спроведене у Лабораторији за клиничку фармакологију као и Лабораторији за клиничку хемију, Каролинска болнице у Стокхолму.

3.3.1. Индиректно одређивање концентрације у плазми помоћу коагулационих стандардних метода

3.3.1.1. Активирано парцијално тромбoplastинско време (аРТТ)

аРТТ анализа је спроведена коришћењем Automate® реагенса (Diagnostica Stago, Asnieres, France) на Sysmex® CS2100i апарату (Sysmex, Kobe, Japan). У овој методи се врши инкубација цитратне плазме са реагенсом Actin FS на 37° C. Actin FS се састоји од пречишћеног сојиног фосфатида у елагиној киселини са додатком пуфера. Додавањем калцијум хлорида се покреће процес коагулације а добијени резултати су изражени у секундама. Нормалним вредностима аРТТ-а се сматрају оне које су ≤ 40 секунди. Заправо метода се изводи тако што се 50 μ l узорка и 50 μ l претходно наведеног реагенса пипетирају у кивету. Потом следи њихова инкубација током 190 секунди ради површинске активације коагулације, након чега се додаје 50 μ l калцијум хлорида за почетак реакције. Време згрушавања се бележи када се испуне посебни кинетички критеријуми. Интервал мерења износи: 15-600 секунди.

Лажно продужено аРТТ време се јавља приликом:

- потешкоћа при узимању узорка (нпр. спор проток крви)
- превисоких концентрација цитрата уколико се узме недовољно крви
- дугог чувања узорка пре мерења,
- ниског садржаја фибриногена
- мале запремине узорка која може повећати деградацију фактора коагулације што доводи до промене у рН вредности плазме
- тестирања замрзнутог узорка

Извори грешака који могу да дају лажно скраћено аРТТ време:

- потешкоће при узимању узорка (нпр. спор проток крви)
- делимично коагулисан узорак крви услед лоше мешавине цитрата у крви
- период након операције (коагулациони систем је активиран због оштећења ткива)
- терапија емцикумабом (хуманизовано моноклонско антитело), хемоглобин

3.3.1.2. Протромбинско време (PT-INR)

PT-INR се одређује уз помоћ Owren-овог реагенса SPA+® (Diagnostica Stago, Asnieres, France) на Sysmex® CS2100i апарату (Sysmex, Kobe, Japan). Owren-ов реагенс садржи ткивни тромбoplastин и говеђу плазму (без фактора коагулације II, VII, X). Време формирања угрушка зависи од нивоа фактора II, VII, X код пацијента, приликом мешања цитратне плазме/цитратне крви и пуфера.

Измерено време згрушавања се преводи у PT-INR уз помоћ криве калибрације која показује однос између времена згрушавања и INR-а. Калибрациона крива је

линеарна након логаритма PT-INR и других вредности. Такође, сваки инструмент мора бити калибрисан. Вредност PT-INR представља однос између времена коагулације узорка и нормалног времена коагулације. Заправо, процес мерења започиње пипетирањем 7 μ l узорка и 43 μ L пуфера у кивету. Потом се узорци са пуфером инкубирају на 37° C током 40 секунди. Након тога се додаје 50 μ L Owgen-овог реагенса а после 30 секунди и 50 μ l калцијум хлорида. Интервал мерења износи 200-600 секунди. Нормалним вредностима PT-INR се сматрају оне које су < 1,2. Уколико се примете угрушци у епрувети треба узети нови узорак. Сви лиофилизирани реагенси треба да се реконституишу у течности на собној температури. У супротном, постоји ризик да ће протеини формирати такозване хладне преципитате, које је веома тешко растворити. Препоручује се да се цитратни пуфер не пипетира директно из боце да би се избегла контаминација. Присуство дефектних облика протромбина и фактора X може потенцијално инхибирати реакцију. Супстанце као што су хепарин, етилендиаминтетрасирћетна киселина (ЕДТА) и витамин К могу утицати на коначни резултат.

3.3.2. Директно одређивање концентрације ДОАК у плазми

3.3.2.1. Течна хроматографија са масеном спектрометријом (LC-MS/MS)

Концентрација дабигатрана у плазми је измерена помоћу течне хроматографије са масеном спектрометријом (LC-MS/MS). Ова биоаналитичка метода је спроведена према водичу Управе за храну и лекове (154). Дабигатран је купљен од Alsachim-a, Strasbourg, France, док је дабигатран-д3- (интерни стандард) потребан од Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada. У 50 μ l плазме је додато 150 μ l ацетонитрила који садржи интерни стандард. Након брзог мешања и центрифугирања плазме, извршено је двоструко разблаживање са мобилном фазом А након чега је узорак благо протресен и поново центрифугиран. Три микролитара финалног екстракта је убризгано у LC-MS/MS систем. Хроматографско одвајање узорка се постиже уз помоћ Acquity UPLC ВЕН колоне (Shield RP18, 2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m) коришћењем градијентног протока мобилне фазе А (10 mM амонијум формат рН 4.5) и мобилне фазе Б (0.1 % мравља киселина у ацетонитрилу). Узорци су се детектовали помоћу Waters Quattro Premier ХЕ масеног спектрофотометра који ради у режиму електроспреј јонизације. Одабрано је праћење реакције са јонским прелазима 472 \rightarrow 289 m/z за дабигатран и 475 \rightarrow 292 m/z за интерни стандард. Време за анализе је износило 3 минута. Калибрациона крива за дабигатран у плазми је линеарна у опсегу од 1,1–412 ng/mL. Узорци који су изван овог опсега су разблажени нормалном пулованом плазмом ради тачније квантификације. Граница детекције је подешена на <0,5 ng/mL. Нису уочени пикови који ометају ретенциона времена дабигатрана или интерног стандарда. Пост-колонско додавање анализата (дабигатран и интерни стандард) коришћено је за испитивање ефеката супресије јона из плазме. Није примећена значајна супресија јона код ретенционог времена узорка. Експерименти су проверени са три нивоа контролних узорака (8, 202 и 393 ng/mL) у три различите ситуације путем шест мерења по концентрацијама. Добијена варијабилност унутар теста се кретала између 6% и 9% и варијабилност између тестова од -0,9% и 3,6%.

Концентрација ривароксабана у плазми код пацијената је измерена помоћу LC-MS/MS методе коришћењем ривароксабан-д4 (интерни стандард). Метода се води прописима из Водича из Европске медицинске агенције (155). Ривароксабан и интерни стандард су наручени од Selleck Chemicals, Houston, TX, USA, и Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada. 50 μ l плазме пацијената је припремљено са метанолом који

садржи интерни стандард. Узорци су центрифугирани и 100 μl супернатанта је пренесено и разблажено са 50 μl мобилне фазе А (0,1 % мравља киселина). Седам микролитара финалног екстракта је убризгано у систем. Узорци се одвајају уз помоћ Asquity ВЕН колоне (C18, 1,7 μm , 2,1 \times 50 mm, Waters, Milford, MA, USA) коришћењем градијентног протока мобилне фазе А и Б (ацетонитрил), Узорци се детектују у режиму позитивне електроспреј јонизације у одабраном праћењу реакције са јонским прелазима 436 \rightarrow 231 and 440 \rightarrow 148 m/z за ривароксабан и интерни стандард. Калибрациона крива плазме је била линеарна у опсегу 2,0–500 ng/ml. Варијабилност унутар теста је била испод 9,44% док је варијабилност између тестова била од -1,88% до 0,33%.

3.3.3. Глобални хемостатски тестови

3.3.3.1. Тест за мерење ендогеног тромбинског потенцијала (ЕТР)

Тест за одређивање ендогеног тромбинског потенцијала (ЕТР) (само за истраживачке сврхе; Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) је спроведен на BCS[®] XP апарату према инструкцијама произвођача (Siemens). *Innovance ETP* тест кит садржи ЕТР реагенс (инхибитор агрегације фибрина, хромогени супстрат, соли и стабилизатор), ЕТР пуфер (Tris-HCl 0,05 M, рН 7,4) и калцијум хлорид (0,25 M). Рок трајања ЕТР тест кита износи 12 сати на собној температури, 48 сати у фрижидеру или 4 недеље у замрзивачу (-20 °C) а може се одмрзнути једном у воденом купатилу максимално 5 минута на 37 °C и треба се искористити у року од осам сати. *Dade Innovin* реагенс садржи лиофилизоване реагенсе, између осталог, рекомбинантни хумани ТФ и тромбопластин. Aktin FS (AFS) садржи фосфолипиде соје и зеца са активном елагинском киселином.

ЕТР се одређује кинетиком трансформације синтетског тромбинског супстрата, која се мери као испорука хромофора у узорку плазме на таласној дужини 405 nm. Формирање тромбина у узорку се активира ЕТР реагенсом и калцијум хлоридом. Кинетика конверзије супстрата се мери BCS[®] XP апаратом (**Слика 1**). За исправљање активности α 2-макроглобулина везаног за тромбин, користи се математички алгоритам. Из криве стварања тромбина се мери четири параметра (**График 1**):

1. ЕТР (укупни ендогени тромбински потенцијал изражен у %),
2. t-lag (време у секундама од додавања окидача коагулације до почетка стварања тромбина изражено у секундама),
3. c-max (максимална продукција тромбина изражен у %),
4. t-max (време постизања максималне концентрације тромбина изражено у секундама).

Коефицијенти варијације за ЕТР тест унутар теста и између тестова износе 4,6% и 4,9% редом (156). Мерни опсег за ЕТР параметар износи 20-800 mA (0-200%) док је за c-max параметар 20-800 mA/min (0-200%). Референтни интервали су одређени на основу узорака 30 здравих испитаника и износе за ЕТР параметар: 349,4 - 515,6 mA (87 - 128%) и c-max параметар: 112 - 163,6 mA/min (82 - 119%).

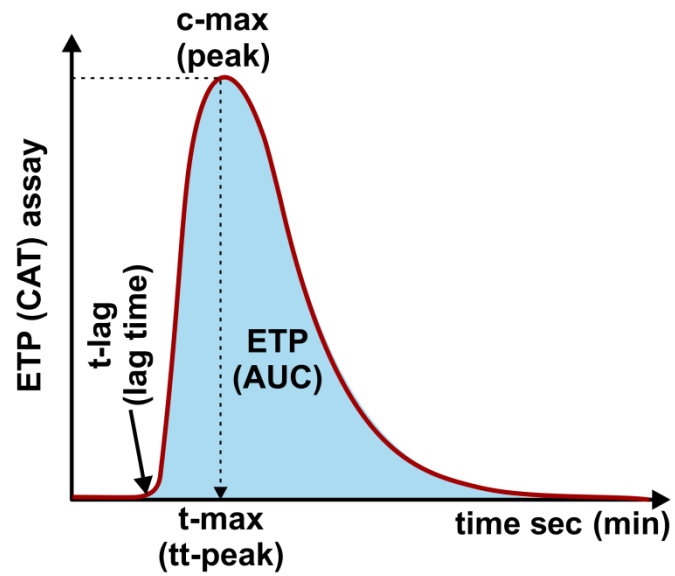


График 1. Параметри тестова: ендогени тромбински потенцијал (ЕТР) и калибрисана аутоматозована тромбографија (САТ)



Слика 1. Оригинална фотографија BCS® XP апарата за колорифотометријско одређивање ендогеног тромбинског потенцијала

3.3.3.2. Калибрисана аутоматозована тромбографија (САТ)

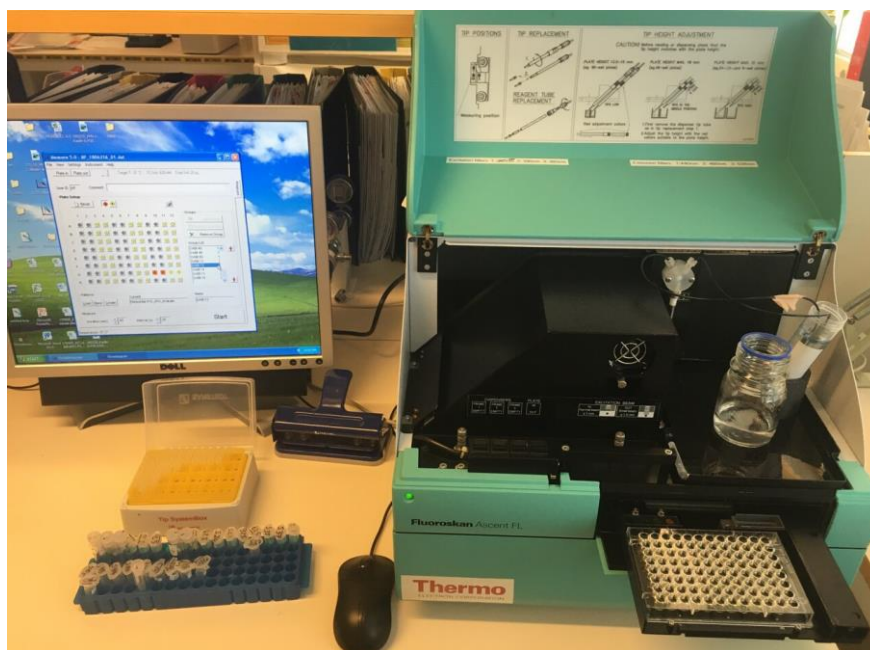
Одређивање методе, калибрисане аутоматозоване тромбографије се врши на начин који је описао *Hemker* са сарадницима (157). Анализа се изводи на Fluoroscан Ascent читачу (Thermo Thermolabsystems, Helsinki, Finland) (Слика 2) помоћу микротитарске плоче. За спровођење методе неопходни су Fluo-Buffer, PPP реагенс, тромбин калибратор и FluCa-кит. Један μl PPP реагенса (мешавина фосфолипида и ТФ) се раствори у једном ml дејонизоване воде. Калибратор тромбина представља мешавину цитратног пуфера, говеђих протеина и сахараида. Припрема се на исти начин као и PPP реагенс. FluCa-кит се прави додавањем $40 \mu\text{l}$ Fluo-Substrate (флуорогенски субстрат) у бочицу Fluo-Buffer-а (са калцијум хлоридом).

У претходно загрејану микротитарску плочу се стави $20 \mu\text{l}$ PPP реагенса и калибратора а потом се додаје $80 \mu\text{l}$ плазме. Након инкубације од 10 минута и испирања система водом додаје се FluCa-кит. Потом почиње мерење параметара а крива стварања тромбина се израчунава помоћу софтвера, Thrombinoscope (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) верзија: V5.0.0.742.

Продукција тромбина може бити праћена у интервалу од сат времена при чему се добијају следећи параметри (График 1):

- lag time (време од почетка анализе до детекције стварања тромбина изражено у минутима)
- peak (пик концентрације тромбина изражен у nM);
- AUC (површина испод криве концентрација-време, ендогени тромбински потенцијал изражен у $\text{nM}\cdot\text{min}$);
- tpeak (време од почетка продукције тромбина до постизања максималне концентрације тромбина изражено у минутима)

Коефицијенти варијације унутар теста и између тестова за ендогени тромбински потенцијал тј. AUC параметар у САТ анализи износе 2,3% и 9,5% редом.



Слика 2. Оригинална фотографија Fluoroscан Ascent читача (Thermo Thermolabsystems, Helsinki, Finland)

3.3.3.3. Укупни хемостатски потенцијал

Укупни хемостатски потенцијал представља глобалну методу која се заснива на мерењу агрегације фибрина што се представља као површина испод криве. Одређује се из плазме сиромашне тромбоцитима која садржи мале количине егзогеног тромбина и ткивног активатора плазминогена (tPA). Тромбин остварује своју улогу тако што претвара фибриноген у фибрин док ткивни активатор плазминогена доводи до стварања плазмина који разграђује фибрин. Равнотежа између синтезе и разградње фибрина се приказује површином испод криве која се израчунава на основу суме свих апсорбанци (Abs-sum) добијених понављаним спектрофотометријским мерењем. Заправо, се добијају две криве агрегације фибрина а потом се израчунавају две површине испод криве:

- укупни хемостатски потенцијал (ОНР, tPA додат)
- укупни коагулациони потенцијал (ОСР, без tPA).

Разлика између ова два параметра представља укупни фибринолитички потенцијал (ОФР) који се израчунава на основу следеће формуле:

$$[(\text{ОСР}-\text{ОНР}) / \text{ОСР}] \times 100\% \text{ (График 2).}$$

Пре почетка експеримента, крв се одмрзне на воденом купатилу на температури 37°C у трајању од 5-7 минута. Тест се изводи на микротитарској плочи (*Immulon-1B; Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA*) у коју се додаје 20µl фосфолипидног реагенса, који садржи синтетички фосфатидилсерин, фосфатидилхолин и сфингомијелин (*Rossix, Mölndal, Sweden; 0.11 mmol/L*) разблаженог са tris-HCl пуфером (pH = 7,5; 66mmol/L TRIS; 130mmol/L NaCl; 4M HCl) у односу 1:1 (конц. 0,25mmol/L). Након тога додаје се 140µl плазме, док се као контрола користи пулована нормална плазма (*PNP – pooled normal plasma*). Припреми се тромбин (конц. 10U/ml) и t-PA (конц. 0,1mg/ml). Од направљених раствора тромбина и t-PA добијају се два финална пуфера: (1) тромбин (конц. 0,04U/ml) и t-PA (300ng/ml) додавањем претходно направљеног раствора (tris-HCl пуфер и 1mol/L CaCl₂) (конц. 34mmol/L). Апсорбанца се читава на 405 nm, сат времена, на сваких 12 секунди, при чему се конструише крива агрегације фибрина. Вредност се читава спектрофотометријски на елиза читачу *Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific* приказаном на **Слици 3**. Површина испод криве се израчунава као сума свих вредности апсорбанце (Abs-sum) (139).

Тромбоцитни реагенс (*Unicorn Diagnostics Ltd, London, UK*) који представља лиофилизовани препарат тромбоцитне мембране, се реконституише у три ml дестиловане воде. Број фосфолипида тромбоцитне мембране је пропорционалан броју тромбоцита 70 x 10⁹/ ml док садржај ткивног фактора износи 40 pg/ml. Реконституирани реагенс се чува на температури од -70°C у малим запреминама. Радни пуфери се спремају *ex tempore*. Tris пуферу (66 mmol/L Tris + 130 mmol/L NaCl, pH 7,5 прилагођен са 4 mol/L HCl) се додаје калцијум хлорид (коначна концентрација 35 mmol/L). Tris пуфер I се прави додавањем говеђег тромбина (коначна концентрација 0,1 IU/ml) и ткивног активатора плазминогена (коначна концентрација 862 ng/ml). Tris пуфер II се добија додавањем говеђег тромбина (коначна концентрација 0,1 IU/ml). Први се користи за одређивање ОНР-а док се други користи за одређивање ОСР-а.

Коефицијенти варијације за ОНР есеј између тестова и унутар теста износе 8,6% и 5,2%, редом. Распон нормалних вредности за параметар ОНР износи 4,24-14,49, за ОСП од 6,79 до 20,03 док је за ОФП параметар 16,5-52%. За израчунавање параметара се користи Microsoft Excel програм.

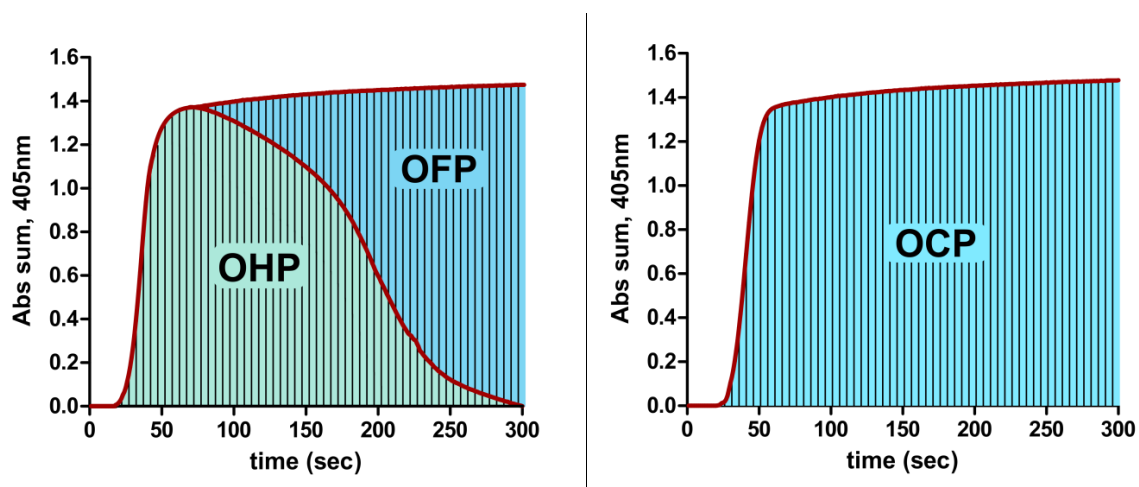
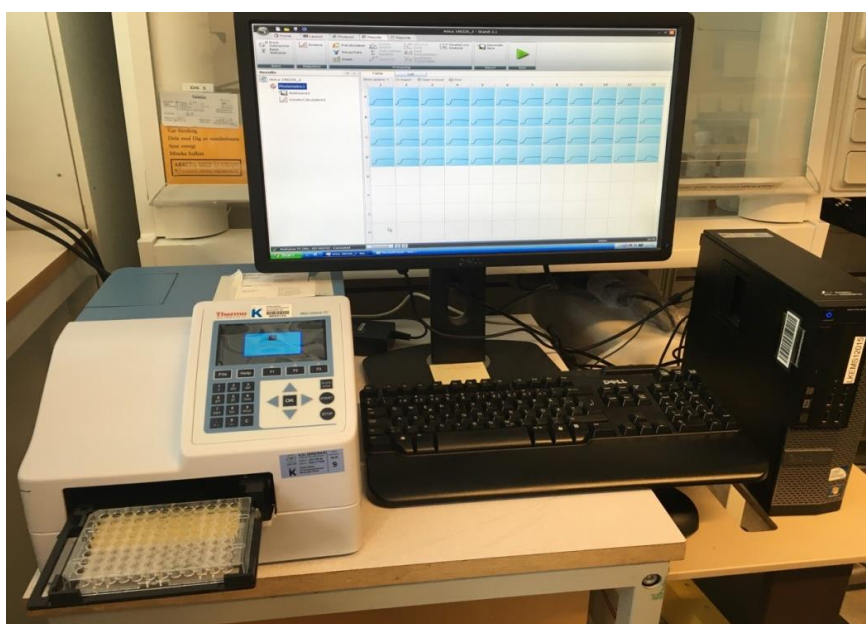


График 2. Параметри ОНР теста. ОНР- укупни хемостатски потенцијал, ОСП- укупни коагулациони потенцијал, ОФП-укупни фибринолитички потенцијал



Слика 3. Оригинална фотографија *Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific*, апарата за читавање вредности укупног хемостатског потенцијала

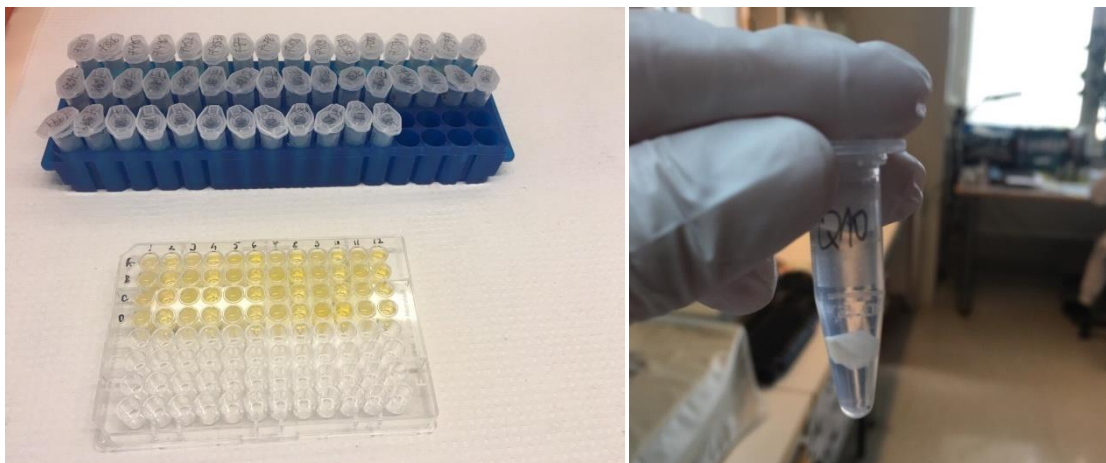
3.3.3.4. Анализа формирања угрушка (турбидиметријски подаци)

Равнотежа између стварања угрушка и фибринолизе указује на тромботски потенцијал након васкуларне повреде. Васкуларно оштећење се јавља са развојем кардиоваскуларних болести. Густина фибринског угрушка као и стопа фибринске полимеризације и деградације, се може одредити помоћу турбидиметријских тестова, према методи коју је описао Carter са сарадницима (158). На овај начин ближе можемо да опишемо угрушак који се формира као и сам процес коагулације.

Параметри који се могу одредити из турбидиметријског теста јесу:

- *lag_time* - време током кога се ствара довољно протофибрила да би се омогућила латерална агрегација, тј. време у коме се дешава експоненцијални пораст апсорбанце;
- *Max_Abs* - максимална апсорбанца, која представља повећање вредности апсорбанце од почетних до максималних вредности;
- *Slope* – нагиба, најстрмији део криве агрегације фибрина; показује бочну агрегацију и фазу формирања влакана
- *Lag_Abs_Avrg* – просечна вредност апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до *lag time* (времена када се формира довољно протофибрила за детекцију);
- *Max_Abs-Lag_Abs* – апсорбанца која се добија одузимањем вредности *MaxAbs* (максималне апсорбанце) и *Lag Abs Avrg* (просечне вредности апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до *lag time*);
- *Max_Abs_time* – време када се постиже максимална апсорбанца;
- *Slope_time* – време које се добија одузимањем *Max_Abs_time* (време када се постиже максимална апсорбанца) и *lag_time* (време када се формира довољно протофибрила за детекцију).

Параметри се добијају коришћењем Microsoft Excel програма.



Слика 4. Оригинална слика формирања фибринског угрушка

3.3.4. Снага студије и величина узорка

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публикованих истраживања која су проучавала ефекте ДОАК код пацијената са атријалном фибрилацијом (149). За прорачун је коришћен *t*-тест за независни узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0,05 и снаге студије 0,8 (бета грешка 0,2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (*G Power 3*).

Узимајући у обзир резултате наведене студије, прорачунато је да је потребно најмање по 10 пацијената за све наведене групе, односно по 10 пацијената са дијагностикованом атријалном фибрилацијом у експерименталним групама и 10 испитаника у контролној групи.

3.3.5. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података коришћен је програм *SPSS 21.0* (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.) и *GraphPad Prism 8* (Version for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA). Дистрибуција података је одређена помоћу *Shapiro–Wilk* и *Kolmogorov-Smirnov* тестова. Резултати су приказани као аритметичка средина \pm стандардна девијација (SD), медијана, ранг, 95% интервал поверења (CI) или проценат у зависности од дистрибуције података.

За тестирање разлика између параметара користио се Студентов *t*-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Уколико је утврђено да постоји статистички значајна разлика између група користио се *Bonferroni* тест како би се испитало између којих група се појавила статистички значајна разлика. Вредности $p < 0,05$ се сматрају статистички значајним, док вредности $p < 0,01$ се сматрају високо статистички значајним.

Spearman-ов коефицијент корелације је коришћен за праћење корелације између испитиваних варијабли. У циљу одређивања параметра који је најадекватнији за праћење антикоагулантног ефекта ривароксабана и дабигатрана при нижим концентрацијама ових лекова, коришћена је анализа Receiver operating characteristic (ROC) крива.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

Први део резултата нашег истраживања се односи на демографске и клиничке карактеристике испитиваних група, контролне и група пацијената са атријалном фибрилацијом који су били на терапији директним оралним антикоагулансима (ривароксабан или дабигатран). Такође, пацијенти су оцењени према скали за процену тромбоемболијског ризика. У овом делу резултата представљени су и коморбидитети пацијената као и придружена терапија са циљем да се утврди да ли су повезани са ефектима антикоагулантне терапије.

У другом делу резултата, су представљени подаци следећих анализа: директно одређивање концентрације ривароксабана и дабигатрана у плазми испитаника помоћу LC-MS/MS, стандардни лабораторијски рутински тестови (PT-INR, aPTT), глобални хемостатски тестови (EPT, CAT и ОНР) као и турбидиметријска анализа испитиваних група и подгрупа.

У трећем делу резултата приказане су корелације концентрације ривароксабана или дабигатрана у плазми са параметрима претходно испитиваних тестова као и клиничких карактеристика пацијената са невалвуларном атријалном фибрилацијом на терапији ДОАК.

Четврти део резултата осликава ефекте директних оралних антикоагуланса (ривароксабана и дабигатрана) на глобалну хемостазу код индивидуалних пацијената.

У петом делу овог поглавља приказани су параметри глобалних хемостатских тестова (EPT, CAT и ОНР) који се могу употребити као добар показатељ концентрације директних оралних коагуланаса у плазми која је довољно ниска за безбедно извођење неких клиничких интервенција (нпр. тромболиза) код пацијената са атријалном фибрилацијом.

4.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА

4.1.1. Демографске карактеристике испитаника

Просечна старост пацијената на терапији ривароксабаном износила је $74,42 \pm 6,70$ година, код пацијената који су примали дабигатран $73,56 \pm 7,65$ година док су здрави испитаници били значајно млађи у односу на обе експерименталне групе ($51,37 \pm 8,29$ година). Пацијенти на терапији ривароксабаном или дабигатраном су били значајно виши и са значајно смањеном бубрежном функцијом у односу на здраве испитанике ($p < 0,05$) (Табела 2).

Генерално посматрано, бубрежна функција је била слабија код пацијената на терапији ривароксабаном у поређењу са пацијентима који су примали дабигатран. Пацијенти на терапији дабигатраном су имали статистички значајно већу телесну масу од пацијената који су примали ривароксабан као и од здравих испитаника ($p < 0,05$). Испитанике у групи која је примала ривароксабан и контролној групи су чиниле жене у већем проценту док је мушки пол био доминантнији у групи третираној дабигатраном. Није уочена статистички значајна разлика у процени тромбоемболијског ризика између пацијената на терапији ривароксабаном и дабигатраном тј. вредности CHA2DS2-VASc скорa се нису значајно разликовале (Табела 2).

Табела 2. Демографске и клиничке карактеристике пацијената са скалом за процену тромбоемболијског ризика у испитиваним групама

Група (број пацијената)	Контрола (70)	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
Старост, године	$51,37 \pm 8,29^{ab}$	$74,42 \pm 6,70$	$73,56 \pm 7,65$
Пол, женски (%)	49/70 (70%)	33/52 (63,5%)	14/50 (28%)
Телесна маса (kg)	$71,75 \pm 13,68^b$	$77,12 \pm 15,60$	$81,34 \pm 18,06^c$
Телесна висина (cm)	$165,54 \pm 5,93^{ab}$	$171,29 \pm 8,69$	$175,90 \pm 8,42$
CHA2DS2-VASc	/	$3,00 \pm 1,12$	$2,86 \pm 1,11$
GFR (ml/min)	$90,32 \pm 12,19^{ab}$	$63,63 \pm 18,24$	$68,78 \pm 14,38^c$

Подаци су представљени као аритметичка средина \pm SD или проценти; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$. ^a – разлика између групе третиране ривароксабаном и контролне групе; ^b – разлика између групе третиране дабигатраном и контролне групе; ^c – разлика између групе третиране ривароксабаном и дабигатраном; GFR – брзина гломеруларне филтрације.

4.1.2. Демографске карактеристике испитаника на основу дозе ДОАК

Подгрупа пацијената на терапији ривароксабаном од 20 mg је била млађе старосне доби ($73,20 \pm 7,06$), са већом телесном масом ($79,95 \pm 15,42$) и висином ($180,55 \pm 49,82$) као и са нижим CHA2DS2-VASc скором ($2,70 \pm 0,99$) од групе која је примала 15 mg ривароксабана ($p < 0,05$). Пацијенти третирани нижом дозом дабигатрана (110 mg) су били старији ($81,07 \pm 6,13$), са мањом телесном масом ($70,21 \pm 13,30$) и висином ($171,57 \pm 8,36$) као са и већим CHA2DS2-VASc скором ($3,29 \pm 1,33$) од пацијената који су на терапији вишом дозом дабигатрана (150 mg) ($p < 0,05$).

Такође, уочена је смањена бубрежна функција код пацијената на нижој дози испитиваних директних оралних антикоагуланаса (15 mg ривароксабана и 110 mg

дабигатрана) у поређењу са већом дозом (20 mg ривароксабана и 150 mg дабигатрана) ($p < 0,05$). Више од 50% испитаника који су примали обе дозе ривароксабана (15/20 mg) су чиниле жене док су мушкарци били заступљени у већем проценту када је реч о пацијентима који су били на терапији обе дозе дабигатрана (110/150 mg) (Табела 3).

Табела 3. Демографске и клиничке карактеристике пацијената са скалом за процену тромбоемболијског ризика у испитиваним подгрупама

Група (број пацијената)	Ривароксабан 15 mg (12)	Ривароксабан 20 mg (40)	Дабигатран 110 mg (14)	Дабигатран 150mg (36)
Старост, године	78,50 ± 2,81	73,20 ± 7,06*	81,07 ± 6,13	70,64 ± 6,04 [#]
Пол, женски (%)	10/12 (83,3%)	23/40 (57,5%)	6/14 (42,85%)	8/36 (22,23%)
Телесна маса (kg)	67,67 ± 12,59	79,95 ± 15,42*	70,21 ± 13,30	85,67 ± 17,94 [#]
Телесна висина (cm)	165,42 ± 8,68	180,55 ± 49,82*	171,57 ± 8,36	177,58 ± 7,92 [#]
CHA2DS2-VASc	4,00 ± 0,95	2,70 ± 0,99*	3,29 ± 1,33	2,69 ± 0,98 [#]
GFR (ml/min)	50,25 ± 5,00	67,65 ± 9,14*	58,79 ± 15,2	72,67 ± 12,2 [#]

Подаци су представљени као аритметичка средина ± SD или проценти; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$. * – разлика између 15mg и 20mg ривароксабана; [#] – разлика између 110mg и 150mg дабигатрана; GFR – брзина гломеруларне филтрације.

4.1.3. Придружене болести пацијената и додатна терапија

Поред атријалне фибрилације, у нашем истраживању, испитаници су имали разне придружене болести самим тим и додатну терапију за лечење тих стања. Подаци о пацијентима су прикупљени детаљно са циљем укључивања пацијената који су на адекватан начин лечени (Табела 4).

Табела 4. Учесталост коморбидитета у обе експерименталне групе

Коморбидитети	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
Хипертензија	22/52 (42,3%)	25/50 (50%)
Дијабетес мелитус	3/52 (5,8%)	5/50 (10%)
Инфаркт миокарда	2/52 (3,8%)	0/50 (0%)
Срчана инсуфицијенција	3/52 (5,8%)	3/50 (6%)
Транзиторни исхемијски удар	0/52 (0%)	9/50 (18%)

Вредности су представљене као учесталост (%) у односу на укупан број пацијената у групи

У Табели 5. су издвојене групе лекова које су највише прописиване код испитиваних пацијената: антагонисти β -адренергичких рецептора, антагонисти Ca^{2+} канала, АСЕ инхибитори, статини, диуретици. Највећи проценат пацијената, чак 80%, је био на терапији антагонистима β -адренергичких рецептора у обе испитиване групе пацијената.

Табела 5. Најчешће групе лекова које су прописиване у обе експерименталне групе поред терапије директним оралним антикоагулансима (ривароксабан и дабигатран)

Група лекова	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
Антагонисти β -адренергичких рецептора	42/52 (80,8%)	40/50 (80%)
Антагонисти Ca^{2+} канала	4/52 (7,7%)	12/50 (24%)
АСЕ инхибитори	10/52 (19,2%)	19/50 (38%)
Статини	4/52 (7,7%)	21/50 (42%)
Диуретици	9/52 (17,3%)	6/50 (12%)

Вредности су представљене као учесталост (%) у односу на укупан број пацијената у групи

4.2. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

4.2.1.1. Директно одређивање концентрације ДОАК у плазми помоћу LC-MS/MS

Концентрација ДОАК у плазми одређена помоћу LC-MS/MS је значајно варијала у узорцима плазме код пацијената са АФ који су били на терапији ривароксабаном (2 ng/ml - 464 ng/ml). С друге стране, концентрације дабигатрана у плазми кретале су се између 4 ng/ml и 461 ng/ml. Поређењем ниже и више дозе ривароксабана (15 mg/20 mg) тако и дабигатрана (110mg/150mg), нисмо уочили значајну разлику у концентрацији у плазми мереној помоћу LC-MS/MS (Табела 6 и Табела 7).

4.2.1.2. Индиректно одређивање концентрације у плазми помоћу стандардних коагулационих метода

Примећено је значајно продужење вредности РТ-INR и аРТТ у групама које су биле на терапији ривароксабаном и дабигатраном у односу на контролну групу ($p < 0,01$) (Табела 6). Међутим, четири пацијента са концентрацијом ривароксабана у плазми између 168 и 205 ng/ml је имало нормалне вредности РТ-INR. Код пацијената на терапији дабигатраном, уочено је да четири пацијента имају нормалне аРТТ вредности, тачније три пацијента са концентрацијом дабигатрана у плазми испод 19 ng/ml и један пацијент са концентрацијом дабигатрана у плазми од 154 ng/ml.

Табела 6. Плазма концентрација измерена помоћу LC-MS/MS и коагулационе методе код испитиваних група

Група (број пацијената)	Контрола (70)	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
LC-MS/MS (ng/ml)	1,54-2,00	242,40-310,80	100,52-154,81
РТ-INR	0,97-1,05 ^{ab}	1,73-2,020	1,07-1,13
аРТТ (sec)	30,76-33,32 ^{ab}	41,90-46,70	53,94-62,06

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; ^a – разлика између групе третиране ривароксабаном и контролне групе; ^b – разлика између групе третиране дабигатраном и контролне групе; ^c – разлика између групе третиране ривароксабаном и дабигатраном; LC-MS/MS – течна хроматографија са масеном спектрометријом; РТ – протромбинско време; аРТТ – активирано парцијално тромбинско време.

Приликом поређења испитиваних подгрупа (различитих дозних режима ДОАК), није примећена статистички значајна разлика у вредностима концентрације ривароксабана и дабигатрана у плазми измерене помоћу LC-MS/MS и коагулационих метода (PT-INR и aPTT) (Табела 7).

Табела 7. Плазма концентрација измерена помоћу LC-MS/MS и коагулационе методе код испитиваних подгрупа

Група (број пацијената)	Ривароксабан 15 mg (12)	Ривароксабан 20 mg (40)	Дабигатран 110 mg (14)	Дабигатран 150mg (36)
LC-MS/MS (ng/ml)	176,60-331,89	244,79-323,11	78,18-163,95	95,10-165,24
PT-INR	1,49-2,14	1,73-2,06	1,03-1,80	1,06-1,13
aPTT (sec)	36,83-50,69	41,89-47,06	52,99-65,29	52,28-62,82

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; LC-MS/MS – течна хроматографија са масеном спектрометријом; PT – протромбинско време; aPTT – активирано парцијално тромбинско време

4.3. ГЛОБАЛНИ ХЕМОСТАТСКИ ТЕСТОВИ

4.3.1. ЕТР тест

Вредности параметара ЕТР методе (ЕТР, с-мах, t-lag и t-мах) код здравих испитаника и пацијената на терапији ривароксабаном или дабигатраном су приказане графички и табеларно (Табела 8, График 3А-Б).

Примена ривароксабана је довела до статистички значајног снижења ЕТР и с-мах вредности док су t-lag и t-мах параметри били значајно продужени у односу на здраве испитанике. Пацијенти који су примали дабигатран су такође имали значајно продужене вредности t-lag и t-мах параметара док су вредности параметара ЕТР и с-мах биле значајно снижене у поређењу са контролном групом. Запажене су значајно ниже вредности с-мах параметра у групи која је била на терапији ривароксабаном приликом поређења са пацијентима који су примали дабигатран. Поређењем пацијената на терапији ривароксабаном и пацијената који су примали дабигатран уочено је значајно продужење вредности параметара t-lag и t-мах ($p < 0,01$). Није примећена значајна разлика између групе која је третирана ривароксабаном и групе која је примала дабигатран приликом анализе ЕТР параметра (Табела 8, График 3А-Б).

Табела 8. Параметри ЕТР методе у испитиваним групама

Група (број пацијената)	Контрола (70)	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
ЕТР (%)	89,07-94,95 ^{ab}	75,40-80,71	68,88-79,83
ЕТР с-мах (%)	95,28-102,55 ^{ab}	58,04-65,05	64,54-74,24 ^c
ЕТР t-lag (sec)	20,57-22,04 ^{ab}	38,88-44,63	31,65-37,52 ^c
ЕТР t-мах (sec)	62,22-68,78 ^{ab}	122,91-147,10	84,77-94,92 ^c

Подаци су приказани као 95% интервали поверења статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; ^a – разлика између групе третиране ривароксабаном и контролне групе; ^b – разлика између групе третиране дабигатраном и контролне групе; ^c – разлика између групе третиране ривароксабаном и дабигатраном; ЕТР – ендогени тромбински потенцијал; с-мах – максимална концентрација тромбина; t-lag – време до почетка стварања тромбина; t-мах – време до максималне концентрације тромбина

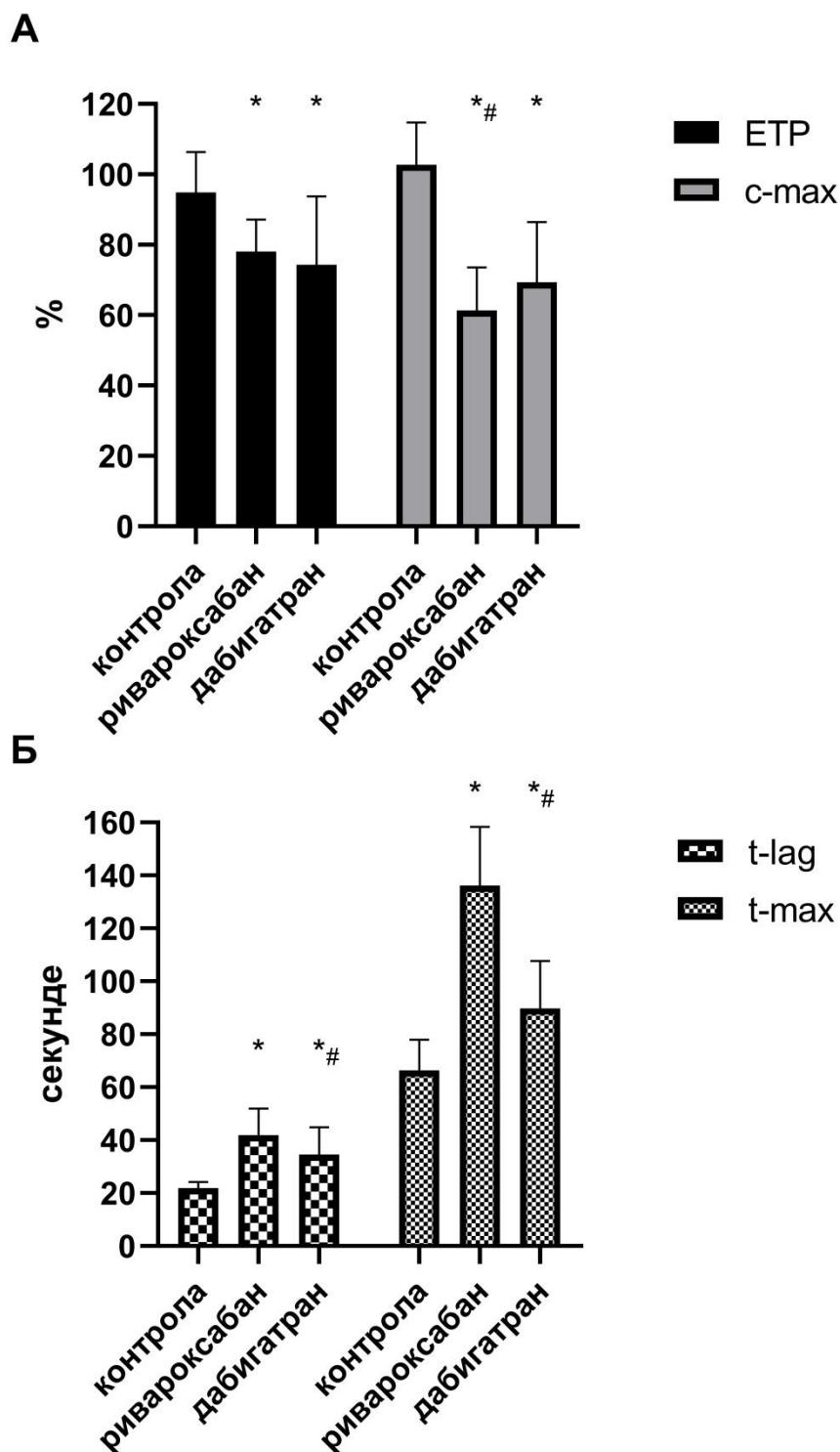


График 3. Параметри ЕТР методе у испитиваним групама; А – ЕТР и c-max параметри; Б – t-lag и t-max параметри; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне и експерименталних група (ривароксабан, дабигатран); # – разлика између групе третиране ривароксабаном и групе која је на терапији дабигатраном

Вредности параметара ЕТР методе (ЕТР, с-мах, t-lag и t-мах) пацијената на терапији обе дозе директних оралних антикоагуланаса (15/20 mg ривароксабана или 110/150 mg дабигатрана) и здравих испитаника су приказане графички и табеларно (Табела 9, График 4-6).

Поређењем оба дозна режима ривароксабана (15/20 mg) са контролном групом, примећене су статистички значајно ниже вредности ЕТР и с-мах параметара, као и продужење t-lag и t-мах код пацијената на терапији ривароксабаном. Примена 110 mg и 150 mg дабигатрана је довела до значајног снижења вредности ЕТР и с-мах параметара док су t-lag и t-мах параметри били продужени у поређењу са здравим испитаницима. Међутим, није дошло до значајне промене у параметрима ЕТР методе поређењем оба дозна режима унутар група које су третиране ривароксабаном и дабигатраном (Табела 9, График 4-6).

Табела 9. Параметри ЕТР методе у испитиваним подгрупама

Група (број пацијената)	ЕТР (%)	ЕТР с-мах (%)	ЕТР t-lag (sec)	ЕТР t-мах (sec)
Контрола (70)	89,07-94,95	95,28-102,55	20,57-22,04	62,22-68,78
Ривароксабан 15 mg (12)	72,26-83,44*	57,55-71,94*	34,19-47,76*	105,27-150,60*
Ривароксабан 20 mg (40)	75,04-81,05*	56,43-64,30*	39,06-45,38*	124,55-152,71*
Дабигатран 110 mg (14)	59,90-79,05*	56,75-73,43*	26,90-38,46*	88,25-106,18*
Дабигатран 150mg (36)	69,35-83,06*	65,01-77,12*	31,78-38,87*	80,87-93,09*

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg). ЕТР – ендогени тромбин потенцијал; с-мах – максимална концентрација тромбина; t-lag – време до почетка стварања тромбина; t-мах – време до максималне концентрације тромбина

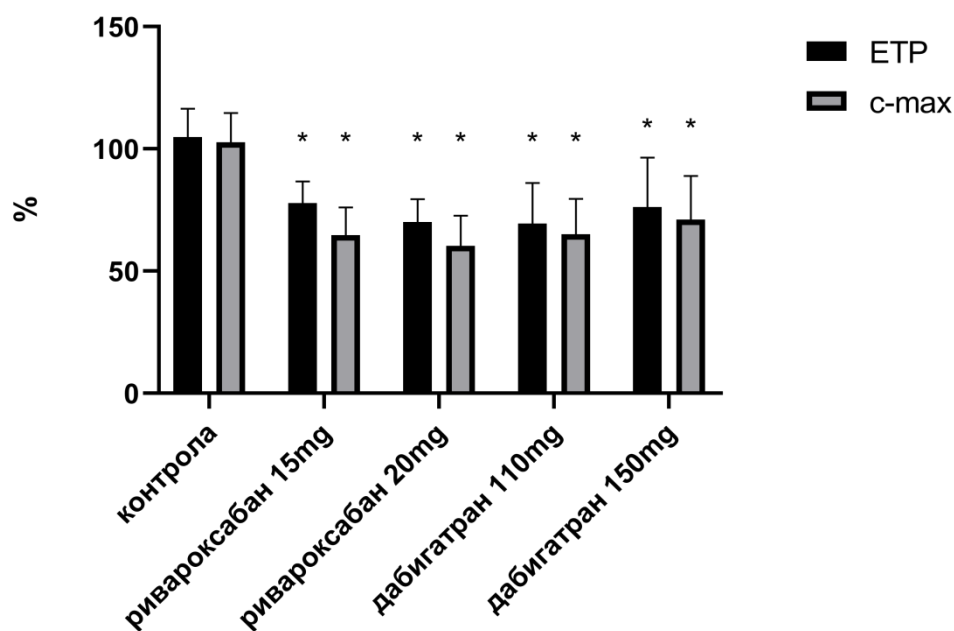


График 4. ETP и c-max параметри испитиваних подгрупа; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg).

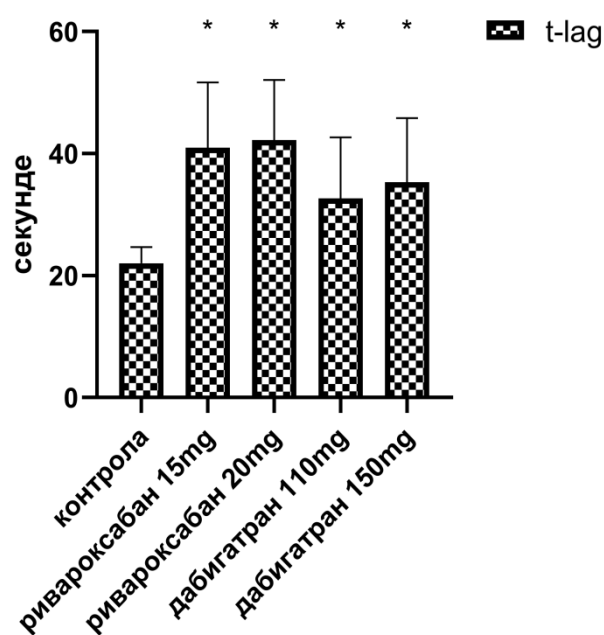


График 5. t-lag параметар испитиваних подгрупа; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg).

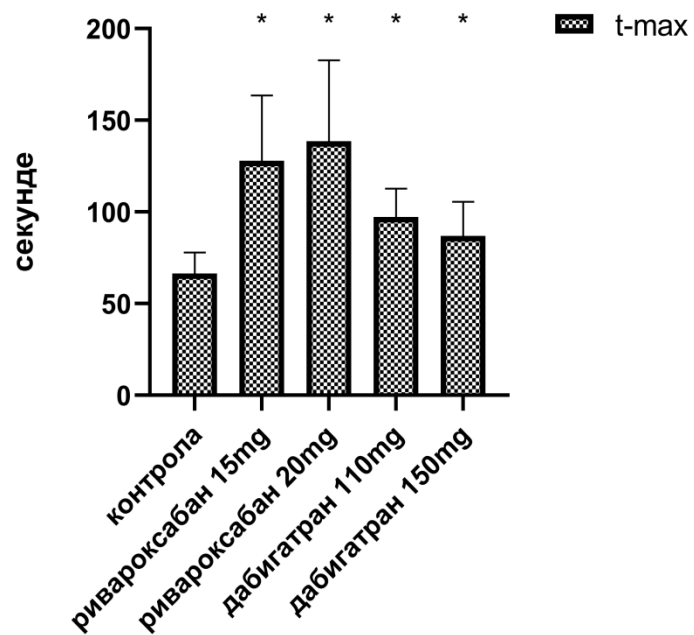


График 6. t-max параметар испитиваних погдруса; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg).

4.3.2. САТ тест

Вредности параметара САТ методе (AUC, peak, lag time и tpeak) код здравих испитаника и пацијената на терапији ривароксабаном или дабигатраном су приказане графички и табеларно (Табела 10, График 7 А-В).

Приликом терапије дабигатраном уочене су значајно веће вредности AUC и peak параметара у поређењу са здравим испитаницима. С друге стране, код пацијената на терапији ривароксабаном дошло је до статистички значајног снижења вредности peak параметра у поређењу са контролном групом. Међутим вредности AUC параметра се нису значајно промениле приликом примене ривароксабана. Запажено је продужење вредности lag time и tpeak параметара код пацијената који су примали ривароксабан или дабигатран у односу на контролну групу. Међутим, примена дабигатрана је довела до значајног повећања тј. продужења вредности параметара peak и lag time у поређењу са применом ривароксабана ($p < 0,01$) (Табела 10, График 7А-В).

Табела 10. Параметри САТ методе у испитиваним групама

Група (број пацијената)	Контрола (70)	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
САТ AUC (nM*min)	1535,35-1682,02 ^b	1312,61-1439,26	2929,64-3784,48 ^c
САТ peak (nM)	269,51-300,39 ^{ab}	64,67-79,63	507,72-711,37 ^c
САТ lag time (min)	2,71-2,89 ^{ab}	9,09-10,08	11,15-14,50 ^c
САТ tpeak (min)	5,50-5,97 ^{ab}	17,35-19,56	13,91-17,49 ^c

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; ^a – разлика између групе третиране ривароксабаном и контролне групе; ^b – разлика између групе третиране дабигатраном и контролне групе; ^c – разлика између групе третиране ривароксабаном и дабигатраном; AUC- површина испод криве; peak- пик концентрације тромбина; lag time-време до детекције тромбин продукције; tpeak- време до постизања пика концентрације тромбина

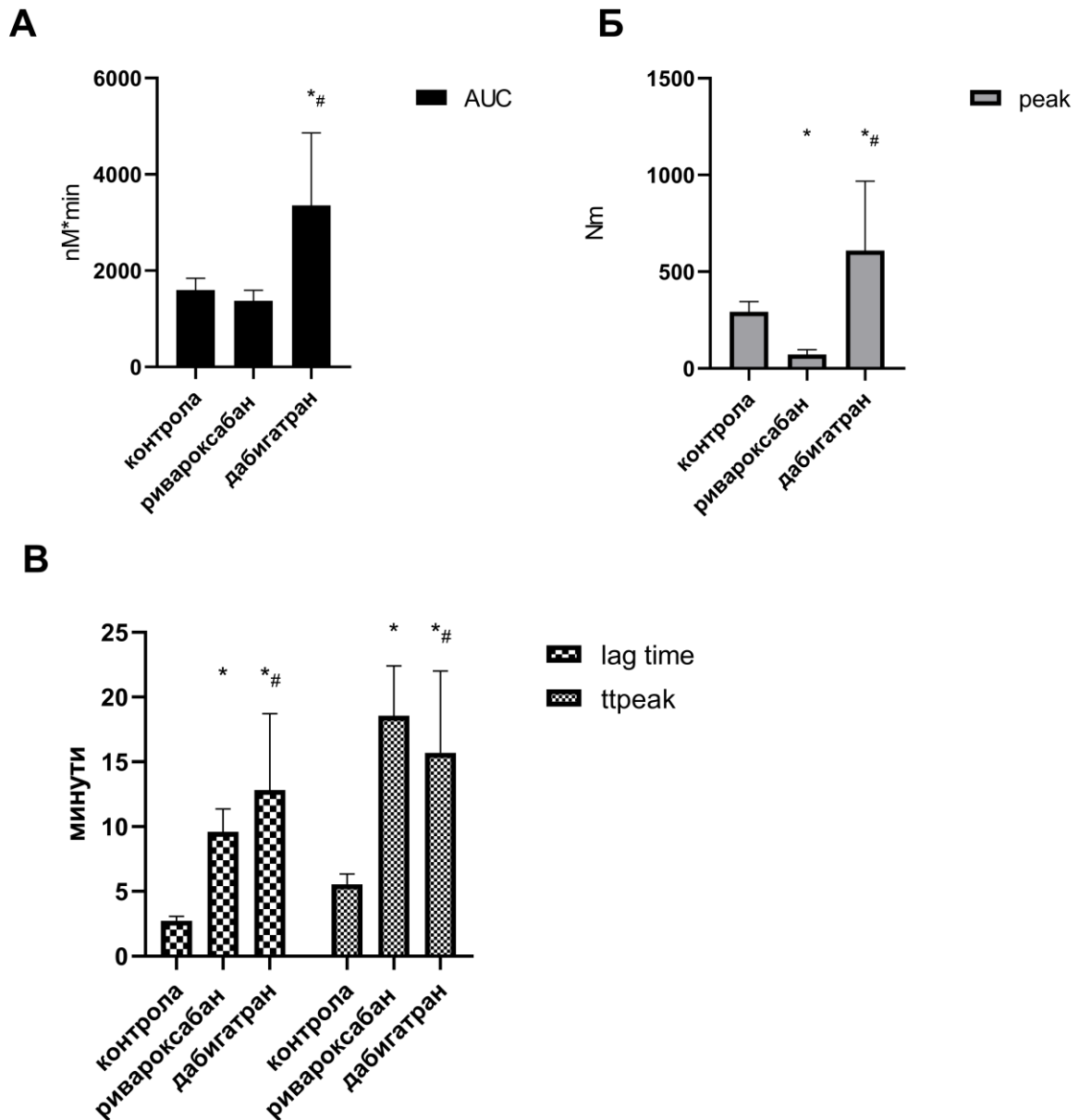


График 7. Поређење параметара САТ методе између група; А – АUC параметар; Б – peak параметар; В – lag time и tpeak параметри; ниво статистичке значајности је $p < 0,01$; * разлика између контролне и експерименталних група (ривароксабан, дабигатран); # разлика између групе третиране ривароксабаном и групе која је примала дабигатран

Вредности параметара САТ методе (AUC, peak, lag time и tpeak) пацијената на терапији обе дозе директних оралних антикоагуланаса (15/20 mg ривароксабана или 110/150 mg дабигатрана) и здравих испитаника су приказане графички и табеларно (Табела 11, График 8-10).

Статистички значајно повећање вредности параметара AUC, peak, lag time и tpeak је уочено код пацијената који су примали 110 или 150 mg дабигатрана у поређењу са здравим испитаницима. С друге стране, код пацијената на терапији 15 или 20 mg ривароксабана примећено је значајно смањење вредности peak параметра, док су времена lag time и tpeak била значајно продужена у односу на контролну групу. Није уочена значајна разлика приликом поређења два дозна режима како у подгрупама које су примале ривароксабан тако и у подгрупама третираним дабигатраном. Запажено је значајно продужење вредности tpeak параметра у односу на lag time параметар у оквиру подгрупа које су примале ривароксабан (15/20 mg) $p < 0,01$ (График 10).

Табела 11. Параметри САТ методе у испитиваним подгрупама

Група (број пацијената)	САТ AUC (nM*min)	САТ peak (nM)	САТ lag time (min)	САТ tpeak (min)
Контрола (70)	1535,35-1682,02	269,51-300,39	2,71-2,89	5,50-5,97
Ривароксабан 15 mg (12)	1275,33-1516,70	60,61-88,79*	8,94-11,47*#	14,42-19,70*
Ривароксабан 20 mg (40)	925,87-2604,61	61,59-78,86*	8,86-9,94*#	17,81-20,17*
Дабигатран 110 mg (14)	2589,04-4451,94*	445,55-812,62*	10,06-14,35*	11,86-15,72*
Дабигатран 150mg (36)	2793,34-3793,67*	474,46-729,43*	10,84-15,29*	14,06-18,82*

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg), # – разлика између параметара унутар подгрупе (ривароксабан 15/20mg). AUC – површина испод криве; peak – пик концентрације тромбина; lag time – време до детекције тромбин продукције; tpeak – време до постизања пика концентрације тромбина

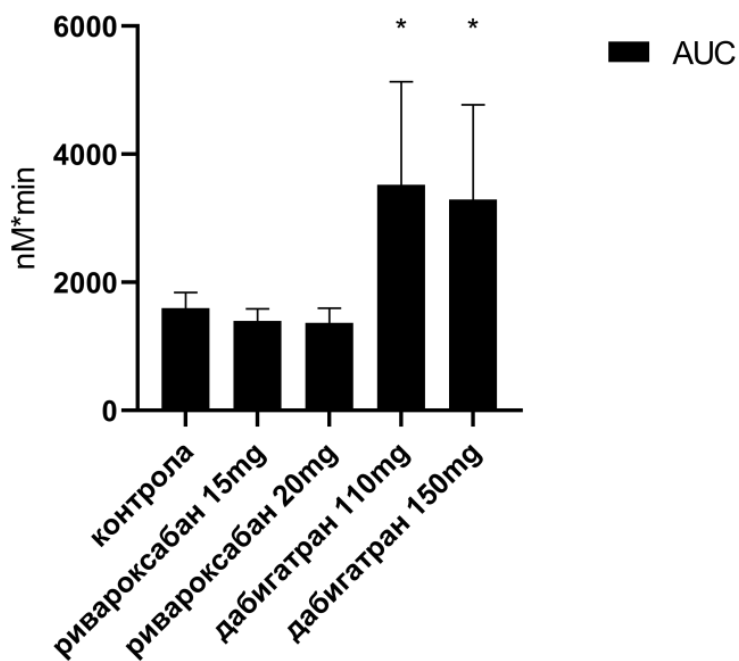


График 8. AUC параметар испитиваних подгрупа; методе између подгрупа; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg)

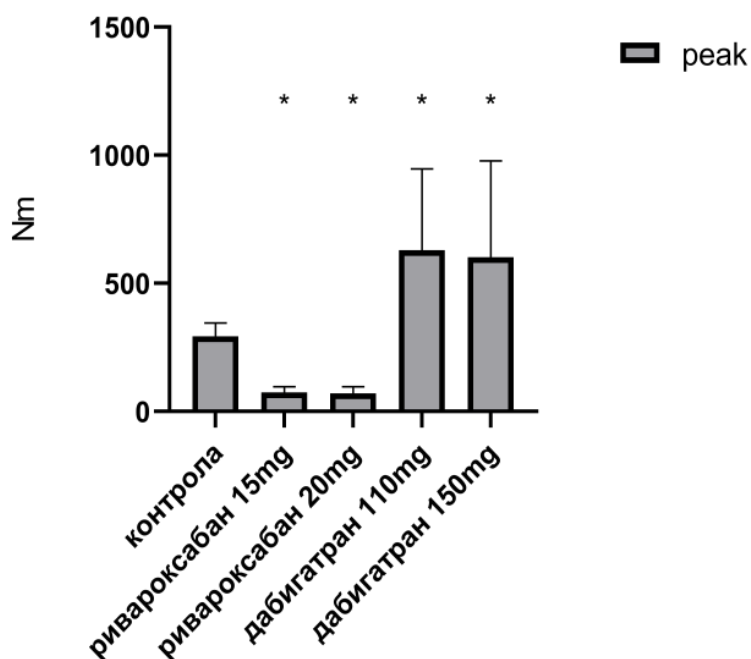


График 9. Peak параметар испитиваних подгрупа; методе између подгрупа; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg)

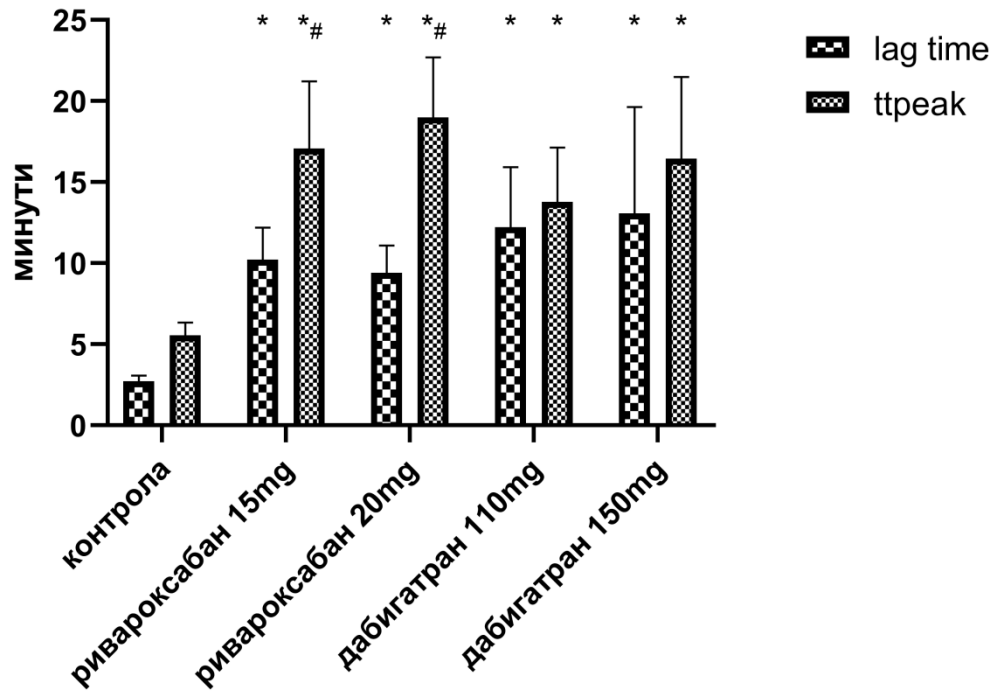


График 10. Поређење параметра САТ методе између подгрупа; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg); # – разлика између параметара унутар подгрупе (ривароксабан 15/20mg)

4.3.3. ОНР тест

Вредности параметара ОНР методе (ОНР, ОСР и ОФР) код здравих испитаника и пацијената на терапији ривароксабаном или дабигатраном су приказане графички и табеларно (**Табела 12, График 12 А-В**).

Код пацијената који су били на терапији ривароксабаном није дошло до статистички значајне промене вредности параметара ОНР методе (ОНР, ОСР, ОФР) приликом поређења са здравим испитаницима. Међутим, приликом примене дабигатрана уочено је статистички значајно снижење вредности ОНР и ОСР параметара у односу на контролну групу. Укупни фибринолитички потенцијал (ОФР) је био значајно већи код испитаника који су били на терапији дабигатраном у поређењу са здравим испитаницима. Додатно, приликом поређења параметара ОНР теста између групе која је примала ривароксабан и групе третиране дабигатраном, уочено је значајно снижење вредности ОНР и ОСР параметара и повећање вредности ОФР параметара у групи третираној дабигатраном. ($p < 0,05$) (**Табела 12, График 12 А-В**).

Табела 12. Параметри ОНР методе у испитиваним групама

Група (број пацијената)	Контрола (70)	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
ОСР (Abs sum)	294,16-322,82 ^b	320,00-352,86	182,71-210,68 ^c
ОНР (Abs-sum)	110,55-132,98 ^b	146,50-175,20	103,65-124,39 ^c
ОФР (%)	59,59-64,57 ^b	49,67-55,64	57,67-75,26 ^c

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$; ^a – разлика између групе третиране ривароксабаном и контролне групе; ^b – разлика између групе третиране дабигатраном и контролне групе; ^c – разлика између групе третиране ривароксабаном и дабигатраном; ОСР- Укупни коагулациони потенцијал; ОНР – укупни хемостатски потенцијал; ОФР – укупни фибринолитички потенцијал

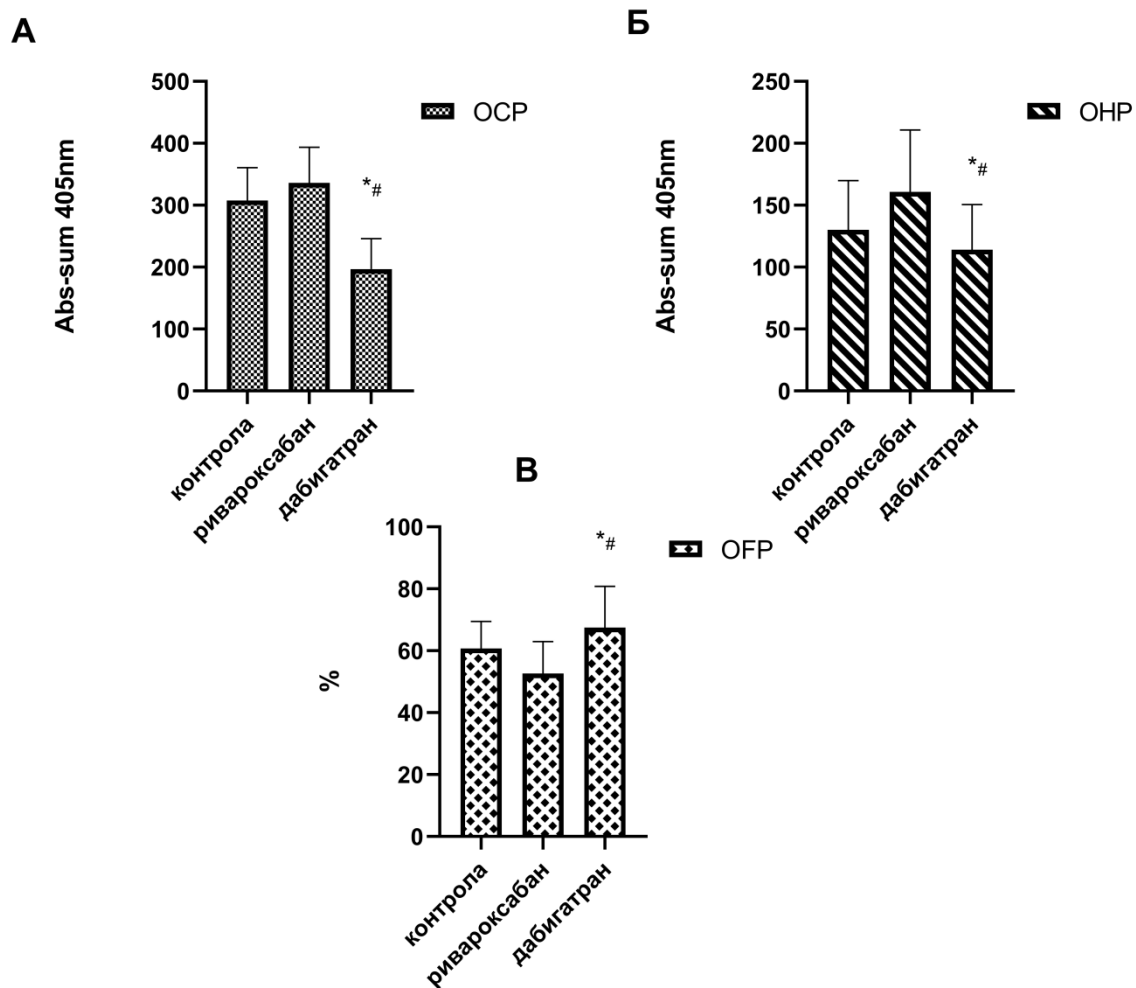


График 12. Параметри ОНР методе у испитиваним групама; А – ОСП параметар; Б – ОНР параметар; В – ОФР параметар; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$; * разлика између контролне и експерименталних група (ривароксабан, дабигатран); # разлика између групе третиране ривароксабаном и групе која је примала дабигатран

Вредности параметара ОНР методе (ОСР, ОНР и ОФР) пацијената на терапији обе дозе директних оралних антикоагуланаса (15/20 mg ривароксабана или 110/150 mg дабигатрана) и здравих испитаника су приказане графички и табеларно (Табела 13, График 13).

Оба дозна режима ривароксабана (15/20 mg) нису довела до значајних промена у вредностима параметара ОНР методе. Примена 110 mg и 150 mg дабигатрана је довела до значајног снижења вредности ОСР и ОНР параметара док су вредности ОФР параметра биле више у поређењу са здравим испитаницима ($p < 0,05$). Међутим, није дошло до значајне промене у параметрима ОНР методе поређењем оба дозна режима унутар група које су биле на терапији ривароксабаном и дабигатраном (Табела 13, График 13).

Табела 13. Параметри ОНР методе у испитиваним групама

Група (број пацијената)	ОСР (Abs sum)	ОНР (Abs-sum)	ОФР (%)
Контрола (70)	294,16-322,82 ^b	110,55-132,98	59,59-64,57 ^b
Ривароксабан 15 mg (12)	298,83-376,98	121,42-200,88	45,33-61,46
Ривароксабан 20 mg (40)	316,97-353,49	145,67-175,45	49,27-55,46
Дабигатран 110 mg (14)	171,73-238,94 [*]	90,91-132,70 [*]	35,23-52,29 [*]
Дабигатран 150mg (36)	177,87-208,80 [*]	102,34-127,43	36,22-44,93 [*]

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$; * – разлика између контролне групе и подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg), ОСР – Укупни коагулациони потенцијал; ОНР – укупни хемостатски потенцијал; ОФР – укупни фибринолитички потенцијал

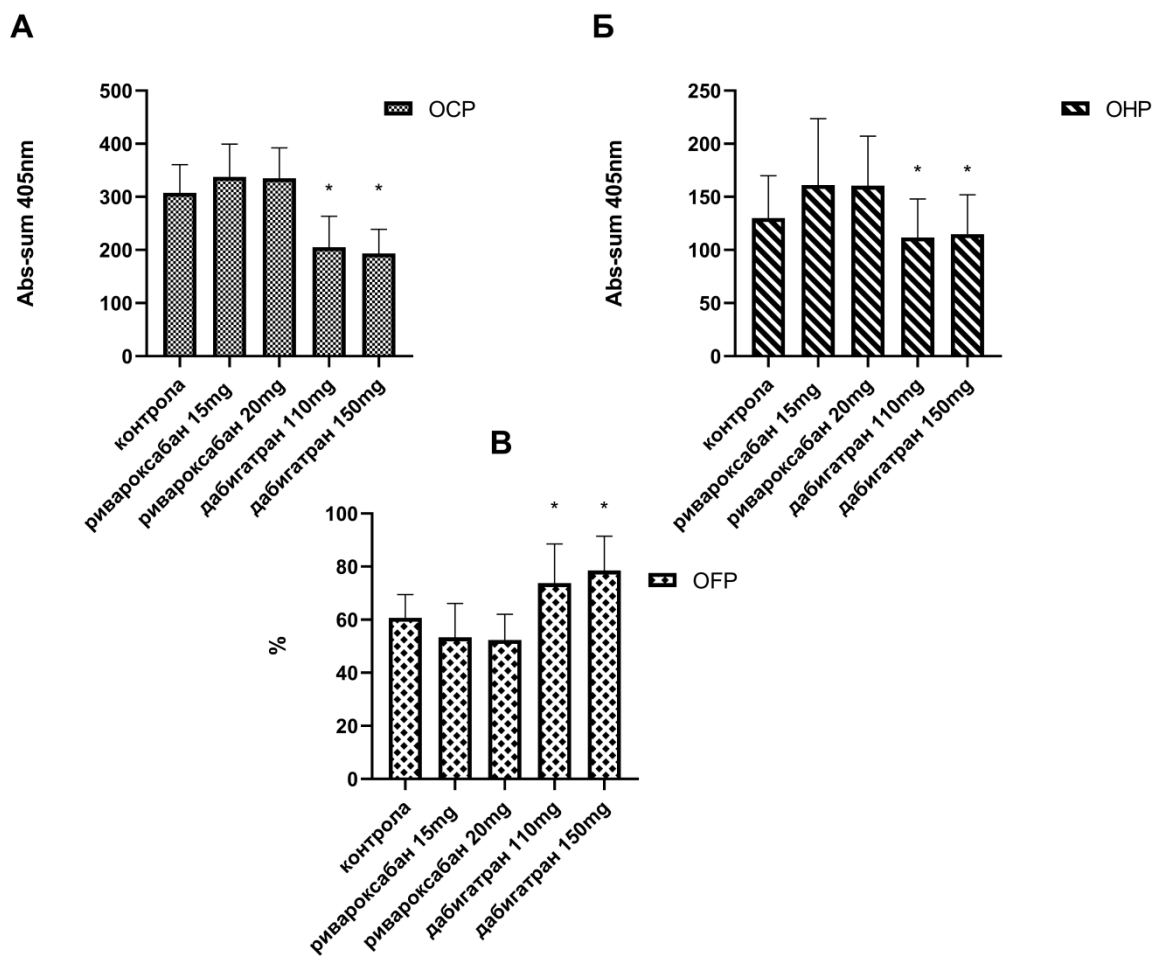


График 13. Параметри ОНР методе у испитиваним подгрупама; А – ОСР параметар; Б – ОНР параметар; В – ОФР параметар; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$; * разлика између контролне и експерименталних подгрупа (ривароксабан 15/20mg, дабигатран 110/150mg);

4.3.4. Анализа турбидиметријских података

Анализом параметара који описују формирање фибринског угрушка, уочено је значајно продужење вредности lag time параметра у групи пацијената који су примали дабигатран у поређењу са контролном групом али и са групом која је била на терапији ривароксабаном. Запажено је снижење вредности Max_Abs параметра у групи пацијената која је била на терапији дабигатраном у односу на групу здравих испитаника. Вредности других турбидиметријских параметара се нису значајно разликовале између група (Табела 14).

Табела 14. Турбидиметријски параметри у испитиваним групама

Група (број пацијената)	Контрола (70)	Ривароксабан (52)	Дабигатран (50)
Lag_time (sec)	281,55-305,12 ^b	277,34-341,25	909,16-1078,17 ^c
Max_Abs	1,57-1,70 ^b	1,30-1,44	1,15-1,27
Slope	0,06-0,07	0,07-0,19	0,02-0,03
Slope_time	218,71-263,20	191,27-228,24	253,95-281,61
Max_Abs_time	504,20-609,39	633,34-757,78	478,07-724,84
Lag_Abs_Avrg	0,43-0,45	0,47-0,50	0,52-0,55
Max_Abs-Lag_Abs	1,20-1,25	1,23-1,39	1,18-1,28

Подаци су приказани као 95% интервали поверења; статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$; ^a – разлика између групе третиране ривароксабаном и контролне групе; ^b – разлика између групе третиране дабигатраном и контролне групе; ^c – разлика између групе третиране ривароксабаном и дабигатраном; Lag_time – време у којем је формирано довољно протофибрила за детекцију; Max_Abs – максимална апсорбанца; Lag_Abs_Avrg – просечна вредност апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до lag time; Max_Abs-Lag_Abs – апсорбанца добијена одузимањем вредности MaxAbs и Lag Abs Avrg; Slope – најстрмији део криве агрегације фибрина; Max_Abs_time – време када се постиже максимална апсорбанца; Slope_time – време које се добија одузимањем Max_Abs_time и lag_time.

4.4. КОРЕЛАЦИЈЕ

4.4.1. Корелација концентрације ДОАК у плазми и клиничких карактеристика

Приликом утврђивања повезаности клиничких параметара пацијената на терапији директним оралним антикоагулансима, добијене су следеће корелације: умерена корелација између параметра бубрежне функције (GFR) и концентрације ривароксабана у плазми ($r^2=-0,41$; $p<0,05$) као и концентрације дабигатрана у плазми ($r^2=-0,41$; $p<0,05$). Такође, приметили смо умерену повезаност телесне масе са концентрацијом ривароксабана ($r^2=-0,39$; $p<0,05$) као и са концентрацијом дабигатрана у плазми ($r^2=-0,41$; $p<0,05$).

4.4.2. Корелација концентрације ДОАК у плазми и стандардних коагулационих метода

Када је реч о повезаности концентрације директних оралних антикоагуланаса (ривароксабан и дабигатран) у плазми измерене помоћу LC-MS/MS и конвенционалних метода (PT-INR, aPTT), уочена је јака корелација између PT-INR са концентрацијом ривароксабана у плазми (Табела 15, График 14). Поред тога, aPTT тест је показао јаку повезаност са концентрацијом дабигатрана у плазми (Табела 16, График 15).

Табела 15. Корелација између концентрације ривароксабана у плазми и хемостатских параметара

РИВАРОКСАБАН			
Параметар	Спирманов кофицијент	р вредност	Објашњење
PT-INR	+0,82	<0,001	Јака позитивна корелација
ЕТР (%)	-0,51	<0,001	Јака инверзна корелација
ЕТР c-max (%)	-0,85	<0,001	Јака инверзна корелација
ЕТР t-lag (sec)	+0,83	<0,001	Јака позитивна корелација
ЕТР t-max (sec)	+0,66	<0,001	Јака позитивна корелација

PT-INR – протромбинско време (Интернационални нормализовани однос); ЕТР – ендогени тромбин потенцијал; c-max – максимална концентрација тромбина; t-lag – време до почетка стварања тромбина; t-max – време до максималне концентрације тромбина;

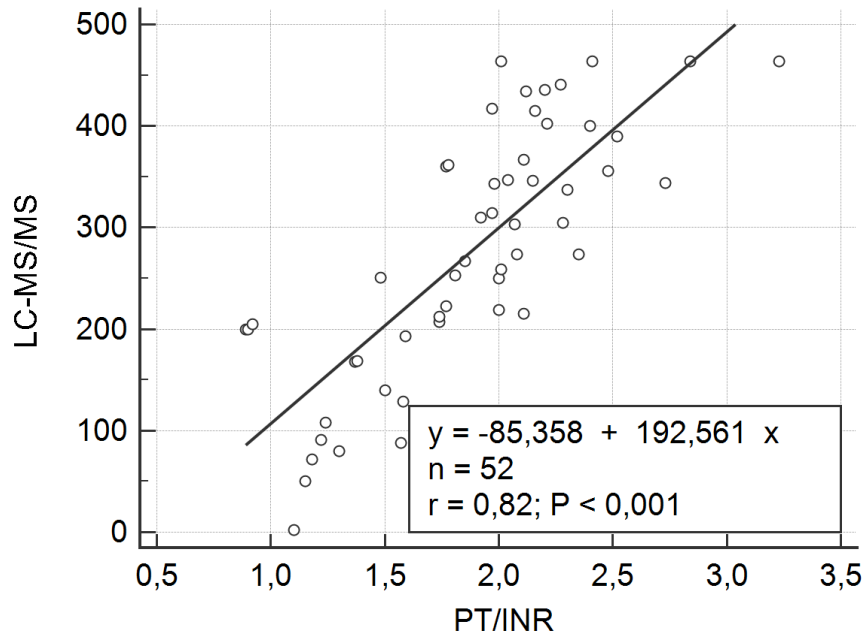


График 14. Корелација концентрације у плазми и PT-INR код пацијената на терапији ривароксабаном; LC-MS/MS – течна хроматографија са масеном спектрометријом; PT-INR – протромбинско време/Интернационални нормализовани однос

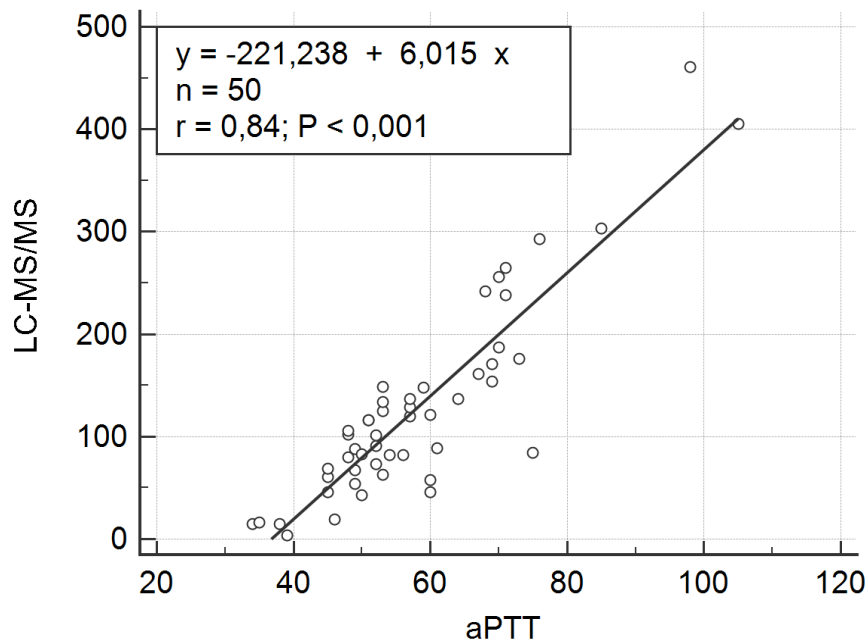


График 15. Корелација концентрације у плазми и aPTT код пацијената на терапији дабигатраном; LC-MS/MS – течна хроматографија са масеном спектрометријом; aPTT-активирано парцијално тромбинско време;

4.4.3. Корелација концентрације ДОАК у плазми и глобалних хемостатских тестова

Вредности Спирмановог коефицијента, значајности и објашњење корелација су представљени на графиконима и табеларно за ЕТР методу (Табела 15, Табела 16, График 16, График 17,) и САТ метод (Табела 16).

Уочена је јака повезаност између свих параметара ЕТР методе (ЕТР, с-мах t-мах и t-lag) и плазма концентрације пацијената који су били на терапији ривароксабаном (Табела 15, График 16). Такође, сви параметри ЕТР методе (ЕТР, с-мах, t-мах и t-lag) су показали јаку повезаност са плазма концентрацијом пацијената који су примали дабигатран (Табела 16, График 17). Међутим, примећена је умерена корелација између концентрације дабигатрана у плазми измерене помоћу LC-MS/MS и параметара САТ методе (peak, lag time и tpeak) (Табела 16).

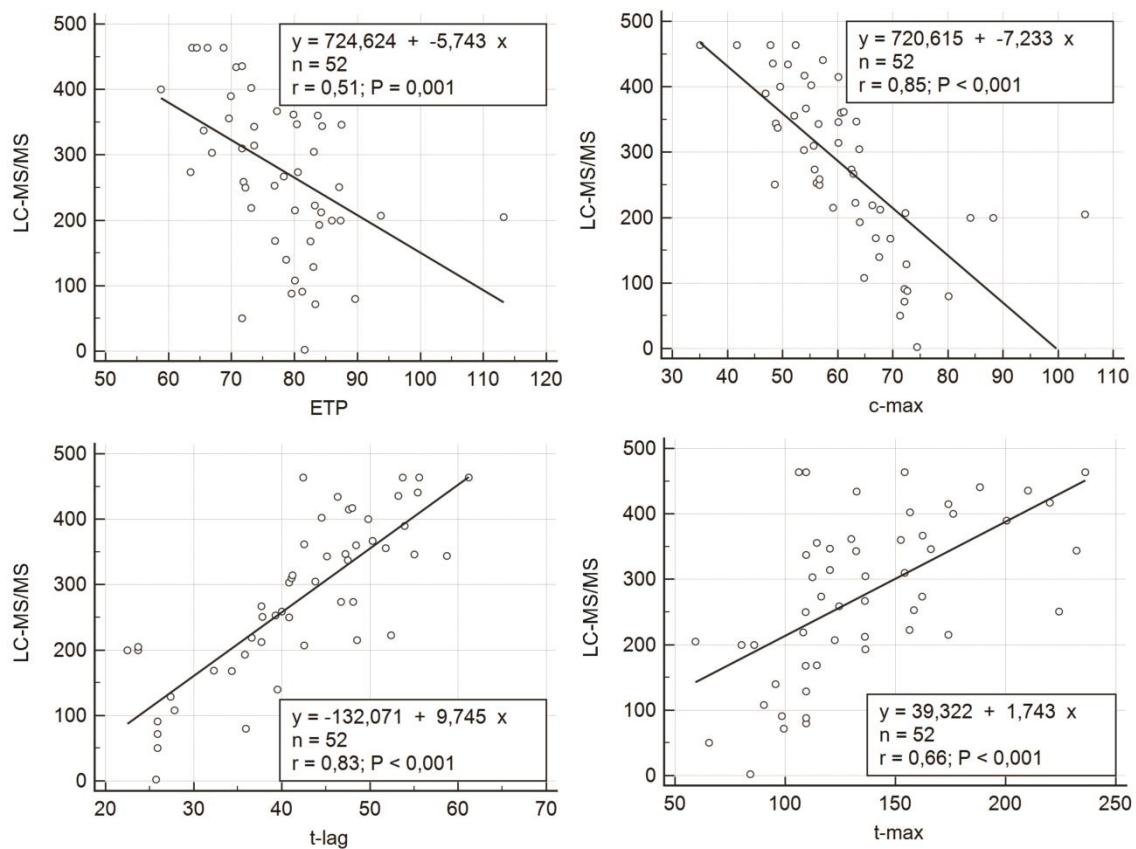


График 16. Корелација концентрације ривароксабана у плазми са параметрима ЕТР методе; LC-MS/MS – течна хроматографија са масеном спектрометријом; ЕТР – ендогени тромбински потенцијал; с-мах – максимална концентрација тромбина; t-lag – време до почетка стварања тромбина; t-мах – време до максималне концентрације тромбина

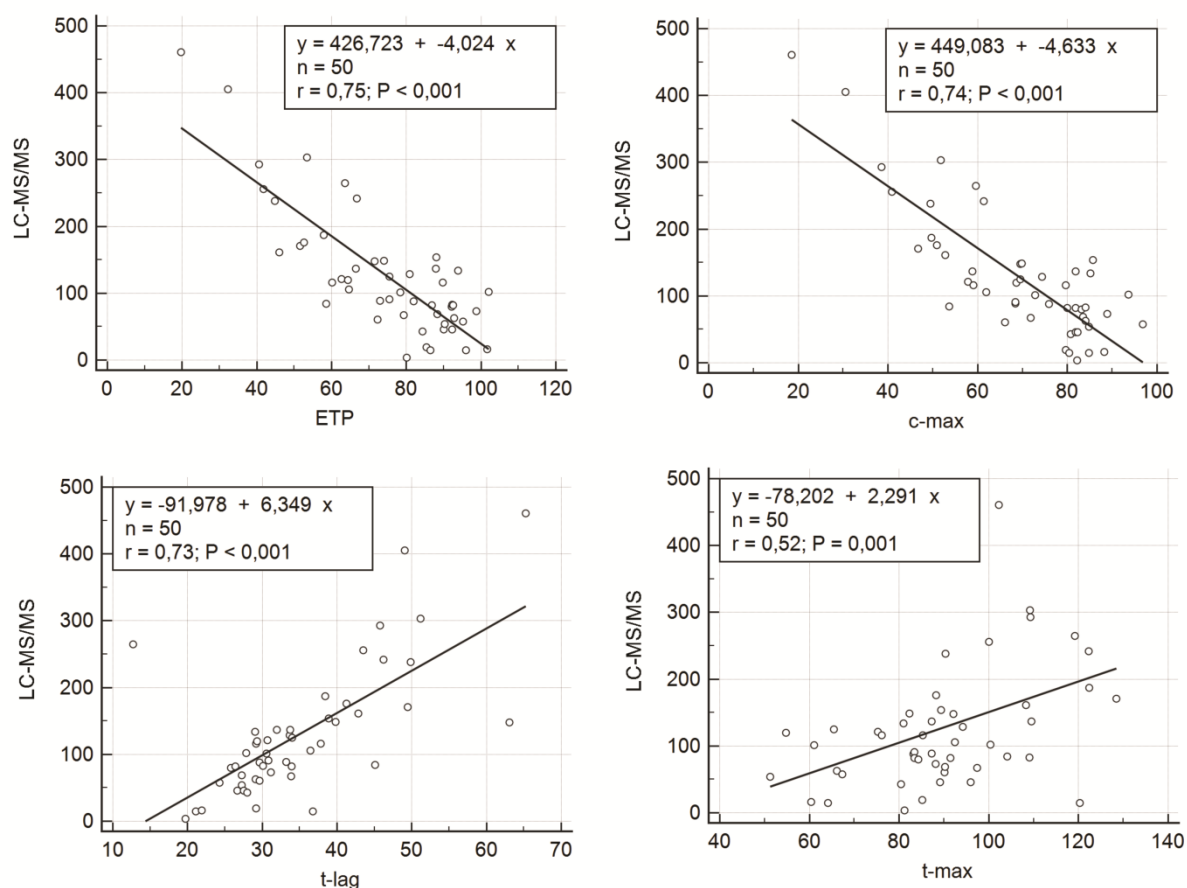


График 17. Корелација концентрације дабигатрана у плазми са параметрима ЕТР методе; LC-MS/MS – течна хроматографија са масеном спектрометријом; ЕТР – ендогени тромбински потенцијал; c-max – максимална концентрација тромбина; t-lag – време до почетка стварања тромбина; t-max – време до максималне концентрације тромбина

Табела 16. Корелација између концентрације дабигатрана у плазми и хемостатских параметара

ДАБИГАТРАН			
Параметар	Спирманов коефицијент	р вредност	Објашњење
аРТТ	+0,84	<0,001	Јака позитивна корелација
ЕТР (%)	-0,75	<0,001	Јака инверзна корелација
ЕТР c-max (%)	-0,74	<0,001	Јака инверзна корелација
ЕТР t-lag sec	+0,73	<0,001	Јака позитивна корелација
ЕТР t-max sec	+0,52	<0,001	Јака позитивна корелација
САТ lag time (min)	+0,45	<0,01	Позитивна умерена корелација
САТ peak (nM)	+0,30	<0,05	Позитивна умерена корелација
САТ tpeak (min)	+0,33	<0,05	Позитивна умерена корелација

аРТТ- активирано парцијално тромбинско време; ЕТР– ендогени тромбин потенцијал; c-max – максимална концентрација тромбина; време до почетка стварања тромбина; t-max – време до максималне концентрације тромбина; peak- пик концентрације тромбина; lag time-време до детекције тромбин продукције; tpeak- време до постизања пика концентрације тромбина.

Уочена је јака повезаност између с-мах параметра и плазма концентрације пацијената који су примали како 15 mg (с-мах: $r^2=-0,78$; $p<0,001$) тако и 20 mg ривароксабана (с-мах: $r^2=-0,82$; $p<0,001$) (Табела 17). Код пацијената који су били на терапији дабигатраном у дози од 110 mg примећена је јака повезаност плазма концентрације са параметрима ЕТР методе (ЕТР: $r^2=-0,66$ и с-мах: $r^2=0,64$, $p<0,001$). Такође, плазма концентрација код пацијената на терапији дабигатраном (150mg) корелира са параметрима ЕТР методе (ЕТР: $r^2=-0,74$ и с-мах: $r^2=0,73$, $p<0,001$) (Табела 18).

Када је реч о клиничким параметрима, уочена је умерена корелација између ЕТР параметра и бубрежне функције ($r^2=-0,32$; $p<0,05$) као и телесне масе пацијената су били на терапији ривароксабаном ($r^2=-0,35$; $p<0,05$). Такође, код пацијената који су примали дабигатран утврђена је умерена повезаност између ЕТР параметра и бубрежне функције ($r^2=-0,30$; $p<0,05$) као и телесне масе пацијената ($r^2=-0,34$ редом, $p<0,05$).

Табела 17. Корелација између концентрације ривароксабана у плазми подељених по дозама и хемостатских параметара

РИВАРОКСАБАН 15 mg			
Параметар	Спирманов коэффициент	р вредност	Објашњење
PT-INR	+0,77	<0,001	Јака позитивна корелација
ЕТР (%)	-0,34	<0,001	Инверзна умерена корелација
ЕТР с-мах (%)	-0,78	<0,001	Јака инверзна корелација
ЕТР t-lag (sec)	+0,65	<0,001	Јака позитивна корелација
ЕТР t-max(sec)	+0,78	<0,001	Јака позитивна корелација
РИВАРОКСАБАН 20 mg			
PT-INR	+0,83	<0,01	Јака позитивна корелација
ЕТР (%)	-0,43	<0,05	Инверзна умерена корелација
ЕТР смах (%)	-0,82	<0,01	Јака инверзна корелација
ЕТР t-lag (sec)	+0,82	<0,05	Јака позитивна корелација
ЕТР t-max(sec)	+0,58	<0,01	Позитивна умерена корелација

PT-INR-протромбинско време (Интернационални нормализовани однос); ЕТР– ендогени тромбин потенцијал; с-мах – максимална концентрација тромбина; време до почетка стварања тромбина; t-мах – време до максималне концентрације тромбина;

Табела 18. Корелација између концентрације дабигатрана у плазми подељених по дозама и хемостатских параметара

Параметар	Спирманов коэффициент	р вредност	Објашњење
ДАБИГАТРАН 110 mg			
aPTT	+0,62	<0,05	Јака позитивна корелација
ETP (%)	-0,66	<0,05	Јака инверзна корелација
ETP c-max (%)	-0,64	<0,05	Јака инверзна корелација
ETP t-lag sec	+0,28	<0,05	Слаба позитивна корелација
ETP t-max sec	+0,52	<0,05	Позитивна умерена корелација
CAT lag time (min)	+0,60	<0,05	Јака позитивна корелација
CAT peak (nM)	+0,69	<0,05	Јака позитивна корелација
CAT tpeak (min)	+0,62	<0,05	Јака позитивна корелација
ДАБИГАТРАН 150 mg			
aPTT	+0,85	<0,001	Јака позитивна корелација
ETP (%)	-0,74	<0,001	Јака инверзна корелација
ETP c-max %	-0,73	<0,001	Јака инверзна корелација
ETP t-lag sec	+0,82	<0,05	Јака позитивна корелација
ETP t-max sec	+0,49	<0,05	Позитивна умерена корелација
CAT lag time(min)	+0,37	<0,05	Позитивна умерена корелација

aPTT- активирано парцијално тромбинско време; ETP– ендогени тромбин потенцијал; c-max– максимална концентрација тромбина; време до почетка стварања тромбина; t-max – време до максималне концентрације тромбина; peak- пик концентрације тромбина; lag time-време до детекције тромбин продукције; tpeak- време до постизања пика концентрације тромбина

4.5. Ефекти ДОАК код појединачних пацијената

Код већине пацијената који су били на терапији директним оралним антикоагулансима (ривароксабан или дабигатран) примећено је смањење хемостатског капацитета. Међутим неки од њих су имали другачији одговор на концентрацију ривароксабана и дабигатрана у плазми. У групи пацијената који су примали ривароксабан, већина испитаника је имала продужен РТ-INR и снижене вредности ЕТР параметра.

Вредности ОСР и ОНР параметара код појединачних пацијената на терапији ривароксабаном и дабигатраном су приказане на **Графику 18** и **Графику 19**. Иако резултати указују да ОНР метод није сензитиван за терапијске концентрације ривароксабана, неки пацијенти (n=4) са концентрацијом изнад 400 ng/ml у плазми имају ниже вредности ОНР-а у поређењу са здравим појединачима (црвена линија, **График 18**). Два пацијента са концентрацијом ривароксабана у плазми од 200 ng/ml су имала ОНР, ЕТР и РТ-INR вредности у оквиру референтног интервала (љубичаста линија, **График 18**). ОНР и ЕТР вредности у оквиру референтног интервала су уочене код пацијената са концентрацијом ривароксабана у плазми од 50 ng/ml, 80 ng/ml, 207 ng/ml и 346 ng/ml иако је РТ-INR вредност била већа од >1,2. (плава линија, **График 18**)

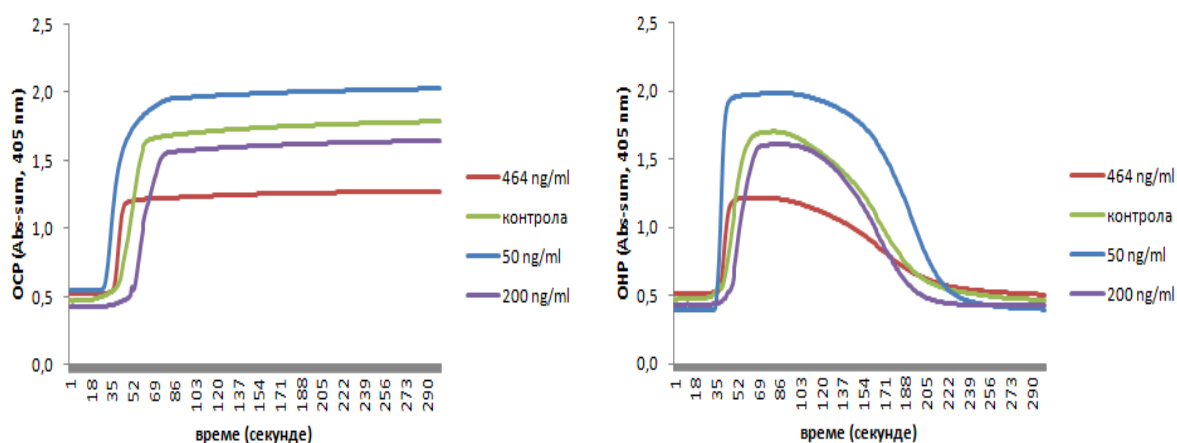


График 18. Репрезентативне криве агрегације фибрина. Укупни коагулациони и хемостатски потенцијал код пацијената при различитим концентрацијама ривароксабана у плазми и здравих појединача

У групи пацијената на терапији дабигатраном, скоро сви пацијенти су имали ниже вредности ОНР у поређењу са референтним опсегом (црвена линија, **График 19**). Међутим, три пацијента са концентрацијом дабигатрана у плазми од 15 ng/ml, 67 ng/ml и 82 ng/ml су имала ОНР и ЕТР нивое у оквиру референтних вредности док су вредности аРТТ-а биле дуже од 40 секунди (плава линија, **График 19**). Референтне вредности ОНР, ЕТР и аРТТ параметара су уочене код пацијената са концентрацијом дабигатрана у плазми од 15 ng/ml и 154 ng/ml (љубичаста линије, **График 19**).

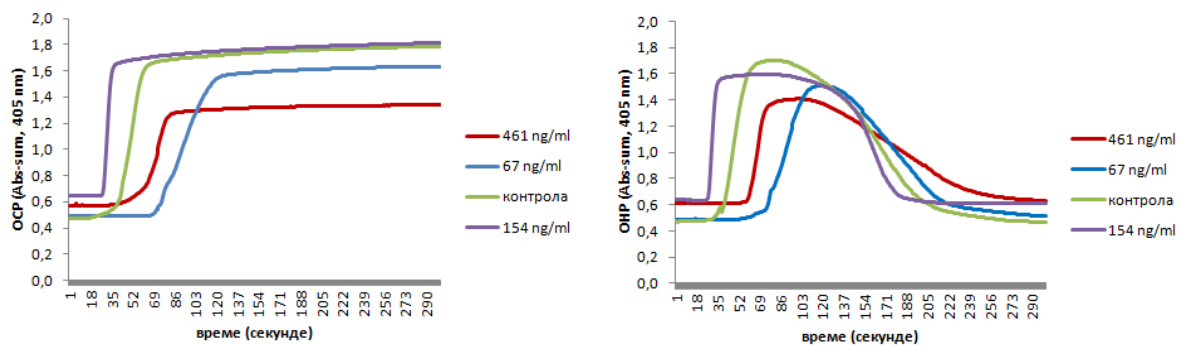


График 19. Репрезентативне криве агрегације фибрина. Укупни коагулациони и хемостатски потенцијал код пацијената при различитим концентрацијама дабигатрана у плазми и здравих појединаца

4.6. Параметри глобалних хемостатских тестова и ниске концентрације ДОАК у плазми

Пошто су од свих глобалних хемостатских метода, параметри ЕТР методе показали најјачу повезаност за концентрацијом ривароксабана и дабигатрана у плазми, следећи корак нам је био да утврдимо који од посматраних параметара представља добар показатељ за пацијенте са ниском концентрацијом ДОАК. С тим циљем спроведена је ROC анализа, при чему смо пратили површину испод криве, специфичност и сензитивност. Додатно, узете су такозване *Cut-off* вредности тј. вредности пресека концентрације ДОАК, са циљем дефинисања очекиваних вредности параметара ЕТР теста. Анализе спроведене код пацијената са концентрацијом дабигатрана у плазми испод 50 ng/ml су показале да с-тах параметар има одличну AUC-ROC вредност 0,882 (95% CI 0,802–0,980) (подаци представљени на **Графику 20, Табели 19**) као и ЕТР параметар 0,879 (95% CI 0,776–0,980) (подаци представљени на **Графику 21, Табели 19**).

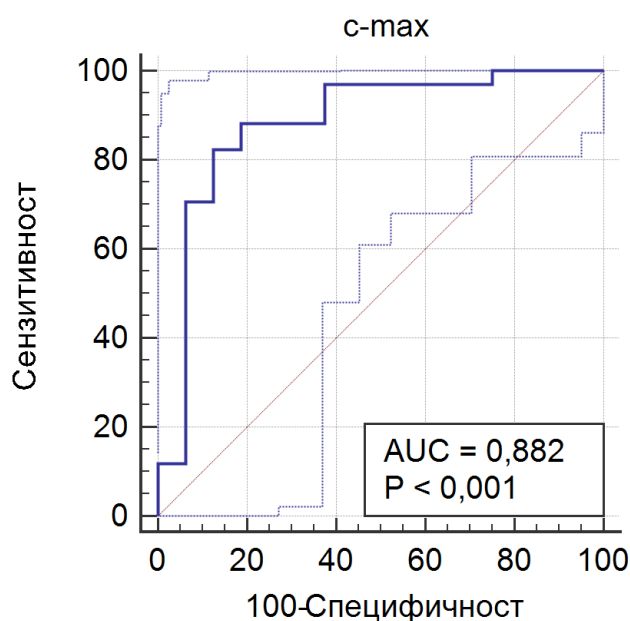


График 20. ROC крива за с-тах параметар при концентрацији дабигатрана у плазми испод 50 ng/ml

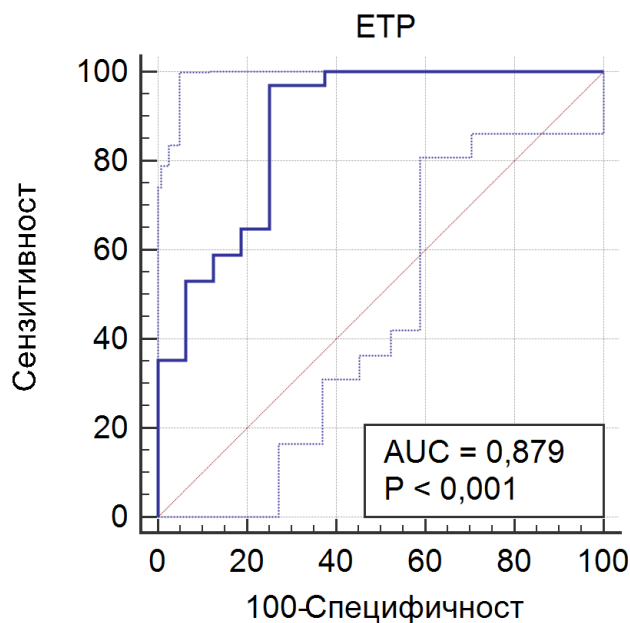


График 21. ROC крива за ETP параметар при концентрацији дабигатрана у плазми испод 50 ng/ml

Табела 19. Вредности параметара ROC криве при концентрацији дабигатрана у плазми испод 50 ng/ml и ривароксабана у плазми испод 100 ng/ml

ДАБИГАТРАН		
Параметар	Површина (95% интервал поверења)	р вредност
ETP (%)	0,879 (95% CI 0,776–0,980)	<0,001
ETP c-max (%)	0,882 (95% CI 0,802–0,980)	<0,001
РИВАРОКСАБАН		
ETP (%)	0,629 (95% CI 0,458–0,788)	0,125
ETP cmax (%)	0,902 (95% CI 0,829–0,972)	<0,001

ETP– ендогени тромбин потенцијал; c-max– максимална концентрација тромбина

Нажалост нисмо могли да урадимо исту анализу за пацијенте са концентрацијом ривароксабана у плазми испод 50 ng/ml због малог броја пацијената. Међутим, анализирали смо пацијенте са концентрацијом ривароксабана у плазми испод 100 ng/ml и добили бољу вредност AUC-ROC за c-max 0,902 (95% CI 0,829–0,972) (подаци представљени на **Графику 22, Табели 19**) у односу на ETP параметар 0,629 (95% CI 0,458–0,788) (подаци представљени на **Графику 23, Табели 19**). Заправо, пацијенти са концентрацијом дабигатрана у плазми испод 50 ng/ml и ривароксабана испод 100 ng/ml имају вредности ETP параметра изнад 50%.

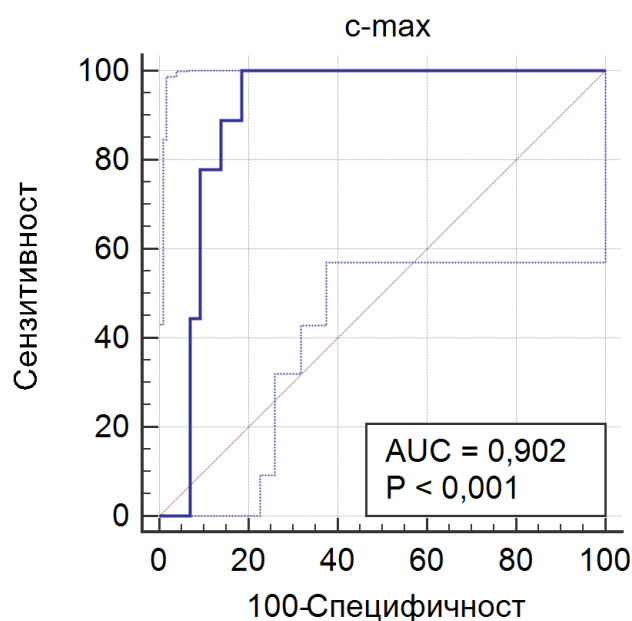


График 22. ROC крива за c-max параметар при концентрацији ривароксабана у плазми испод 100 ng/ml

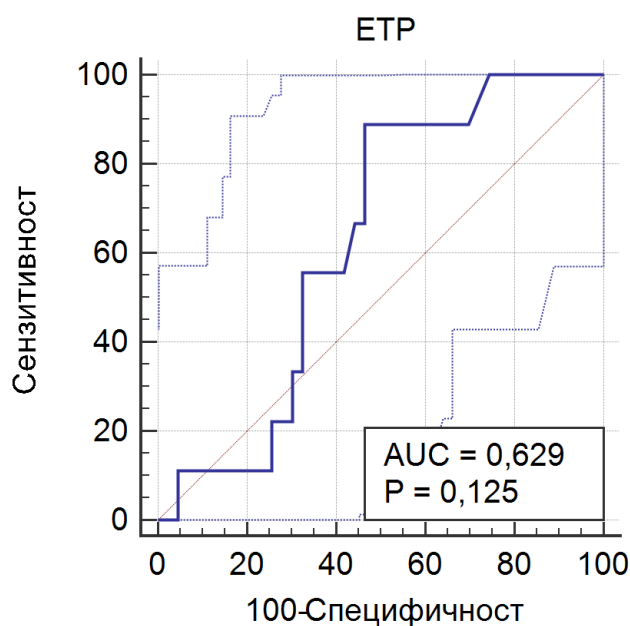


График 23. ROC крива за ETP параметар при концентрацији ривароксабана у плазми испод 100 ng/ml

V

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Директни орални антикоагуланси се сматрају основним третманом у превенцији тромбоемболијских компликација код пацијената са невалвуларном атријалном фибрилацијом. Иако се лабораторијско праћење концентрације директних оралних антикоагуланаса не препоручује, важно је постићи равнотежу између антитромботске користи и ризика од крвављења (77, 88). Одређивањем концентрације лека у плазми и праћењем антикоагулантног ефекта лека у одређеним клиничким ситуацијама се постиже претходно наведена равнотежа. Одабир одговарајућег теста за праћење антикоагулантног ефекта ових лекова је јако изазован задатак. Када је реч о хитним ситуацијама, веома је битно да су тестови за праћење коагулације валидирани, са што већом сензитивношћу теста на што мање концентрације антикоагуланаса. На пример код пацијената са високим ризиком од крвављења којима треба хитна интервенција, сматра се да је концентрација антикоагуланаса $> 50 \text{ ng/ml}$ одговарајућа за примену антидота за ДОАК. Такође за одабир правог теста за праћење антикоагулантног ефекта ДОАК у одређеним клиничким ситуацијама, од великог је значаја имати информацију који директни орални антикоагуланс је узео пацијент и у ком временском интервалу.

Упркос чињеници да LC-MS/MS представља златни стандард за праћење терапије антикоагулансима, једина информација коју добијамо јесте концентрација лека у плазми док подаци о заједничком ефекту коагулације и фибринолизе изостају (121). Стога се наше истраживање усмерило испитивању неколико стандардних и глобалних хемостатских тестова у циљу одређивања ефеката различитих доза ривароксабана и дабигатрана на хемостатски капацитет код пацијената са невалвуларном атријалном фибрилацијом. Идеалан глобални хемостатски тест још увек није пронађен стога су истраживања на том пољу неопходна.

Такође нам је било од интереса да испитамо повезаност између златног стандарда (LC-MS/MS) и стандардних коагулационих, глобалних хемостатских тестова као и клиничких карактеристика пацијената. Утврдили смо на који начин тестови глобалне хемостазе (ЕТР, САТ и ОНР) описују хемостатски капацитет у поређењу са концентрацијом у плазми код појединачних пацијената са атријалном фибрилацијом на терапији ривароксабаном или дабигатраном. На крају, смо испитали који се од параметара глобалних хемостатских тестова (ЕТР, САТ и ОНР) може употребити као добар показатељ концентрације ДОАК у плазми, код пацијената са атријалном фибрилацијом, која је довољно ниска за безбедно извођење неких клиничких интервенција (нпр. тромболиза).

5.1. ДОАК И КЛИНИЧКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА

Крвављење или тромбозе се сматрају најчешћим компликацијама код пацијената који су на терапији оралним антикоагулансима. Међутим, код пацијената који су били укључени у наше истраживање нису примећена крвављења или тромбозе током периода узимања терапије до укључивања у студију, иако су концентрације оба директна орална антикоагуланса у плазми значајно варирале (за ривароксабан: 2 ng/ml - 464 ng/ml и дабигатран: 4 ng/ml - 461 ng/ml). Можемо претпоставити да разлог варирања концентрација лежи у чињеници да је крв пацијената узета $3 \pm 2,07$ сати након последње дозе ривароксабана или дабигатрана. Наиме, подаци који нам говоре да није било компликација упркос варијацијама концентрације ДОАК у плазми, могу потврдити већ постојеће чињенице које се односе на безбедност и ефикасност директних оралних антикоагуланаса с обзиром на њихов широк терапијски опсег (121).

За бољи увид у то који пацијенти су се налазили под повећаним ризиком од тромбоемболијских компликација користили смо CHA₂DS₂-VASc скор. Будући да је у ранијим извештајима показано да код пацијената са високим вредностима CHA₂DS₂-VASc скорa постоји већа вероватноћа од настанка системског тромбоемболизма и крвављења (159, 160), пацијенти из наше студије са вишим скором (већим ризиком од тромбоемболијских компликација) су примали нижу дозу оба ДОАК у поређењу са пацијентима који су примали вишу дозу. Приликом поређења CHA₂DS₂-VASc скорa између пацијената на терапији ривароксабаном и дабигатраном, учили смо да пацијенти у групи која прима ривароксабан имају виши скор тј већи ризик за настанак тромбоемболијских компликација. Такође пронашли смо да је проценат пацијената са јако високим ризиком од компликација (CHA₂DS₂-VASc ≥ 5) у обе групе које су биле на терапији ривароксабаном или дабигатраном био мањи од 10%. У бројним великим студијама су примећени слични резултати (161-163). Једно од таквих истраживања је CRAFT, обухватило је пацијенте којима је прописиван дабигатран уколико су имали нижи CHA₂DS₂-VASc скор, док су пацијенти са вишим CHA₂DS₂-VASc скором примали ривароксабан. Додатно, у поменутој студији, терапија ривароксабаном је била резервисана за пацијенте са више коморбидитета као и пацијенте старије старосне доби (163). Током времена развијале су се многе скале за праћење ризика код пацијената са АФ. Бројне студије користе HAS-BLED скор за идентификацију пацијената који су под већим ризиком од крвављења. HAS-BLED скор обухвата следеће факторе: хипертензија, абнормална ренална функција и функција јетре, мождани удар, крвављење, лабилан ИНР, старији пацијенти, лекови или алкохол. Међутим, постоји неколико објашњења на који начин CHA₂DS₂-VASc скор може да предвиди ризик од крвављења. Једно од објашњења јесте да обе скале имају сличне факторе ризика: године старости, хипертензија, историја инфаркта (164). Додатно, CHA₂DS₂-VASc скор обухвата дијабетес мелитус, као један од фактора ризика. Клинички подаци указују да постоји велики број пацијената са дијабетесом који оболе од хроничне болести бубрега која представља компоненту HAS-BLED скорa. Ранији извештаји показују да су пацијенти који болују од срчане инсуфицијенције подложни исхемијској болести срца, хроничној бубрежној инсуфицијенцији или болести периферних артерија чија удруженост може да допринесе озбиљним крвављењима (165). Такође у студији која је обухватила пацијенте са Тајвана са АФ и терапијом ДОАК, сматра се да се за предвиђање ризика од тромбоемболијских компликација као и од крвављења може користити CHA₂DS₂-VASc скор (159).

Путем претходно наведених скала прате се неки од најчешћих коморбидитета који се јављају пацијената са АФ. Када је реч о придруженим болестима, највећи проценат наших пацијената је поред АФ имао хипертензију, 43,3% у групи на терапији

ривароксабаном и 50% у групи која је примала дабигатран. Друга по реду компликација која се јављала код наших пацијената јесте дијабетес мелитус, 5,8% за ривароксабан и 10% за дабигатран. На крају, јако мали број пацијената је имало инфаркт миокарда или оболело од срчане инсуфицијенције. Бројне студије сведоче да су најчешће придружене болести код пацијената са атријалном фибрилацијом: хипертензија, дијабетес и коронарна артеријска болест, хронична болест бубрега, хиперлипидемија (166, 167).

Сматра се да су пацијенти правилно дозирани уколико су ниже дозе ривароксабана (15 mg) и дабигатрана (110 mg) прописиване пацијентима са смањеном бубрежном функцијом (серумски клиренс креатинина < 50 ml/min) док су више дозе ривароксабана (20 mg) и дабигатрана (150 mg) биле резервисане за пацијенте са серумским клиренсом креатинина > 50 ml/min. У прилог томе нам говори инверзна корелација између брзине гломеруларне филтрације и телесне масе са концентрацијом код оба директна орална антикоагуланса у плазми. Овај резултат је био очекиван из разлога што се ривароксабан (33%) и дабигатран (80%) излучују путем бубрега (126). Пацијенти са ослабљеном бубрежном функцијом су одувек били интересантни када је у питању праћење терапије и одређивање дозе директних оралних антикоагуланаса. Уколико је брзина гломеруларне филтрације између 30-50 ml/min приликом терапије дабигатраном или 15-50 ml/min код третмана ривароксабаном, препоручује се да се изврши смањивање дозе тј. замена више дозе мањом дозом (168, 169). На почетку нашег истраживања је спроведен овакав начин дозирања пацијената. Додатно, у нашој студији пацијенти који су били на терапији нижом дозом ривароксабана (15 mg) или нижом дозом дабигатрана (110 mg) су били старији (> 75 година), са мањом телесном масом (< 60 kg). Већину пацијената су чиниле жене којима је прописана виша доза ривароксабана (20 mg) или дабигатрана (150 mg). У Шведској се лекари воде тиме да пацијенти преко 75 година старости треба да буду на терапији од 110 mg дабигатрана, међутим неки лекари прописују ниже дозе ДОАК код пацијената са брзином гломеруларне филтрације мањом од 50 ml/min и код пацијената за које се сматра да припадају групи са повећаним ризиком од крвављења. Сходно томе, старији пацијенти укључени у наше истраживање, као и пацијенти са реналном дисфункцијом и повећаним ризиком од крвављења су били на терапији нижом дозом дабигатрана а у исто време су постигли терапијску концентрацију лека у плазми. Резултати добијени у претходној студији говоре у прилог томе да је опсег концентрација код пацијената који су примали 110 mg или 150 mg дабигатрана сличан, тј. да не постоји статистички значајна разлика (170). Сви претходно наведени резултати нашег истраживања су у складу са претходним ревијалним радовима (171-173) и водичима (37) што указује на то да су пацијенти правилно дозирани.

Према актуелним препорукама, телесна маса не игра значају улогу у подешавању дозе оба ДОАК. Међутим, стручна јавност је забринута да се пацијенти са нижом телесном масом од нормалне излажу високим концентрацијама ДОАК самим тим и повећаном ризику од крвављења. С друге стране гојазни пацијенти могу бити субдозирани са последично повећаним ризиком од тромбоемболијских компликација. Обрадом података смо уочили да телесна маса корелира са концентрацијом како ривароксабана ($r^2=-0,39$; $p<0,05$) тако и дабигатрана ($r^2=-0,41$; $p<0,05$). Наше истраживање није једино које се суочило са оваквим подацима. Наиме, у ранијим истраживањима се наводи да се код пацијената са нижом телесном масом (<50 kg) се јавља значајно повећање концентрације ривароксабана у плазми док се код пацијената преко 120 kg концентрација у плазми није мењала у односу на пацијенте са нормалном телесном масом (174). Када је у питању повезаност концентрације дабигатрана са телесном масом, анализом RE-LY истраживања примећена је инверзна корелација код гојазних пацијената (>100 kg) (82).

Старији пацијенти са атријалном фибрилацијом су често због разних коморбидитета на терапији многобројним лековима. Резултати раније спроведених студија показују да до 60% пацијената са АФ користи антагонисте бета адренергичких рецептора, антиагрегационе лекове, диуретике, антидепресиве и антиаритмике (175). У нашој студији су најчешће коришћени антагонисти бета адренергичких рецептора (80,8% у ривароксабан и 80% дабигатран групи) потом статини (пацијенти на терапији дабигатраном у знатно већем проценту, 42%). Трећи по реду јесу АСЕ инхибитори (ривароксабан 19,2%, дабигатран 38%), док су на последњем месту антагонисти калцијумских канала и диуретици. Код популације са претходно наведеним коморбидитетима и комплексном терапијом треба посебно обратити пажњу и пратити ток лечења управо због веће вероватноће лек-лек интеракција и потенцијалног утицаја неких од лекова на хемостазу пацијената. У нашој студији, након испитивања повезаности придружене терапије и концентрације ДОАК у плазми као и утицаја на глобалну хемостазу нисмо уочили потенцијално значајне интеракције ових група лекова. Једно од потенцијалних објашњења за овај исход може бити недовољно велики број пацијената укључен у наше истраживање. Претраживањем студија које су се бавиле овом тематиком уочавамо да су у великим клиничким истраживањима утврђене интеракције између лекова примењених код старијих пацијената са атријалном фибрилацијом. На пример код пацијената који су истовремено на терапији нестероидним антиинфламаторним лековима (НСАЛ) и селективним серотонинским (ССРИ) постоји повећан ризик од крвављења. Стога се комбинација ових лекова избегава а у случају да је неопходно дати ове лекове заједно, онда се терапија мора пратити. Такође, показано је да пацијенти који су били на терапији ривароксабаном и НСАИЛ имају 2,5 пута већи ризик од крвављења него пацијенти који не користе НСАИЛ (176).

Додатно, велики број интеракција са директним оралним антикоагулансима (ривароксабан, дабигатран, апиксабан) се дешава на нивоу П-гликопротеина и цитохрома Р450 стога многи лекови који су индуктори или инхибитори ових протеина могу да утичу на концентрацију ДОАК у плазми (177). Међутим, сматрамо да због малог броја пацијената који су били на терапији овом групом лекова (индуктори или инхибитори претходно наведених протеина), у нашем истраживању нисмо уочили значајну промену концентрације ДОАК у плазми или повећање CHA₂DS₂-VASc скорa.

5.2. ЕФЕКТИ ДОАК НА СТАНДАРДНЕ КОАГУЛАЦИОНЕ ТЕСТОВЕ

Стандардни коагулациони тестови као што су протромбинско време (РТ) и активирано парцијално тромбoplastинско време (аРТТ) представљају тестове који служе за мерење активности како спољашњег, унутрашњег тако и заједичког пута коагулације, уједно за праћење дефицита бројних коагулационих фактора. Оба теста су доступна су у свим болницама и могу да послуже за брзу квалитативну анализу ривароксабана или дабигатрана нарочито код ургентних стања јер се резултати добијају у кратком временском интервалу (124, 125).

Анализом наших резултата, уочили смо значајно повећање вредности РТ-INR код групе пацијената која је била на терапији ривароксабаном у односу на здраве испитанике који нису били на терапији директним оралним антикоагулансима. Ради добијања додатних података, спровели смо анализу корелације како би смо утврдили да ли постоји повезаност између концентрације ривароксабана у плазми мерене помоћу LC-MS/MS и РТ-INR теста. Налазе које смо добили указују на снажну линеарну повезаност ове две методе што је у сагласности са раније спроведеним истраживањима (135, 137). Када се сагледају резултати ових истраживања, могло би се закључити да се РТ-INR тест може користити за праћење концентрације ривароксабана. Упркос томе, не постоје препоруке на основу којих се може помоћу РТ-INR методе донети клиничка одлука када је у питању ниво ривароксабана или антикоагулациони потенцијал овог лека (127). Заправо постоје пацијенти код којих се ови тестови не могу користити за праћење терапије директним оралним антикоагулансима. Наиме, одређени пацијенти на терапији ривароксабаном имају нормалне вредности РТ-INR. Приликом обраде података из наше студије је примећено да је чак четири пацијента имало вредности РТ-INR у нормалном опсегу са концентрацијом ривароксабана у плазми између 168 ng/ml и 205 ng/ml. Други разлог због чега се не можемо ослонити на резултате РТ-INR теста јесте аналитички тј. варирање резултата у зависности од тога који се реагенс или инструмент користи за извођење теста (126, 127). У покушају да се тај недостатак превазиђе, спроведена су могобројна истраживања. У једном од њих су *Douxfile* и сарадници рангирали реагенсе по сензитивности од највише до најмање сензитивног у узорцима плазме којима је додат ривароксабан у концентрационом опсегу од 11-1090 ng/ml. По завршетку истраживања приметили су да је најсензитивнији био *Triniclot PT Excel S* потом *Recombiplastin 2G* > *Neoplastin R* > *Neoplastin CI Plus* > *Triniclot PT Excel* > *Triniclot PT HTF* > *Innovin* као најмање сензитиван (178). Додатно, резултати студије која се бавила испитивањем сензитивности стандардних коагулационих тестова код пацијената са АФ који су били на терапији ривароксабаном или дабигатраном, показали су да се сензитивност РТ-INR теста на ривароксабан драстично разликује у зависности који се реагенс користи. Приликом коришћења *Neoplastin* реагенса, сензитивност је била 97,5% док је у случају *Innovin* реагенса сензитивност била 67,7%. Заправо то значи да ће се концентрације активног лека у плазми погрешно тумачити у 32% случајева приликом коришћења *Innovin*-а (179). Различита сензитивност реагенса се може делом објаснити различитим саставом реагенса. Наиме, потврђено је да се сензитивност протромбинског времена према ривароксабану повећава када се умањи концентрација ТФ или повећа концентрација соли или фосфолипида. С друге стране сензитивност се смањује уколико се повећа концентрација фосфатидилсерина (180).

Упркос коришћењу и најсензитивнијих реагенаса, вредности протромбинског времена ће бити продужене како код највиших тако и код најнижих концентрација ривароксабана у плазми. Једна од претпоставки за варирање вредности протромбинског времена може бити објашњена тиме да се максимална концентрација ривароксабана се постиже три сата након узимања лека док је пацијентима у нашој студији узимана крв у

просеку $3 \pm 2,07$ сати након последње дозе ДОАК-а. Сензитивност тромбoplastина на ривароксабан и чињеница да овим тестом не добијамо комплетну слику о хемостатском потенцијалу пацијента, су разлози због којих се РТ треба користити само у ургентним ситуацијама са најсензитивнијим реагенсом (123, 181). Додатно, имајући у виду да се ISI заснива на осетљивости реагенаса на витамин К зависне факторе, мерењем INR-а не можемо добити праву слику о пацијентима који су на терапији ДОАК (182). Стога су неопходне додатне студије које ће дати специфичније препоруке у смислу избора реагенаса када је у питању праћење пацијената на терапији ривароксабаном.

С друге стране, иако ривароксабан доводи до продужења аРТТ-а, праћење пацијената на терапији ривароксабаном путем овог теста се не препоручује због мање сензитивности у поређењу са РТ/INR тестом (127, 135, 137). Главни разлог варијабилности резултата код активiranог парцијалног тромбoplastинског времена јесте коришћење различитих коагулометара и реагенаса. Изненађујуће је да су неки реагенси несензитивни на високе концентрације ривароксабана тј. не долази до промене у вредностима аРТТ-а (127). На основу свега наведеног, протромбинско време се сматра погоднијим тестом од активiranог парцијалног тромбoplastинског времена за процену антикоагулантног интезитета код пацијената који су на терапији ривароксабаном.

Када је у питању третман другим испитиваним директним оралним антикоагулансом, дабигатраном, у нашој студији приметили смо значајно продужење оба времена у односу на здраве испитанике приликом анализе резултата (РТ-INR и аРТТ). Међутим, корелација између РТ-INR методе и концентрације дабигатрана у плазми измерене помоћу LC-MS/MS је била слаба. Ови подаци су у складу са многим ранијим студијама које изводе закључак да је употреба РТ-INR теста за праћење терапије дабигатраном неадекватна (149, 183, 184).

С друге стране, аРТТ тест се чини бољим када је реч о пацијентима на терапији дабигатраном због снажне линеарне корелације концентрације дабигатрана у плазми измерене помоћу LC-MS/MS и аРТТ теста (185). Међутим, истраживање *van Raay* и сарадника је показало да при концентрацији дабигатрана у плазми већој од 200 ng/ml не долази до промене у вредностима аРТТ-а (186). Додатно, *Weltermann A* са сарадницима је показао да код пацијената са АФ на терапији дабигатраном у дози од 150 mg, не долази до продужетка аРТТ вредности или су промене минималне (187). С друге стране, претходна истраживања показују да је аРТТ продужен независно од реагенаса при концентрацијама дабигатрана изнад 100 ng/ml (185) или 120 ng/ml (186). Иако је наше испитивање у складу са многобројним студијама не можемо се ослонити на то да ће физиолошке вредности аРТТ искључити присуство дабигатрана. Наиме, у нашем истраживању код три пацијента са концентрацијом дабигатрана у плазми испод 19 ng/ml и једног пацијента са 154 ng/ml, су уочене нормалне вредности аРТТ. Додатно, физиолошке вредности аРТТ описују малу антикоагулантну активност као и да благо повишене вредности могу описати клинички значајан ниво дабигатрана (20). Још један од потенцијалних проблема ове методе јесте различита сензитивност реагенаса на дабигатран. Након испитивања сензитивности овог теста, утврђено је да је најсензитивнији реагенс на дабигатран: Aktin FS потом STA-Cephascreebm STA-C.KC Prest, SynthasiL, STA-PTT-Automate (170).

Претраживањем литературе, пронашли смо једно од могућих објашњења када је реч о већем утицају реагенаса из РТ-INR теста на ривароксабана као и то да реагенси који се користе за аРТТ метод имају већи утицај на дабигатран. Неки научници претпостављају да различити ефекат ривароксабана и дабигатрана на РТ и аРТТ може бити због разлике у моларним концентрацијама које су веће када је у питању

ривароксабан у односу на дабигатран (30% за веће концентрације и 25% за ниже концентрације) (180).

С друге стране, неки пацијенти развију резистенцију на високе дозе антикоагуланаса (може бити комплетна или некомплетна) која се може јавити при првом коришћењу лека или након дужег периода терапије. Феномен антикоагулантне резистенције или неефикасности дабигатрана још увек није истражен и документован у литератури као је то случај код варфарина и хепарина (188, 189). Стога не можемо у потпуности бити сигурни да ли постоји овакав феномен код ДОАК док се не открије тест који је довољно прецизан за праћење антикоагулантног ефекта ДОАК. Из рада који описује два приказа случаја пацијента са АФ на терапији дабигатраном (један на терапији 110 mg а други на терапији 150 mg) који су били кандидати за директну електричну кардиоверзију, примећујемо да су оба пацијента имала различите вредности аРТТ. Код првог пацијента (110 mg) вредност аРТТ је била продужена док је код другог пацијента била аРТТ нормална. Из свега претходно наведеног, сматрамо да се не можемо ослонити чак ни у хитним случајевима на праћење антикоагулантног ефекта дабигатрана овим тестом (190).

5.3. ЕФЕКТИ ДОАК НА ГЛОБАЛНУ ХЕМОСТАЗУ

С обзиром да стандардни коагулациони тестови нису у потпуности сигурни када је реч о праћењу пацијената са АФ на терапији ДОАК, велика пажња научне јавности усмерена је ка проналажењу једноставног, брзог и исплативог глобалног хемостатског теста. Познато је да код стандардних коагулационих тестова (PT-INR, aPTT) крајњу тачку формирања угрушка представља моменат у коме се створи око 3% тромбина. Имајући у виду да се око 96% тромбина генерише након формирања угрушка, глобални тестови одговорни за продукцију тромбина обезбеђују комплетнију слику о пацијентовом хемостатском статусу (191). Тестови продукције тромбина (ETP, САТ) се користе ради мерења стварања и активности током времена. За детектовање продукције тромбина, код INNOVANCE ETP методе се користи хромофорски субстрат док се код САТ методе користи флуорогени субстрат. Глобални хемостатски тестови тј. тестови продукције (генерације) тромбина, су се показали ефикасним код пацијената са различитим обољењима нпр. код пацијената са хемофилијом (192) као и код пацијената са благим обликом коагулопатије (193). Већ дуже време, научници трагају за идеалним глобалним хемостатским тестом који ће ући у рутинску лабораторијску праксу код пацијената са невалвуларном АФ на терапији ДОАК.

Синтеза тромбина је веома важна за формирање фибрина. Наиме мале количине тромбина су неопходне за покретање згрушавања. Уколико се смањи или повећа продукција тромбина убрзо долази до хемостатског дисбаланса. Сходно томе, како би добили комплетну слику хемостатског статуса пацијента, утврдили смо укупни хемостатски потенцијал (ОНР) који нам описује продукцију фибрина.

Према нашим сазнањима ово је прва студија у којој су испитиване две стандардне дозе два различита ДОАК на три глобалне хемостатске методе: ETP, САТ и ОНР. Стога, сматрамо наше резултате иновативним и да могу пружити увид у процену антикоагулантног одговора код пацијената са АФ. Додатно, пратили смо особине фибриног угрушка код пацијената и контролне групе тј. турбидиметријске параметре. Атријална фибрилација, као једна од најозбиљнијих аритмија удружена је са повећаним дугорочним ризиком од тромбоемболијских компликација због неправилних преткоморских контракција и стазе крви што последично доводи до формирања преткоморског тромба. Сматра се да је хиперкоагулабилност одговорна за настанак компликација код пацијената са АФ. Раније спроведена истраживања говоре у прилог повећања маркера тромбина, активности тромбоцита, системског фибрина и Д-димера (7-9).

Претраживањем литературе, увидели смо да се неколико група истраживача бавило поређењем глобалних хемостатских тестова са индиректно мереном концентрацијом ДОАК у плазми (149, 194-197). Међутим ни једна научна група се није бавила поређењем антикоагулантног ефекта ривароксабана и дабигатрана са директно мереном концентрацијом оба лека у плазми примењена у оба дозна режима код пацијената са АФ. У циљу комплетирања слике о пацијентима са АФ, пратили смо клиничке карактеристике ових пацијената и њихову повезаност са глобалним хемостатским тестовима.

5.4. ЕФЕКТИ РИВАРОКСАБАНА И ДАБИГАТРАНА НА ПАРАМЕТРЕ ЕТР ТЕСТА

Приликом праћења ендогеног тромбинског потенцијала, са циљем процене стварања тромбина, између контролне и експерименталних група, показана је значајна разлика у количини тромбина (површина испод криве) као и у максималној концентрацији насталог тромбина. Наиме, наша сазнања јасно указују да је продукција тромбина мерена хромогеним ЕТР тестом значајно смањена приликом оба дозна режима ривароксабана (15/20 mg) и дабигатрана (110/150 mg), у поређењу са здравим појединцима. Генерално посматрано, продукција тромбина је била нижа код пацијената на терапији ривароксабаном у односу на пацијенте који су примали дабигатран. Једно од потенцијалних објашњења јесте да ривароксабан може да повећа ниво инхибитора пута ткивног фактора (TFPI), који је познат по способности да инхибира фактор Ха, директно или преко комплекса који чине ткивни фактор/фактор VIIa (198). Други потенцијалан разлог јаче супресије продукције тромбина у групи пацијената на терапији ривароксабаном може бити због генерално већег нивоа ривароксабана у плазми у поређењу са нивоима дабигатрана у плазми (106). Иако у клиничким студијама није извршено директно поређење ривароксабана и дабигатрана, очекиване вредности номиналних концентрација су више код ривароксабана него код дабигатрана (186, 199).

Сви параметри ЕТР методе (ЕТР, с-мах, t-lag, t-мах) су повезани са концентрацијом оба ДОАК у плазми мереном уз помоћ LC-MS/MS. Међутим, изгледа да је најсензитивнији параметар за процену антикоагулантног ефекта ривароксабана, максимална продукција тромбина тј. с-мах ($r^2=-0,85$). Када је у питању терапија дабигатраном, оба параметра: ЕТР ($r^2=-0,75$) и с-мах ($r^2=-0,74$) су показала јаку корелацију са концентрацијом дабигатрана у плазми. Слична сазнања су претходно уочена уз помоћ индиректног одређивања концентрације ривароксабана и дабигатрана (149, 200, 201). Наиме, група научника која је испитивала пацијенте са АФ на терапији ривароксабаном или дабигатраном и повезаност са индиректно мереном концентрацијом ових лекова у плазми (НТИ), добили су резултате који корелирају са нашим сазнањима (149). *Shenk* и сарадници су испитивали утицај ривароксабана на параметре ЕТР теста код здравих испитаника. Примећено је снижење масималне концентрације тромбина али се количина тромбина посматрана као површина испод криве није значајно променила (200). Мерењем продукције тромбина помоћу *Innovance* ЕТР теста, група научника (202) је показала да је максимална концентрација тромбина (с-мах) корелирала са индиректно мереном концентрацијом дабигатрана ($r=-0,76$) што је у складу са нашим резултатима.

Анализом наших података, терапија ривароксабаном је значајно продужила t-lag и t-мах у односу на терапију дабигатраном. Неки научници су покушали да пронађу објашњење које се односи на то да продужење времена за настанак тромбина током терапије ривароксабаном указује на потенцијални ефекат ривароксабана на фазе иницијације и пропагације коагулационе каскаде. Сматра се да механизам који лежи у основи овог ефекта јесте некомпетитивна инхибиција протромбиназа-везаног фактора Ха у претходно наведеним фазама и последично смањење продукције тромбина као и реверзне активације фактора V и фактора VIII (147, 203).

Према нашим сазнањима, ово је прва студија која се бавила поређењем параметара ЕТР теста и демографских/клиничких карактеристика пацијената са АФ. Од свих праћених карактеристика пацијената, уочена је повезаност између брзине бубрежне функције и ЕТР параметра у групи која је била на терапији ривароксабаном ($r^2=-0,32$; $p<0,05$) као и у групи која је примала дабигатран ($r^2=-0,30$; $p<0,05$). Из

претходно објашњених резултата можемо закључити да пацијенти са смањеном бубрежном функцијом на терапији оба ДОАК имају повећану продукцију тромбина. Заправо, претходно спроведена истраживања, показују сличност са нашим резултатима (204, 205). Прва група истраживача објашњава повезаност смањене реналне функције са повећаном концентрацијом протромбинског фрагмента 1+2 (204). Друга група научника је покушала да објасни на који начин пацијенти са хроничним обољењем бубрега имају високе концентрације хемостатских фактора (Д-димер, фибриноген, фактор VII) Наиме, пацијенти са ослабљеном бубрежном функцијом, имају и оштећење нефрона које смањује бубрежну функцију и последично смањује уклањање прокоагулантних материја. Додатно, уочено је да је елиминација Д-димера и фибриногена смањена код пацијената са хроничним бубрежним обољењем. Међутим, спровођењем TEG анализе, примећено је да не постоји повезаност између динамике коагулационог процеса (од иницијалном формирања тромбина до стварања фибрина) и бубрежне функције у поређењу са здравим појединцима (205).

С друге стране, нашим резултатима смо показали инверзну повезаност између телесне масе пацијената на терапији ривароксабаном и дабигатраном са продукцијом тромбина тј. ETP параметром ($r^2=-0,35$; $r^2=-0,34$ редом $p<0,05$). Ранија истраживања на пољу утицаја телесне масе на хемостатске параметре (продукција тромбина, F1+2 фрагмент, TФ), су показала да се са смањењем масе код морбидно гојазних пацијената смањује могућност настанка хиперкоагулабилног стања код ових пацијената (206). Додатно, у студији спроведеној на гојазним пацијенткињама (индекс телесне масе > 30), уочено је повећање продукције тромбина (ETP параметра из ETP и САТ анализе) што повећава ризик од тромбоемболијских компликација (207).

5.5. ЕФЕКТИ РИВАРОКСАБАНА И ДАБИГАТРАНА НА ПАРАМЕТРЕ САТ ТЕСТА

Други тест за праћење продукције тромбина уз помоћ флуорогеног субстрата који је спроведен у нашем истраживању јесте САТ метод. Приликом анализе резултата експерименталне и контролне групе, приметили смо парадоксално повећан ниво ендогеног тромбинског потенцијала (AUC) и максималних вредности концентрације тромбина код пацијената који су били на терапији дабигатраном. Слични резултати су добијени у истраживањима других научника (147, 194). Генерално посматрано, тромбин који се веже за $\alpha 2M$ -макроглобулин губи способност да интерагује са фибриногеном, међутим интеракција са молекулима мале молекулске масе је могућа. Један од представника таквих молекула јесте дабигатран. Аутори раније спроведених истраживања су покушали да објасне овај феномен повећане продукције тромбина као резултат блокаде активности калибратора ($\alpha 2M$ -тромбин комплекса) који се користи у САТ методи, од стране ниско-молекуларног једињења, дабигатрана. Последишно се смањује вредност калибрационог сигнала што доводи касније до експлозије тромбина. Да би се избегао овај недостатак, предложено је да се користи флуоресцентни раствор 7-амино-4-метилкумарина. Додатни разлог повећане продукције тромбина приликом терапије дабигатраном и употребе САТ метода јесте тај да систем који се користи за израчунавање флуоресценције не узима у обзир чињеницу да дабигатран инхибира $\alpha 2M$ -тромбин комплекса (194, 201).

Такође терапија дабигатраном узрокује продужење lag time и tpreak, што може да буде последица инхибиције активности тромбина у фазама коагулације: иницијације и амплификације што даље води ка смањењу реактивације фактора V и VIII (147). За разлику од дабигатрана, инхибитор фактора Ха, ривароксабан је значајно утицао на снижење максималне концентрације тромбина (reak параметар), међутим утицај на продукцију тромбина (AUC параметар) је изостао. Сматра се да је смањен утицај ривароксабана на продукцију тромбина последица одлагања фазе распадања или инхибиције TFPI (208). Резултати још једног истраживања показују да је ривароксабан мање утицао на ETP параметар од варфарина док су вредности reak параметра биле значајно ниже у групи која је била на терапији ривароксабаном. Сматра се да ETP зависи од фазе пропагације и терминације у процесу продукције тромбина (209). У *in vitro* студијама је уочена је смањена осетљивост на директне инхибиторе фактора Ха. Претпоставља се да је разлог томе инхибиција позитивне повратне спреге фактора Ха на фактор VII. Та инхибиција последишно доводи до продужења времена до почетка стварања тромбина и времена до постизања максималне продукције тромбина (182).

Пошто се из претходно наведених резултата, не можемо ослонити на праћење глобалне хемостазе код пацијената са АФ на терапији дабигатраном, урадили смо анализу корелације када је у питању терапија ривароксабаном. Чак и када је реч о пацијентима на терапији ривароксабаном, САТ показује мању сензитивност од ETP теста. Могуће објашњење за неосетљивост ривароксабана може бити промена нивоа фактора Ха током реакције, што може да утиче на ниво комплекса фактора Ха и ривароксабана (209).

5.6. ЕФЕКТИ РИВАРОКСАБАНА И ДАБИГАТРАНА НА ПАРАМЕТРЕ ОНР ТЕСТА

У циљу добијања информација о завршној фази коагулације (формирања фибриноског угрушка), утврђивањем коагулантне као и фибринолитичке активности, користили смо ОНР тест. Ранија истраживања су показала да ОНР метод може да се користи за испитивање глобалне хемостазе током третмана антикоагулансима (150, 210). Према нашим последњим сазнањима, ова студија је прва која се бавила истраживањем ефеката ривароксабана и дабигатрана код пацијената са атријалном фибрилацијом коришћењем ОНР теста. Обе дозе, 110/150 mg дабигатрана су значајно довеле до смањења вредности ОНР и ОСП параметара, указујући на смањено формирање фибрина. У исто време, повећане вредности ОФР параметра код пацијената који су били на терапији дабигатраном потенцијално указује на профибринолитичка својства дабигатрана. Предложени механизми који су укључени у остваривање профибринолитичких својстава дабигатрана јесу смањена активација ТАГ1 и последично ограничавање активности плазмина (211, 212).

С друге стране, чини се да ОНР није довољно сензитиван када су у питању терапеутске концентрације ривароксабана. Потенцијално објашњење за такав резултат може бити утицај ривароксабана само на фазу настанка тромбина а не на касније фазе хемостазе као што су формирање и стабилност угрушка. Додатно, показано је да је коришћење ROTEM/TEG методе тј. анализом пуне крви пацијената са атријалном фибрилацијом који су били на терапији ривароксабаном, недовољно ефикасно (209, 2013). Међутим, код пацијената са изузетно високом концентрацијом ривароксабана (изнад 400 ng/ml), вредности ОНР параметра су се смањиле што потенцијално може да укаже на бољу сензитивност ОНР методе при високим концентрацијама овог директног инхибитора фактора Ха.

Анализом појединачних пацијената, наишли смо на интересантне резултате. Наиме, уочили смо бројна одступања од резултата које смо добили приликом анализе читавих група и подгрупа пацијената. Неки од пацијената су имали нормалан хемостатски капацитет (ОНР и ЕТР вредности су биле у референтном опсегу) приликом концентрације ривароксабана (50–346 ng/ml) и дабигатрана (15–154 ng/ml) у плазми. Интересантно је да су неки од пацијената имали повишене PT-INR и aPTT вредности како у групи пацијената која је била на терапији како ривароксабаном тако и у групи пацијената која је била на терапији дабигатраном. Код једног пацијената који је био на терапији дабигатраном уочене су нормалне вредности aPTT при плазма концентрацији од 15 ng/ml. С друге стране, пацијент са истом концентрацијом дабигатрана је имао веће вредности aPTT од референтних. Међутим код оба пацијента је уочена нормална хемостаза на основу резултата ОНР и ЕТР методе. Стога, глобални хемостатски тестови потенцијално могу боље да рефлектују одсуство ризика од крвављења него стандардни тестови код неких пацијената.

5.7. БЕЗБЕДАН НИВО КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ДОАК У ПЛАЗМИ И ЕТР ТЕСТ

Као што је раније поменуто, праћење терапије директним оралним антикоагулансима није увек неопходно. Међутим, постоје ситуације у којима је мерење концентрације/или интензитета антикоагулантних лекова пожељно (припрема за операцију, пацијенти са великим крвављењима, са лек-лек интеракцијама).

Данас постоји више врста тестова који се користе за праћење пацијената на терапији ДОАК:

а) рутински стандардни коагулациони тестови којима се брзо може утврдити присуство или одсуство лека (пре тромболизе или хитне операције)

б) бројни квантификациони тестови уколико су пацијенти гојазни, приликом лек-лек интеракција или бубрежне дисфункције) (126).

Раније споменути рутински тестови (PT-INR за ривароксабан и aPTT за дабигатран) се могу користити у неким ситуацијама ради добијања потврде о присуству или одсуству ДОАК у плазми али се не могу са сигурношћу користити код сваког пацијента (127). Такође, због велике осетљивости, физиолошке вредности тромбинског времена код пацијената који су на терапији дабигатраном са озбиљним крвављењима могу да искључе присуство клинички значајних нивоа дабигатрана. С друге стране, да би се одредила концентрација лека у плазми могу се користити квантитативни тестови као што су: анти Ха фактор или dTT или ЕСТ/ЕСА. Резултати ових тестова могу бити од велике користи када треба донети важну одлуку о могућем укључивању антидота или у било којој другој критичној ситуацији. Сматра се да је концентрација ДОАК у плазми која је већа од 50 ng/ml довољна за потенцијалну примену антидота. Додатно, мерење концентрације ДОАК је јако важно код пацијената који су под великим ризиком (велике кардиолошке, васкуларне или неуролошке операције). У претходном истраживању, аутори препоручују да је неопходно да ниво концентрације ривароксабана и дабигатрана у плазми код пацијената пре одласка на операцију буде ≤ 30 ng/ml (214).

С друге стране, када је реч о пацијентима који треба да се подвргну некој клиничкој интервенцији (нпр. тромболиза) праћење концентрације/антикоагулантног ефекта ДОАК је неопходно. Према ранијим фармакокинетичким студијама и мишљењима експерта, да би се спровела тромболиза, ниво концентрације ривароксабана у плазми мора бити испод 100 ng/ml док у случају дабигатрана испод 50 ng/ml (128, 215). Праћење концентрације дабигатрана и ривароксабана у плазми је неупоредиво лакше у поређењу са другим оралним антикоагулансима због бољих фармакокинетских и фармакодинамских особина. Међутим треба увек имати у виду да ниво ДОАК у плазми не мора увек да буде повезан са антикоагулантним капацитетом што смо објаснили у делу са појединачним пацијентима. Сходно томе, постоје многи глобални хемостатски тестови чији параметри нам потенцијално могу помоћи у мерењу антикоагуланте активности ових лекова.

У циљу одређивања који параметар глобалних хемостатских тестова је најприкладнији за праћење антикоагулантне активности, спровели смо анализу којом би смо утврдили које концентрације оба лека могу да смање продукцију тромбина не више од 50% у односу на здраве појединце. С обзиром да је ЕТР параметар показао најбољу повезаност са концентрацијом оба директна орална антикоагуланса у плазми у поређењу са осталим глобалним хемостатским тестовима, конструисали смо ROC криву за овај параметар. Вредности ЕТР параметра 50% изнад референтних вредности, указују на то да пацијент има концентрацију дабигатрана испод 50 ng/ml, који се сматра безбедним када су у питању било које клиничке интервенције укључујући тромболизу

(216). Ови пацијенти су потенцијално безбедни када је у питању значајан ризик од крвављења што се ипак мора потврдити у већим клиничким истраживањима. Узимајући у обзир безбедност пацијента који су примали ривароксабан приликом клиничких интервенција, не можемо извести закључак као што смо у случају дабигатрана. На жалост нисмо могли да спроведемо анализе за нивое ривароксабана испод 50 ng/ml али смо спровели за пацијенте са концентрацијом ривароксабана испод 100 ng/ml. За ниво концентрације ривароксабана у плазми испод 100 ng/ml смо добили исте резултате као код дабигатрана. С обзиром да је јако мали број пацијената укључен у ову анализу, не можемо да изведемо јасан закључак јер концентрација одговара терапеутском нивоу који је претходно описан (135). Ови пацијенти би требало потенцијално да буду безбедни у смислу смањеног ризика од крвављења, међутим да би се извукао овакав закључак неопходна су већа клиничка истраживања.

5.8. БУДУЋА ИСТРАЖИВАЊА

Потенцијалан недостатак овог истраживања може бити разлика у старости између испитаника у контролној групи и пацијената са АФ, што може да утиче на нормалне вредности параметара глобалних хемостатских тестова. Међутим претходна истраживања не могу још увек са сигурношћу да потврде да ли се продукција тромбина и хемостатски капацитет повећавају током старења (217). Могући начин да се избегне овај проблем јесте да се узорци крви пацијената са АФ анализирају пре почетка третмана ДОАК и упоредити те вредности са вредностима након третмана ДОАК што представља једну од наших идеја за будућа истраживања.

Додатно, узимајући у обзир значај клиничких исхода као што су тромбоза и крвављење код пацијената који су на терапији директним оралним антикоагулансима, било би интересантно да истражимо повезаност концентрације ДОАК у плазми и ових клиничких догађаја. Пошто је инциденца крвављења и тромбозе била ниска упркос широком терапеутском опсегу, није једноставно спровести студију која се бави повезаношћу клиничких исхода и глобалних хемостатских тестова.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Анализом резултата глобалних хемостатских тестова (ЕТР, САТ и ОНР), ово истраживање нам указује на измењену коагулацију код пацијената са атријалном фибрилацијом на терапији ривароксабаном или дабигатраном у односу на здраве појединце (контролну групу).
2. Хромогени тест продукције тромбина, ЕТП тест, се чини потенцијално погодним за одређивање хемостатског капацитета код пацијената са атријалном фибрилацијом на терапији како ривароксабаном тако и дабигатраном. Параметри ЕТП методе указују на смањену продукцију тромбина и продужено време до почетка стварања тромбина као и максималне концентрације код пацијената на терапији ДОАК. Утврђена је снажна повезаност између параметара ЕТП теста и концентрације оба ДОАК у плазми.
3. Резултати другог теста продукције тромбина, САТ теста, нам указују на недовољну осетљивост за терапију ривароксабаном код пацијената са атријалном фибрилацијом што се потврђује слабом корелацијом са концентрацијом лека у плазми. С друге стране, сматрамо да је САТ тест неадекватан за праћење пацијената на терапији дабигатраном код пацијената са АФ, због парадоксално високих вредности продукције тромбина у односу на контролу.
4. Ривароксабан није утицао на параметре ОНР теста код пацијената са АФ док се у групи пацијената на терапији дабигатраном значајно смањио укупни коагулациони и хемостатски потенцијал и повећао фибринолитички потенцијал. Улога ОНР теста се мора потврдити у додатним истраживањима јер није показана повезаност између параметара ОНР теста и концентрације ДОАК у плазми.
5. Иако је утврђена јака повезаност између концентрације ривароксабана у плазми и РТ-INR теста као и између концентрације дабигатрана у плазми и аРТТ теста, не можемо са сигурношћу тврдити да су ове методе погодне за праћење пацијената са атријалном фибрилацијом.
6. Утврдили смо умерену повезаност између концентрације ривароксабана/дабигатрана у плазми са бубрежном функцијом као и телесном масом код пацијената са атријалном фибрилацијом. Такође, уочили смо умерена корелација ЕТР параметра са бубрежном функцијом као и телесном масом код пацијената са атријалном фибрилацијом.
7. ЕТР параметар аутоматизованог хромогеног теста има велики потенцијал у искључивању високих концентрација дабигатрана у плазми код пацијената са атријалном фибрилацијом што је од великом значаја уколико пацијент треба да се изложи некој клиничкој интервенцији.

VII

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Astrup T. The hemostatic balance. *Thromb Diath Haemorrh.* 1958; 2(3-4): 347–357.
2. Gaffney PJ, Edgell TA, Whitton CM. The hemostatic balance: Astrup revisited. *Haemostasis.* 1999; 29(1): 58–71.
3. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J.* 2008; 359(9): 938–949.
4. Bonar RA, Lippi G, Favaloro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 3–27.
5. Gorog DA. Prognostic value of plasma fibrinolysis activation markers in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(24): 2701–2709.
6. Hassouna HI. Thrombophilia and hypercoagulability. *Med Princ Pract.* 2009; 18(6): 429–440.
7. Watson T, Shantsila E, Lip GY. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet.* 2009; 373(9658): 155–166.
8. Colkesen Y, Acil T, Abayli B, Yigit F, Katircibasi T, Kocum T, et al. Mean platelet volume is elevated during paroxysmal atrial fibrillation: a marker of increased platelet activation? *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008; 19(5): 411–414.
9. Cohen A, Ederhy S, Meuleman C, Di Angelantonio E, Dufaitre G, Voccara F. D-dimers in atrial fibrillation: a further step in risk stratification of thrombo-embolism? *Eur Heart J.* 2007; 28(18): 2179–2180.
10. Kumagai K, Fukunami M, Ohmori M, Kitabatake A, Kamada T, Hori N. Increased intra-cardiovascular clotting in patients with chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 1990; 16(2): 377–380.
11. Marin F, Roldan V, Lip GY. Fibrinolytic function and atrial fibrillation. *Thromb Res.* 2003; 109(5-6): 233–240.
12. Akar JG, Jeske W, Wilber DJ. Acute onset human atrial fibrillation is associated with local cardiac platelet activation and endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51(18): 1790–1793.
13. Lim HS, Willoughby SR, Schultz C, Gan C, Alasady M, Lau DH, Leong DP, et al. Effect of atrial fibrillation on atrial thrombogenesis in humans: impact of rate and rhythm. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61(8): 852–860.
14. Hijazi Z, Oldgren J, Siegbahn A, Granger CB, Wallentin L. Biomarkers in atrial fibrillation: a clinical review. *Eur Heart J.* 2013; 34(20): 1475–1480.
15. Lip GY, Beevers DG. ABC of atrial fibrillation. History, epidemiology, and importance of atrial fibrillation. *BMJ.* 1995; 311(7016): 1361–1363.
16. Cheng TO. Hippocrates and cardiology. *Am Heart J.* 2001; 141(2): 173–183.
17. Fazekas T. The concise history of atrial fibrillation. *Orvostort Kozl.* 2007; 53(3-4):37–68.
18. Mackenzie J. Observations on the Inception of the Rhythm of the Heart by the Ventricle: As the cause of Continuous Irregularity of the Heart. *Br Med J.* 1904; 1(2253): 529–536.
19. Corradi D. Atrial fibrillation from the pathologist's perspective. *Cardiovasc Pathol.* 2014; 23(2): 71–84.
20. Lévy S, Breithardt G, Campbell RW, Camm AJ, Daubert JC, Allessie M, et al. Atrial fibrillation: current knowledge and recommendations for management. Working Group on Arrhythmias of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 1998; 19(9): 1294–1320.
21. Chutani SK, Imran N, Kanjwal Y. Atrial fibrillation: current concepts. *Int J Health Sci (Qassim).* 2008; 2(1): 85–90.

22. Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, Domenicucci S. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol*. 2014; 6: 213–220.
23. Wilke T, Groth A, Mueller S, Pfannkuche M, Verheyen F, Linder R, et al. Incidence and prevalence of atrial fibrillation: an analysis based on 8.3 million patients. *Europace*. 2013; 15(4): 486–493.
24. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke*. 1991; 22(8): 983–988.
25. Kimura K, Minematsu K and Yamaguchi T. Japan Multicenter Stroke Investigators' Collaboration (J-MUSIC). Atrial fibrillation as a predictive factor for severe stroke and early death in 15,831 patients with acute ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76(5): 679–683.
26. Anne W, Willems R, Roskams T, Sergeant P, Herijgers P, Holemans P, et al. Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2005; 67(4): 655–666.
27. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace*. 2010; 12(10): 1360–1420.
28. Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation*. 1997; 96(4):1180–1184.
29. Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, et al. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipofibrokines. *Eur Heart J*. 2015; 36(13): 795–805a.
30. Rocken C, Peters B, Juenemann G, Saeger W, Klein HU, Huth C, et al. Atrial amyloidosis: an arrhythmogenic substrate for persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 2002; 106(16): 2091–2097.
31. Schotten U, Ausma J, Stellbrink C, Sabatschus I, Vogel M, Frechen D, et al. Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2001; 103(5): 691–698.
32. Dobrev D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, et al. The G protein-gated potassium current I(K,ACh) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2005; 112(24): 3697–3706.
33. Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, et al. Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation*. 2014; 129(2): 145–156.
34. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*. 2012; 125(17): 2059–2070.
35. Roberts R. Mechanisms of disease: genetic mechanisms of atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; 3(5): 276–282.
36. Goodacre S, Irons R. ABC of clinical electrocardiography: Atrial arrhythmias. *BMJ*. 2002; 324(7337): 594–597.
37. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, et al. 2016 ESC Guidelines for the Management of Atrial Fibrillation Developed in Collaboration With EACTS. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2017; 70(1): 50.
38. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on

- Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57(11):e101–e198.
39. Levy S, Novella P, Ricard P, Paganelli F. Paroxysmal atrial fibrillation: a need for classification. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1995; 6(1): 69–74.
 40. Markides V, Schilling RJ. Atrial fibrillation: classification, pathophysiology, mechanisms and drug treatment. *Heart*. 2003; 89(8): 939–943.
 41. Gallagher MM, Camm J. Classification of atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 1998; 82(8A): 18N–28N.
 42. Al-Khatib SM, Wilkinson WE, Sanders LL, McCarthy EA, Pritchett EL. Observations on the transition from intermittent to permanent atrial fibrillation. *Am Heart J*. 2000; 140(1): 142–145.
 43. Vroomen M, Pison L. Lone Atrial Fibrillation: Risk Factors, Triggers And Ablation Techniques. *J Atr Fibrillation*. 2015; 8(1): 1203.
 44. Ahuja RC, Sinha N, Saran RK, Jain AK, Hasan M. Digoxin or verapamil or metoprolol for heart rate control in patients with mitral stenosis: a randomized cross-over study. *Int J Cardiol*. 1989; 25(3): 325–331.
 45. Jung F, DiMarco JP. Treatment strategies for atrial fibrillation. *Am J Med*. 1998; 104(3): 272–286.
 46. Koh KK, Song JH, Kwon KS, Park HB, Baik SH, Park YS, et al. Efficacy and safety of digoxin alone and in combination with low-dose diltiazem or betaxolol to control ventricular rate in chronic atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 1995; 75: 88–90.
 47. Arrigo M, Bettex D, Rudiger A. Management of atrial fibrillation in critically ill patients. *Crit Care Res Pract*. 2014; 2014: 840615. doi:10.1155/2014/840615.
 48. Fauchier L, Laborie G, Clementy N, Babuty D. Beta-blockers or Digoxin for Atrial Fibrillation and Heart Failure? *Card Fail Rev*. 2016; 2(1): 35–39.
 49. Ogunsua AA, Shaikh AY, Ahmed M, McManus DD. Atrial Fibrillation and Hypertension: Mechanistic, Epidemiologic, and Treatment Parallels. *Methodist Debaquey Cardiovasc J*. 2015; 11(4): 228–234.
 50. Oladiran O, Nwosu I. Stroke risk stratification in atrial fibrillation: a review of common risk factors. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2019; 9(2): 113–120.
 51. Daley R, Mattingly TW, Holt CL, Bland EF, White PD. Systemic arterial embolism in rheumatic heart disease. *Am Heart J*. 1951; 42(4): 566–581.
 52. Gage BF, Waterman AD, Shannon W, Boechler M, Rich MW, Radford MJ. Validation of clinical classification schemes for predicting stroke: results from the National Registry of Atrial Fibrillation. *JAMA*. 2001; 285(22): 2864–2870.
 53. Go AS, Hylek EM, Chang Y, Phillips KA, Henault LE, Capra AM, et al. Anticoagulation therapy for stroke prevention in atrial fibrillation: how well do randomized trials translate into clinical practice? *JAMA*. 2003; 290(20): 2685–2692.
 54. Whitaker IS, Rao J, Izadi D, Butler PE. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *Br J Oral Maxillofac Sur*. 2004; 42(2): 133–137.
 55. Singh AP. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complement Ther Clin Pract*. 2010; 16(4): 213–215.
 56. Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol*. 2008; 141(6): 757–763.
 57. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2007; 146(12): 857–867.

58. Rosendaal FR. The Scylla and Charybdis of oral anticoagulant treatment. *N Engl J Med.* 1996; 22; 335(8): 587–589.
59. Harter K, Levine M, Henderson SO. Anticoagulation drug therapy: a review. *West J Emerg Med.* 2015; 16(1): 11–17.
60. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* 2012; 141(2 Suppl): e24S–e43S.
61. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(7): 1094–1096.
62. Bussey H, Francis J, Heparin Consensus Group. Heparin overview and issues. *Pharmacotherapy.* 2004; 24(8Pt 2): 103S–107S.
63. Ahmed I, Majeed A, Powell R. Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update. *Postgrad Med J.* 2007; 83(983): 575–582.
64. Arepally GM. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2017; 25; 129(21): 2864–2872.
65. Alquwaizani M, Buckley L, Adams C, Fanikos J. Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications. *Curr Emerg Hosp Med Rep.* 2013; 1(2): 83–97.
66. Gajic-Veljanoski O, Phua CW, Shah PS, Cheung AM. Effects of Long-Term Low-Molecular-Weight Heparin on Fractures and Bone Density in Non-Pregnant Adults: A Systematic Review With Meta-Analysis. *J Gen Intern Med.* 2016; 31(8): 947–957.
67. Lefkou E, Khamashta M, Hampson G, Hunt BJ. Review: Low-molecular-weight heparin-induced osteoporosis and osteoporotic fractures: a myth or an existing entity? *Lupus.* 2010; 19(1): 3–12.
68. 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.
69. Kuruvilla M, Gurk-Turner C. A review of warfarin dosing and monitoring. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2001;14(3): 305–306.
70. Odén A, Fahlén M, Hart RG. Optimal INR for prevention of stroke and death in atrial fibrillation: a critical appraisal. *Thromb Res.* 2006; 117(5): 493–499.
71. Zacharski LR, Prandoni P, Monreal M. Warfarin versus low-molecular-weight heparin therapy in cancer patients. *Oncologist.* 2005; 10(1): 72–79.
72. Shah S, Norby FL, Datta YH, Lutsey PL, MacLehose RF, Chen LY, et al. Comparative effectiveness of direct oral anticoagulants and warfarin in patients with cancer and atrial fibrillation. *Blood Adv.* 2018; 2(3): 200–209.
73. Tran HA, Chunilal SD, Harper PL. An update of consensus guidelines for warfarin reversal. *Med J Aust.* 2013; 198(4):198–199.
74. Mant J, Hobbs FD, Fletcher K, Roalfe A, Fitzmaurice D, Lip GY, et al. Warfarin versus aspirin for stroke prevention in an elderly community population with atrial fibrillation (the Birmingham Atrial Fibrillation Treatment of the Aged Study, BAFTA): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2007; 370(9586):493–503.
75. Wanat MA. Novel oral anticoagulants: a review of new agents. *Postgrad Med.* 2013; 125(4): 103–114.
76. Olsson SB, Executive Steering Committee of the SPORTIF III Investigators. Stroke prevention with the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran compared with warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation (SPORTIF III): randomised controlled trial. *Lancet.* 2003; 362(9397): 1691–1698.

77. Bauer KA. Recent progress in anticoagulant therapy: oral direct inhibitors of thrombin and factor Xa. *J Thromb Haemost.* 2011; 9 (Suppl 1): 12–19.
78. 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): 949–956.
79. 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): 2178–2185.
80. 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.
81. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2009; 361(12): 1139–1151.
82. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2011; 365(10): 883–891.
83. EINSTEIN Investigators, Bauersachs R, Berkowitz SD, et al. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2010; 363(26): 2499–2510.
84. Mekaj YH, Mekaj AY, Duci SB, Miftari EI. New oral anticoagulants: their advantages and disadvantages compared with vitamin K antagonists in the prevention and treatment of patients with thromboembolic events. *Ther Clin Risk Manag.* 2015; 11: 967–977.
85. Heo YA. Correction to: Andexanet Alfa: First Global Approval. *Drugs.* 2018; 78(12): 1285.
86. Syed YY. Idarucizumab: A Review as a Reversal Agent for Dabigatran. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2016; 16(4): 297–304.
87. Härtter S, Sennewald R, Nehmiz G, Reilly P. Oral bioavailability of dabigatran etexilate (Pradaxa®) after co-medication with verapamil in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 75(4): 1053–1062.
88. Milling TJ Jr, Frontera J. Exploring indications for the Use of direct oral anticoagulants and the associated risks of major bleeding. *Am J Manag Care.* 2017; 23(4 Suppl): S67–S80.
89. Stangier J, Clemens A. Pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009; 15(Suppl 1): 9S–16S.
90. Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36(2): 386–399.
91. Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, Mismetti P, Schellong S, Eriksson H, et al. Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 2009; 361(24): 2342–2352.
92. Hijazi Z, Hohnloser SH, Oldgren J, Andersson U, Connolly SJ, Eikelboom JW, et al. Efficacy and safety of dabigatran compared with warfarin in relation to baseline renal function in patients with atrial fibrillation: a RE-LY (Randomized Evaluation of Long-term Anticoagulation Therapy) trial analysis. *Circulation.* 2014; 129(9): 961–970.
93. Oldgren J, Budaj A, Granger CB, Khder Y, Roberts J, Siegbahn A, et al. Dabigatran vs. placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: a randomized, double-blind, phase II trial. *Eur Heart J.* 2011; 32(22): 2781–2789.

94. Safouris A, Triantafyllou N, Parissis J, Tsvigoulis G. The case for dosing dabigatran: how tailoring dose to patient renal function, weight and age could improve the benefit-risk ratio. *Ther Adv Neurol Disord*. 2015; 8(6): 245–254.
95. Howard PA. Dabigatran for Mechanical Valves. *Hosp Pharm*. 2014; 49(4): 334–337.
96. Hernandez I, Baik SH, Piñera A, Zhang Y. Risk of bleeding with dabigatran in atrial fibrillation. *JAMA Intern Med*. 2015; 175:18–24.
97. Vaughan Sarrazin MS, Jones M, Mazur A, Chrischilles E, Cram P. Bleeding rates in Veterans Affairs patients with atrial fibrillation who switch from warfarin to dabigatran. *Am J Med*. 2014; 127(12): 1179–1185.
98. Chang HY, Zhou M, Tang W, Alexander GC, Singh S. Risk of gastrointestinal bleeding associated with oral anticoagulants: population based retrospective cohort study. *BMJ*. 2015; 350: h1585.
99. Lauffenburger JC, Farley JF, Gehi AK, Rhoney DH, Brookhart MA, Fang G. Effectiveness and Safety of Dabigatran and Warfarin in Real-World US Patients With Non- Valvular Atrial Fibrillation: A Retrospective Cohort Study. *J Am Heart Assoc*. 2015; 4(4). e001798.
100. Chen BC, Viny AD, Garlich FM, Basciano P, Howland MA, Smith SW, et al. Hemorrhagic complications associated with dabigatran use. *Clin Toxicol(Phila)*. 2012; 50(9): 854–857.
101. Perzborn E, Heitmeier S, Laux V. Effects of Rivaroxaban on Platelet Activation and Platelet-Coagulation Pathway Interaction: In Vitro and In Vivo Studies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2015; 20(6): 554–562.
102. Stampfuss J, Kubitzka D, Becka M, Mueck W. The effect of food on the absorption and pharmacokinetics of rivaroxaban. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2013; 51(7): 549–561.
103. Weinz C, Schwarz T, Kubitzka D, Mueck W, Lang D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos*. 2009; 37(5):1056–1064.
104. Mueck W, Stampfuss J, Kubitzka D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet*. 2014; 53(1): 1–16.
105. Trujillo T, Dobesh PP. Clinical use of rivaroxaban: pharmacokinetic and pharmacodynamic rationale for dosing regimens in different indications. *Drugs*. 2014; 74(14): 1587–1603.
106. Graham DJ, Reichman ME, Wernecke M, Hsueh YH, Izem R, Southworth MR, et al. Stroke, Bleeding, and Mortality Risks in Elderly Medicare Beneficiaries Treated With Dabigatran or Rivaroxaban for Nonvalvular Atrial Fibrillation. *JAMA Intern Med*. 2016; 176(11): 1662–1671.
107. Graham DJ, Reichman ME, Wernecke M, Zhang R, Southworth MR, Levenson M, et al. Cardiovascular, bleeding, and mortality risks in elderly Medicare patients treated with dabigatran or warfarin for nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation*. 2015; 131(2):157–164.
108. 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): 2765–2775.
109. 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): 31–39.
110. 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): 2776–2786.

111. Turpie AGG, 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):1673–1680.
112. EINSTEIN–PE Investigators, Büller HR, Prins MH, et al. Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 2012; 366(14):1287–1297.
113. Mega J, Braunwald E, Wiviott S, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012; 366(1): 9–19.
114. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011; 365(11): 981–992
115. Connolly SJ, Eikelboom J, Joyner C, Diener HC, Hart R, Golitsyn S, et al. Apixaban in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011; 364(9): 806–817.
116. Lopes RD, Alexander JH, Al-Khatib SM, Ansell J, Diaz R, Easton JD, et al. Apixaban for reduction in stroke and other Thromboembolic events in atrial fibrillation (ARISTOTLE) trial: design and rationale. *Am Heart J*. 2010; 159(3): 331–339.
117. Steffel J, Giugliano RP, Braunwald E, Murphy SA, Mercuri M, Choi Y, et al. Edoxaban Versus Warfarin in Atrial Fibrillation Patients at Risk of Falling: ENGAGE AF-TIMI 48 Analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 68(11): 1169–1178.
118. Goette A, Merino JL, Ezekowitz MD, Zamoryakhin D, Melino M, Jin J, et al. Edoxaban versus enoxaparin-warfarin in patients undergoing cardioversion of atrial fibrillation (ENSURE-AF): a randomised, open-label, phase 3b trial. *Lancet*. 2016; 388(10055): 1995–2003.
119. Hokusai-VTE Investigators, Büller HR, Décousus H, Grosso MA, Mercuri M, Middeldorp S, Prins MH, et al. Edoxaban versus warfarin for the treatment of symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2013; 369(15): 1406–1415.
120. Rognoni C, Marchetti M, Quaglini S, Liberato NL. Edoxaban versus warfarin for stroke prevention in non-valvular atrial fibrillation: a cost-effectiveness analysis. *J Thromb Thrombolysis*. 2015; 39(2): 149–154.
121. Connors JM. Testing and monitoring direct oral anticoagulants. *Blood*. 2018; 132(19): 2009–2015.
122. Raschi E, Bianchin M, Ageno W, De Ponti R, De Ponti F. Risk-Benefit Profile of Direct-Acting Oral Anticoagulants in Established Therapeutic Indications: An Overview of Systematic Reviews and Observational Studies. *Drug Saf*. 2016; 39(12): 1175–1187.
123. Ten Cate H, Henskens YM, Lancé MD. Practical guidance on the use of laboratory testing in the management of bleeding in patients receiving direct oral anticoagulants. *Vasc Health Risk Manag*. 2017; 13: 457–467.
124. Quick AJ. The prothrombin time in haemophilia and obstructive jaundice. *J Biol Chem*. 1935; 109: 73–74.
125. Horsti J. The progress of prothrombin time measurement. *Hematol Rev*. 2009; 1(2): e19.
126. Samuelson BT, Cuker A, Siegal DM, Crowther M, Garcia DA. Laboratory Assessment of the Anticoagulant Activity of Direct Oral Anticoagulants: A Systematic Review. *Chest*. 2017; 151(11): 127–138.
127. Adcock DM, Gosselin RC. The danger of relying on the aPTT and PT in patients on DOAC therapy, a potential patient safety issue. *Int J Lab Hematol*. 2017; 39(Suppl 1): 37–40.
128. Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, et al. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost*. 2018; 16(2): 209–219.

129. Tripodi A, Mannucci PM. Activated partial thromboplastin time (APTT). New indications for an old test? *J Thromb Haemost.* 2006; 4(4): 750–751.
130. Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N. APTT reagent with ellagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(11): 2338–2343.
131. Avataneo V, D'Avolio A, Cusato J, Cantù M, De Nicolò A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 166: 40–51.
132. Garg U, Zhang YV. Mass Spectrometry in Clinical Laboratory: Applications in Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology. *Methods Mol Biol.* 2016; 1383: 1–10.
133. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)--technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007; 115(9): 559–570.
134. Lagoutte-Renosi J, Le Poupon J, Girard A, Montange D, Davani S. A simple and fast HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, rivaroxaban in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018; 1100-1101: 43–49.
135. Al-Aieshy F, Malmström RE, Antovic J, ohanka A, Rönquist-Nii Y, Berndtsson M, et al. Clinical evaluation of laboratory methods to monitor exposure of rivaroxaban at trough and peak in patients with atrial fibrillation. *Eur J Clin Pharmacol.* 2016; 72(6): 671–679.
136. Sinigoj P, Malmström RE, Vene N, Rönquist-Nii Y, Božič-Mijovski M, Pohanka A, et al. Dabigatran Concentration: Variability and Potential Bleeding Prediction In "Real-Life" Patients With Atrial Fibrillation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015; 117(5): 323–329.
137. Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(1): 133–139.
138. Dale BJ, Chan NC, Eikelboom JW. Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants. *Br J Haematol.* 2016; 172(3): 315–336.
139. Antovic A. The overall hemostasis potential: A Laboratory Tool for the Investigation of Global Hemostasis. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36(7): 772–779.
140. Brinkman HJ. Global assays and the management of oral anticoagulation. *Thromb J.* 2015; 13: 9.
141. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016; 62(5): 699–707.
142. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi A, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential (ETP) in patients with hypo- or hypercoagulability. Effects of phospholipids, tissue factor and residual platelets on the measurement performed in platelet-poor and platelet-rich plasma. *Haematologica.* 2003; 88: 547–554.
143. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost.* 2006; 96: 553–561.
144. Wolberg AS. Thrombin generation assays: Understanding how the method influences the results. *Thromb Res.* 2007; 119: 663–665.
145. Whiting D, DiNardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *Am J Hematol.* 2014; 89(2):228–232.
146. Sankarankutty A, Nascimento B, Teodoro da Luz L, Rizoli S. TEG® and ROTEM® in trauma: similar test but different results? *World J Emerg Surg.* 2012; 7(Suppl 1):S3.
147. Wong PC, White A, Luetgen J. Inhibitory effect of apixaban compared with rivaroxaban and dabigatran on thrombin generation assay. *Hosp Pract (1995).* 2013; 41: 19–25.

148. Marlu R, Hodaj E, Paris A, Albaladejo P, Cracowski JL, Pernod G. Effect of non-specific reversal agents on anticoagulant activity of dabigatran and rivaroxaban: a randomised crossover ex vivo study in healthy volunteers. *Thromb Haemost.* 2012; 108: 217–224.
149. Tsantes AE, Kyriakou E, Ikonomidis I, Katogiannis K, Papadakis I, Douramani P, et al. Comparative Assessment of the Anticoagulant Activity of Rivaroxaban and Dabigatran in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation: A Noninterventional Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95: e3037.
150. Antovic A, Blombačck M, Bremme K, He S. The assay of overall haemostasis potential used to monitor the low molecular mass (weight) heparin, dalteparin, treatment in pregnant women with previous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002; 13(3):181–186.
151. Bremme K, van Rooijen M, Yu A, Blombačck M. Accumulation of low molecular mass heparin during prophylactic treatment in pregnancy. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2001; 12: 149–155.
152. Vedin J, Antovic A, Ericsson A, Vaage J. Hemostasis in offpump compared to on-pump coronary artery bypass grafting: a prospective, randomized study. *Ann Thorac Surg.* 2005; 80(2):586–593
153. Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol.* 2013; 35(1): 1–13.
154. (2001) Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD.
155. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. Accessed October 5, 2019.
156. Antovic JP, Mikovic D, Elezovic I, Holmström M, Wilkens M, Elfvinge P. Two global haemostatic assays as additional tools to monitor treatment in cases of haemophilia A. *Thromb Haemost.* 2012; 108: 21–31.
157. Hemker HC, Giesen P, AIDieri R et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis.* 2002; 32: 249–255.
158. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ; EuroCLOT Investigators. Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(12): 2783–2789.
159. Lee KT, Chang SH, Yeh YH, Tu HT, Chan YH, Kuo CT, et al. The CHA₂DS₂-VASc Score Predicts Major Bleeding in Non-Valvular Atrial Fibrillation Patients Who Take Oral Anticoagulants. *J Clin Med.* 2018; 7(10): 338.
160. D'Souza M, Carlson N, Fosbøl E, Lamberts M, Smedegaard L, Nielsen D, et al. CHA(2)DS(2)-VASc score and risk of thromboembolism and bleeding in patients with atrial fibrillation and recent cancer. *Eur J Prev Cardiol.* 2018; 25(6): 651–658.
161. Dobesh PP, Fanikos J. Reducing the risk of stroke in patients with nonvalvular atrial fibrillation with direct oral anticoagulants. Is one of these not like the others? *J Atr Fibrillation.* 2016; 9: 66–74.
162. Suárez Fernández C, Mostaza JM, Castilla Guerra L, Cantero Hinojosa J, Suriñach JM, Acosta de Bilbao F, et al. Adherence to recommendations of the Therapeutic Positioning Report about treatment with oral anticoagulants in elderly patients with atrial fibrillation. The ESPARTA study. *Med Clin (Barc).* 2018; 151(1): 8–15.

163. Balsam P, Ozierański K, Tymińska A, Żukowska K, Zaleska M, Szepietowska K, et al. Comparison of clinical characteristics of real-life atrial fibrillation patients treated with vitamin K antagonists, dabigatran, and rivaroxaban: results from the CRAFT study. *Kardiol Pol.* 2018; 76(5): 889–898.
164. Lip GY, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJ. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: The euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest.* 2010; 137(2): 263–272.
165. He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med.* 2001; 161(7): 996–1002.
166. Moutaz EK, Nooshin B, Mohamed F, Rauf M, Nancy A, Ashok N, et al. Profiling Clinical Characteristics and Treatment Patterns Among Non-Valvular Atrial Fibrillation Patients: A Real-World Analysis in Dubai, United Arab Emirates. *Open Medicine Journal.* 2019; 6: 33–41.
167. Potpara TS, Trendafilova E, Dan GA, Goda A, Kusljagic Z, Manola S, et al. The patterns of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants (NOACs) use in patients with atrial fibrillation in seven balkan countries: A report from the BALKAN-AF survey. *Adv Ther* 2017; 34(8): 2043–2057.
168. European Medicines Agency. Summary of Product Characteristic: PRADAXA. http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf. Accessed October 11, 2019.
169. European Medicines Agency. Summary of product characteristics, Xarelto (rivaroxaban). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000944/WC500057108.pdf. Accessed September 28, 2019.
170. Skeppholm M, Hjendahl P, Antovic JP, Muhrbeck J, Eintrei J, Rönquist-Nii Y, et al. On the monitoring of dabigatran treatment in "real life" patients with atrial fibrillation. *Thromb Res.* 2014; 134(4):783–789.
171. 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):453-461.
172. Willett KC, Morrill AM. Use of direct oral anticoagulants for the prevention and treatment of thromboembolic disease in patients with reduced renal function: a short review of the clinical evidence. *Ther Clin Risk Manag.* 2017; 13: 447–454.
173. Mahmood M, Lip GYH. Nonvitamin K Oral Anticoagulants in Patients With Atrial Fibrillation and Severe Renal Dysfunction. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2018; 71(10): 847–855.
174. Arachchilage D, Reynolds R, Devey T, Maclean R, Kitchen S, van Veen JJ. Effect of extremes of body weight on drug level in patient treated with standard dose of rivaroxaban for venous thromboembolism; real life experience. *Thromb Res.* 2016; 147: 32–35.
175. Miyazawa K, Li YG, Rashed WA, Al Mahmeed W, Shehab A, Zubaid M, et al. Secondary stroke prevention and guideline adherent antithrombotic treatment in patients with atrial fibrillation: Insights from the Gulf Survey of atrial fibrillation events (Gulf SAFE). *Int J Cardiol.* 2019; 274:126–131.
176. Davidson BL, Verheijen S, Lensing AWA, Gebel M, Brighton TA, Lyons RM, et al. Bleeding risk of patients with acute venous thromboembolism taking nonsteroidal anti-inflammatory drugs or aspirin. *JAMA.* 2014; 174(6): 947–953.

177. Mueck W, Kubitz D, Becka M. Co-administration of rivaroxaban with drugs that share its elimination pathways: pharmacokinetic effects in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 76(3):455–466.
178. Douxfils J, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring of dabigatran etexilate. *Thromb Haemost.* 2012; 107: 985–997.
179. Henskens YMC, Gulpen AJW, van Oerle R, Wetzels R, Verhezen P, Spronk H, et al. Detecting clinically relevant rivaroxaban or dabigatran levels by routine coagulation tests or thromboelastography in a cohort of patients with atrial fibrillation. *Thromb J.* 2018; 16: 3.
180. Van Blerk M, Bailleul E, Chatelain B, Demulder A, Devreese K, Douxfils J, Jochmans K, et al. Influence of dabigatran and rivaroxaban on routine coagulation assays. A nationwide Belgian survey. *Thromb Haemost.* 2015; 113(1): 154–164.
181. Heidbuchel H, Verhamme P, Alings M, Antz M, Diener HC, Hacke W, et al. Updated European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist anticoagulants in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Europace.* 2015; 17(10):1467–1507.
182. Samama MM, Martinoli JL, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F, et al. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban—an oral direct Xa inhibitor. *Thromb Haemost.* 2010; 103(4): 815–825.
183. Antovic JP, Skeppholm M, Eintrei J, Boija EE, Söderblom L, Norberg EM, et al. Evaluation of coagulation assays versus LC-MS/MS for determinations of dabigatran concentrations in plasma. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013; 69(11): 1875–1881.
184. Hawes EM, Deal AM, Funk-Adcock D, Gosselin R, Jeanneret C, Cook AM, et al. Performance of coagulation tests in patients on therapeutic doses of dabigatran: a cross-sectional pharmacodynamic study based on peak and trough plasma levels. *J Thromb Haemost.* 2013; 11(8): 1493–1502.
185. Lindahl TL, Baghaei F, Blixter IF, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, et al. Expert Group on Coagulation of the External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thromb Haemost.* 2011; 105(2): 371–378.
186. van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wiene W, Feuring M, et al. Dabigatran etexilate—a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2010; 103(6): 1116–1127.
187. Weltermann A, Brodmann M, Domanovits H, Eber B, Gottsauner-Wolf M, Halbmayer WM, et al. Dabigatran in patients with atrial fibrillation: perioperative and periinterventional management. *Wien Klin Wochenschr.* 2012; 124(9-10): 340–347.
188. Anderson JA, Saenko EL. Heparin resistance. *Br J Anaesth.* 2002; 88(4): 467–469.
189. Bjerkelund CJ, Orning OM. The efficacy of anticoagulant therapy in preventing embolism related to DC electrical cardioversion of atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 1969; 23: 208–216.
190. Rahmat N, Khan A. Dabigatran, electrical cardioversion and measuring the aPTT. A safety measure or an unnecessary assessment?. *BMJ. Case Rep.* 2013; 2013:bcr2013010090. doi:10.1136/bcr-2013-010090.
191. Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood.* 2002; 100(1):148–152.

192. Young G, Sørensen B, Dargaud Y, Negrier C, Brummel-Ziedins K, Key NS. Thrombin generation and whole blood viscoelastic assays in the management of hemophilia: current state of art and future perspectives. *Blood*. 2013;121(11):1944–1950.
193. Lance MD, Ninivaggi M, Schols SE, Feijge MA, Oehrl SK, Kuiper GJ, et al. Perioperative dilutional coagulopathy treated with fresh frozen plasma and fibrinogen concentrate: a prospective randomized intervention trial. *Vox Sang*. 2012; 103: 25–34.
194. Helin TA, Lemponen M, Hjemdahl P, Rönquist-Nii Y, Lassila R, Joutsu-Korhonen L. From laboratory to clinical practice: Dabigatran effects on thrombin generation and coagulation in patient samples. *Thromb Res*. 2015; 136: 154–160.
195. Kyriakou E, Katogiannis K, Ikonomidis I, Giallourous G, Nikolopoulos GK, Rapti E, et al. Laboratory Assessment of the Anticoagulant Activity of Apixaban in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018; 24(9 Suppl):1076029618802364. doi:10.1177/1076029618802364.
196. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, Clerici M, Artoni A, Passamonti S, et al. Thrombin generation and other coagulation parameters in a patient with homozygous congenital protein S deficiency on treatment with rivaroxaban. *Int J Hematol*. 2016; 103(2):165–172.
197. Freyburger G, Macouillard G, Labrousche S, Sztark F. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thromb Res*. 2011; 127(5):457–465.
198. Horinaka S, Sugawara R, Yonezawa Y, Ishimitsu T. Factor Xa inhibition by rivaroxaban in the trough steady state can significantly reduce thrombin generation. *Br J Clin Pharmacol*. 2018; 84: 79–87.
199. Mueck W, Becka M, Kubitzka D, Voith B, Zuehlsdorf M. Population model of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban--an oral, direct factor xa inhibitor--in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2007; 45:335–344.
200. Schenk B, Würtinger P, Streif W, Sturm W, Fries D, Bachler M. Ex vivo reversal of effects of rivaroxaban evaluated using thromboelastometry and thrombin generation assay. *Br J Anaesth*. 2016; 117: 583–591.
201. Gribkova IV, Lipets EN, Rekhtina IG, Bernakevich AI, Ayushev DB, Ovsepyan RA, et al. The modification of the thrombin generation test for the clinical assessment of dabigatran etexilate efficiency. *Sci Rep* 2016; 6: 29242.
202. Kyriakou E, Ikonomidis I, Stylos D, Bonovas S, Papadakis I, Nikolopoulos GK, et al. Laboratory assessment of the anticoagulant activity of dabigatran. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2015; 21: 434–445.
203. Arachchillage DR, Efthymiou M, Mackie IJ, Lawrie AS, Machin SJ, Cohen H. Rivaroxaban and warfarin achieve effective anticoagulation, as assessed by inhibition of TG and in-vivo markers of coagulation activation, in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2015; 135: 388–393.
204. Sagripanti A, Cozza V, Baicchi U, Camici M, Cupisti A, Barsotti G. Increased thrombin generation in patients with chronic renal failure. *Int J Clin Lab Res*. 1997; 27(1):72–75.
205. Huang MJ, Wei RB, Wang Y, Su TY, Di P, Li QP, et al. Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study. *BMJ. Open* 2017; 7(5): e014294.
206. Ay L, Kopp HP, Brix JM, Ay C, Quehenberger P, Schernthaner GH, et al. Thrombin generation in morbid obesity: significant reduction after weight loss. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(4): 759–765.
207. Sonnevi K, Tchaikovski SN, Holmström M, Antovic JP, Bremme K, Rosing J, et al. Obesity and thrombin-generation profiles in women with venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013; 24(5): 547–553.

208. Rigano J, Ng C, Nandurkar H, Ho P. Thrombin generation estimates the anticoagulation effect of direct oral anticoagulants with significant interindividual variability observed. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2018; 29:148–154
209. Rathbun S, Tafur A, Grant R, Esmon N, Mauer K, Marlar RA. Comparison of methods to determine rivaroxaban anti-factor Xa activity. *Thromb Res*. 2015; 135: 394–397.
210. Dietrich K, Stang L, van Ryn J, Mitchell LG. Assessing the anticoagulant effect of dabigatran in children: an in vitro study. *Thromb Res*. 2015; 135: 630–635.
211. Ammollo CT, Semeraro F, Incampo F, Semeraro N, Colucci M. Dabigatran enhances clot susceptibility to fibrinolysis by mechanisms dependent on and independent of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(4): 790–798.
212. Semeraro F, Incampo F, Ammollo CT, Dellanoce C, Paoletti O, Testa S, et al. Dabigatran but not rivaroxaban or apixaban treatment decreases fibrinolytic resistance in patients with atrial fibrillation. *Thromb Res*. 2016; 138: 22–29.
213. Lau YC, Xiong Q, Shantsila E, Lip GY, Blann AD. Effects of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants on fibrin clot and whole blood clot formation, integrity and thrombolysis in patients with atrial fibrillation. *J Thromb Thrombolysis*. 2016; 42: 535–544.
214. Levy JH, Ageno W, Chan NC, Crowther M, Verhamme P, Weitz JI; Subcommittee on Control of Anticoagulation. When and how to use antidotes for the reversal of direct oral anticoagulants: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2016; 14: 623–627.
215. Steiner T, Bohm M, Dichgans M, Diener HC, Ell C, Endres M et al. Recommendations for the emergency management of complications associated with the new direct oral anticoagulants (DOACs), apixaban, dabigatran and rivaroxaban. *Clin Res Cardiol*. 2013; 102(6): 399–412.
216. Bern University Hospital. Stroke Guidelines of the Bern Stroke Network. Retrived from <http://www.neurologie.insel.ch/?id=23488>. 2018; Accessed 25 March 2019.
217. Haidl H, Cimenti C, Leschnik B, Zach D, Muntean W. Age-dependency of thrombin generation measured by means of calibrated automated thrombography (CAT). *Thromb Haemost*. 2006; 95: 772–775.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД: Монографска публикација

Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР: Докторска дисертација

Аутор – АУ: Аница Петковић

Ментор/коментор – МН: проф. др Јован Антоновић и проф. др Владимир Јаковљевић

Наслов рада – НР: Ефекти директних оралних антикоагуланаса на глобалну хемостазу код пацијената са атријалном фибрилацијом

Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица

Језик извода – ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања – ЗП: Република Србија

Уже географско подручје – УГП: Централна Србија

Година – ГО: 2020

Издавач – ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса – МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада – ФО:

Научна област – УДК: Медицина

Научна дисциплина – ДИ:

Предметна одредница/ кључне речи – ПО:

Чува се– ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена – ВН:

Извод– ИД:

Увод: Директни орални антикоагуланси (ДОАК) се користе за превенцију можданог удара код пацијената са невалвуларном атријалном фибрилацијом (АФ).

Циљ: Испитати ефекте две стандардне дозе ривароксабана и дабигатрана на стандардне рутинске и глобалне хемостатске тестове код пацијената са АФ и упоредити резултате ових метода са резултатима течне хроматографије у комбинацији са масеном спектрометријом.

Материјал и методе: Истраживање је обухватило 52 пацијента који су били на терапији ривароксабаном (15/20 mg), 50 пацијената на терапији дабигатраном (110/150 mg) и 70 здравих испитаника. Испитана су три глобална хемостатска теста: ендогени тромбински потенцијал (ЕТР), калибрисана аутоматизована тромбографија (САТ) и укупни хемостатски потенцијал (ОНР).

Резултати: Оба ДОАК су довела до смањења ЕТР док је ОНР био умањен само након терапије дабигатраном. Јака корелација је примећена између ЕТР параметара и концентрације ривароксабана (ЕТР, $r=-0,51$; c-max, $r=-0,85$; t-lag, $r=0,83$; t-max, $r=0,66$) као и концентрације дабигатрана у плазми (ЕТР, $r=-0,75$; c-max, $r=-0,74$; t-lag, $r=0,73$; t-max, $r=0,52$). Анализом концентрације дабигатрана испод 50 ng/ml показано је да ЕТР параметар има AUC-ROC вредност од 0,879. Терапија дабигатраном је парадоксално повећала вредности параметара AUC и реак док је терапија ривароксабаном допринела смањењу реак вредности.

Закључак: На основу добијених резултата можемо закључити да је САТ тест недовољно добар за утврђивање ефекта терапије дабигатраном и недовољно сензитиван код терапије ривароксабаном. ЕТР метод представља потенцијално одговарајући тест за одређивање глобалног хемостатског капацитета код оба ДОАК. Улога ОНР теста се мора испитати у додатним истраживањима.

Кључне речи: атријална фибрилација, дабигатран, глобални хемостатски тестови, ривароксабан.

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 27.02.2019.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

1. **Проф. др Марко Фолић**, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Клиничка фармација*, председник
2. **Проф. др Милоје Томашевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан
3. **Проф. др Слободан Обрадовић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Интерна медицина*, члан

KEY WORDS DOCUMENTATION
UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

Accession number – ANO:

Identification number – INO:

Documentation type – DT: Monographic publication

Type of record – TR: Textual printed material

Contents code – CC: Ph. D. Thesis

Author – AU: Anica Petkovic

Menthor/co-mentor – MN: Jovan Antovic, MD, PhD, Associate professor, Vladimir Jakovljevic, MD, PhD, Full professor

Title – TI: Effects of direct oral anticoagulants on global hemostatis in patients with atrial fibrillation

Language of text – LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication – LP: Central Serbia

Publication year – PY: 2020

Publisher – PU: Author reprint

Publication place – PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description – PD: 102 pages, 3 pictures, 19 tables, 23 charts

Scientific field – SF: Medicine

Scientific discipline – SD:

Subject/key words – SKW:

UDC:

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note – N:

Abstract – AB:

Introduction: Direct oral anticoagulants (DOAC) are used for prevention of stroke in patients with non valvular atrial fibrillation (AF).

Aim: Evaluation the effects of two standard doses of rivaroxaban and dabigatran on standard routine and global hemostatic assays in patients with AF and comparison of these methods to results of liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Material and methods: The study included 52 patients treated with rivaroxaban (15/20 mg), 50 on dabigatran (110/150 mg), and 70 healthy individuals. Determination of three global hemostatic assays, namely endogenous thrombin potential (ETP), calibrated automated thrombogram (CAT) and overall hemostasis potential (OHP) was performed.

Results: Both DOACs reduced ETP while OHP was diminished only by dabigatran. Strong correlations were noticed between ETP parameters and the plasma concentrations of rivaroxaban (ETP, $r=-0.51$; c-max, $r=-0.85$; t-lag, $r=0.83$; t-max, $r=0.66$) as well as with plasma concentration of dabigatran (ETP, $r=-0.75$; c-max, $r=-0.74$; t-lag, $r=0.73$; t-max, $r=0.52$). Analysis of dabigatran concentrations under 50 ng/ml showed that ETP parameter has AUC-ROC value of 0.879. Dabigatran treatment paradoxically increased AUC and peak values while rivaroxaban decreased peak values.

Conclusions: Based on our results we may conclude that the CAT assay is inappropriate for estimation of dabigatran effects and is not fully sensitive as regards rivaroxaban. The ETP assay can potentially be the appropriate method for estimation of global hemostatic capacity as regards both DOACs. The role of OHP needs to be confirmed in additional studies.

Key words: atrial fibrillation, dabigatran, global hemostatic assays, rivaroxaban.

Accepted by the Scientific Board on – ASB: 27.02.2019.

Defended on – DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:

1. **Associate Professor Marko Folic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Clinical pharmacy, chairman;
2. **Associate Professor Miloje Tomasevic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Internal medicine, member;
3. **Full Professor Slobodan Obradovic**, M.D, Ph.D, MMA Medical Faculty, University of Defence, Military Medical Academy, Belgrade, scientific field Internal medicine member

БИОГРАФИЈА

1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Име и презиме: Аница Петковић

Датум и место рођења: 11.10.1992. године, Крагујевац, Република Србија

Адреса: Димитрија Туцовића 30В/31, Крагујевац

Телефон: 066/315255

2. ОБРАЗОВАЊЕ

Прва крагујевачка гимназија;

Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, интегрисане академске студије фармације, 2011 – 2016;

Специјализација из области Фармацеутска технологија, 2018 – данас;

3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА

Енглески (положени међународни испити, ниво Б1- Preliminary English Test и ниво Б2- First Certificate in English, Универзитета у Кембриџу)

4. РАДНО ИСКУСТВО

Асистент на предмету Фармацеутска технологија, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац

5. РАЗНО

Учесница великог броја домаћих и иностраних конгреса.

Аутор је поглавља књиге „Основи биофармације“, главног уредника Снежане М. Цупаре, Факултет Медицинских наука, Крагујевац 2018.

Аутор је поглавља књиге „Modulation of Oxidative Stress in Heart Disease”, Уредници: Sajal Chakraborti, Naranjan S. Dhalla, Madhu Dikshit, Nirmal K. Ganguly, Springer, 2019.

БИБЛИОГРАФИЈА

РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА НА СС/СЦИ ЛИСТИ:

1. Jeremic N, **Petkovic A**, Srejovic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015; 30(2):266-75.
2. Rabrenovic M, Nikolic T, Rabrenovic V, Bradic J, Tresnjic S, **Petkovic A**, Jakovljevic B, Masic S, Bokonjic D. Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in patients with systemic lupus erythematosus. *Vojnosanit Pregl*. 2017; doi: 10.2298/VSP170110106R.
3. Tepic S, **Petkovic A**, Srejovic I, Jeremić N, Zivkovic V, Loncarevic S, Bradic J, Jakovljevic V, Zivkovic M. Impact of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in diabetic patients. *Undersea Hyperbar M*. 2018; 45(1): 9-17.
4. Bradic J, Dragojlovic Ruzicic R, Jeremic J, **Petkovic A**, Stojic I, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Radovanovic D, Jakovljevic VL. Comparison of training and detraining on redox state of rats: gender specific differences. *Gen Physiol Biophys*. 2018; 37(3): 285-297.
5. **Petkovic A**, Jakovljevic V, Bradic J, Jeremic J, Jeremic N, Nikolic Turnic T, Jovicic N, Rosic V, Srejovic I, Zivkovic V. The effects of potassium cyanide on the functional recovery of isolated rat hearts after ischemia and reperfusion: The role of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 5979721. doi: 10.1155/2018/5979721.
6. Bradic J, Jeremic N, **Petkovic A**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Tomovic M. Cardioprotective effects of Galium verum L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2019; 11:1-8. doi: 10.1080/13813455.2018.1551904.
7. Bradic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, **Petkovic A**, Nikolic Turnic T, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of Galium verum L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 4235405 doi: 10.1155/2019/4235405.
8. Sobot T, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Nikolic Turnic T, Ponorac N, **Petkovic A**, Jakovljevic V, Djuric D. THE EFFECTS OF SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS ON REDOX STATUS IN HOMOCYSTEINE-TREATED RATS. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 2019; 76(1): 147-157. doi: 10.32383/appdr/78769.
9. Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, **Petkovic A**, Jakovljevic V, Antovic A. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2019; 38(11): 3005-3014.
10. Prokic V, Plecevic S, Bradic J, **Petkovic A**, Srejovic I, Bolevich S, Jeremic J, Bolevich S, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of 9 weeks swimming exercise on heart function in hypertensive and normotensive rats: role of cardiac oxidative stress. *J J Sports Med Phys Fitness*. 2019; 59(12): 2075-2083.
11. Djuric M, Nikolic Turnic T, Kostic S, Radonjic K, Jeremic J, **Petkovic A**, Bradic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. Inhibition of gasotransmitters production and calcium influx affect cardiodynamic variables and cardiac oxidative stress in propofol-anesthetized male Wistar rats 1. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019; 97(9): 850-856.
12. Bradic J, **Petkovic A**, Simonovic N, Radovanovic M, Jeremic J, Zivkovic V, Mitrovic S, Bolevich S, Jakovljevic V, Sretenovic J, Srejovic I. Preconditioning with hyperbaric oxygen and calcium and potassium channel modulators in the rat heart. *Undersea Hyperb Med*. 2019; 46(4):483-494.

13. Krivokapic M, Jakovljevic V, Sovrljic M, Bradic J, **Petkovic A**, Radojevic I, Brankovic S, Comic Lj, Andjic M, Kocovic A, Tomovic M. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF DIFFERENT EXTRACTS FROM ALLIUM URSINUM LEAVES. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2020; 77(1): 121-129.
14. **Petkovic A**, Al-Khalili F, Antovic A, Ammar M, Pruner I, Vranic A, Soutari N, Zdravkovic N, Malmström RE, Jakovljevic V, Antovic JP. Effects of rivaroxaban and dabigatran on global hemostasis in patients with atrial fibrillation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2020;31(4):243-252.
15. Dragojlovic RR, Radovanovic D, Milanovic Z, **Petkovic A**, Jeremic J, Nikolic TT, Milosavljevic I, Srejovic I, Zivkovic V, Krivokuca Z, Jakovljevic V, Djordjevic D. Training/detraining gender specific functional adaptations of isolated rat heart. *Vojnosanit Pregl*. 2020. doi.org/10.2298/VSP191127027D.

РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА ЦИТИРАНИМ У EMBASE-У

1. Jevdjevic M, Srejovic I, Zivkovic V, Barudzic N, **Petkovic A**, Bradic J, Djuric D, Jakovljevic V. The effects of diclofenac and ibuprofen on heart function and oxidative stress markers in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res*. 2014; 15(1): 11-19.
2. Jakovljevic B, Plecevic S, **Petkovic A**, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Radoman K, Srejovic I. Is 3 weeks of exercise enough to change blood pressure and cardiac redox state in hypertensive rats? *Ser J Exp Clin Res*. 2017; 20(4): 319-326. doi: 10.1515/sjecr-2017-0049.
3. Bradic J, **Petkovic A**, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties of some species of the genus *Galium L.* (*Galium verum* and *mollugo*). *Ser J Exp Clin Res*. 2017; doi: 10.1515/sjecr-2017-0057.
4. Jeremic N, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, **Petkovic A**, Bradic J, Jakovljevic V. Effects of ischemic and proton pump inhibitors preconditioning on oxidative stress of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res*. 2018; 19(2): 131-139.
5. Krivokapic M, Bradic J, **Petkovic A**, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties *Allium Ursinum*. *Ser J Exp Clin Res*. 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0003.
6. **Petkovic A**, Ravic M, Plecevic S, Jeremic J, Srejovic I, Bolevich S, Rankovic G, Nikolic Turnic T, Jakovljevic V, Jeremic N. Swimming attenuates blood pressure and oxidative stress in hypertensive rats. *Ser J Exp Clin Res*. 2020; doi: 10.2478/sjecr-2020-0006.

AUTHORS CURRICULUM VITAE

1. PERSONAL DATA

Name and surname: Anica Petkovic

Date and place of birth: 11.10.1992. Kragujevac, Serbia

Adress: Dimitrija Tucovica 30V/31, Kragujevac

Phone: 066/315255

2. EDUCATION

The First Grammar School of Kragujevac

Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, 2011 – 2016;

Specialization in Pharmaceutical technology, 2018 – present;

3. FOREIGN LANGUAGE

English (passed internation exams, level B1- Preliminary English Test and level B2- First Certificate in English, University of Cambridge)

4. WORK EXPERIENCE

Teaching assistant at Department of Pharmaceutical technology, Faculty of medical sciences, University of Kragujevac

5. MISCELLANEUS

Participant in large number of national and international congresses.

Author of the chapter in a book "Osnovi biofarmacije", editor Snezana M. Cupara, Faculty of medical sciences, Kragujevac, 2018.

Author of the chapter in a book "Modulation of Oxidative Stress in Heart Disease", Editors: Sajal Chakraborti, Naranjan S. Dhalla, Madhu Dikshit, Nirmal K. Ganguly, Springer, 2019.

LIST OF PUBLICATION

ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS

1. Jeremic N, **Petkovic A**, Srejovic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of ischemia and omeprazole preconditioning on functional recovery of isolated rat heart. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015; 30(2):266-75.
2. Rabrenovic M, Nikolic T, Rabrenovic V, Bradic J, Tresnjic S, **Petkovic A**, Jakovljevic B, Masic S, Bokonjic D. Impact of the hyperbaric oxygen therapy on the redox status in patients with systemic lupus erythematosus. *Vojnosanit Pregl*. 2017; doi: 10.2298/VSP170110106R.
3. Tepic S, **Petkovic A**, Srejovic I, Jeremić N, Zivkovic V, Loncarevic S, Bradic J, Jakovljevic V, Zivkovic M. Impact of hyperbaric oxygenation on oxidative stress in diabetic patients. *Undersea Hyperbar M*. 2018; 45(1): 9-17.
4. Bradic J, Dragojlovic Ruzicic R, Jeremic J, **Petkovic A**, Stojic I, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Radovanovic D, Jakovljevic VL. Comparison of training and detraining on redox state of rats: gender specific differences. *Gen Physiol Biophys*. 2018; 37(3): 285-297.
5. **Petkovic A**, Jakovljevic V, Bradic J, Jeremic J, Jeremic N, Nikolic Turnic T, Jovicic N, Rosic V, Srejovic I, Zivkovic V. The effects of potassium cyanide on the functional recovery of isolated rat hearts after ischemia and reperfusion: The role of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 5979721. doi: 10.1155/2018/5979721.
6. Bradic J, Jeremic N, **Petkovic A**, Jeremic J, Zivkovic V, Srejovic I, Sretenovic J, Matic S, Jakovljevic V, Tomovic M. Cardioprotective effects of Galium verum L. extract against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arch Physiol Biochem*. 2019; 11:1-8. doi: 10.1080/13813455.2018.1551904.
7. Bradic J, Zivkovic V, Srejovic I, Jakovljevic V, **Petkovic A**, Nikolic Turnic T, Jeremic J, Jeremic N, Mitrovic S, Sobot T, Ponorac N, Ravic M, Tomovic M. Protective Effects of Galium verum L. Extract against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 4235405 doi: 10.1155/2019/4235405.
8. Sobot T, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic J, Nikolic Turnic T, Ponorac N, **Petkovic A**, Jakovljevic V, Djuric D. THE EFFECTS OF SULFUR-CONTAINING COMPOUNDS ON REDOX STATUS IN HOMOCYSTEINE-TREATED RATS. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 2019; 76(1): 147-157. doi: 10.32383/appdr/78769.
9. Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, **Petkovic A**, Jakovljevic V, Antovic A. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2019; 38(11): 3005-3014.
10. Prokic V, Plecevic S, Bradic J, **Petkovic A**, Srejovic I, Bolevich S, Jeremic J, Bolevich S, Jakovljevic V, Zivkovic V. The impact of 9 weeks swimming exercise on heart function in hypertensive and normotensive rats: role of cardiac oxidative stress. *J J Sports Med Phys Fitness*. 2019; 59(12): 2075-2083.
11. Djuric M, Nikolic Turnic T, Kostic S, Radonjic K, Jeremic J, **Petkovic A**, Bradic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Zivkovic V, Djuric D, Jakovljevic V, Stevanovic P. Inhibition of gasotransmitters production and calcium influx affect cardiodynamic variables and cardiac oxidative stress in propofol-anesthetized male Wistar rats 1. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019; 97(9): 850-856.
12. Bradic J, **Petkovic A**, Simonovic N, Radovanovic M, Jeremic J, Zivkovic V, Mitrovic S, Bolevich S, Jakovljevic V, Sretenovic J, Srejovic I. Preconditioning with hyperbaric

- oxygen and calcium and potassium channel modulators in the rat heart. *Undersea Hyperb Med.* 2019; 46(4):483-494.
13. Krivokapic M, Jakovljevic V, Sovrljic M, Bradic J, **Petkovic A**, Radojevic I, Brankovic S, Comic Lj, Andjic M, Kocovic A, Tomovic M. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF DIFFERENT EXTRACTS FROM ALLIUM URSINUM LEAVES. *Acta poloniae pharmaceutica.* 2020; 77(1): 121-129.
 14. **Petkovic A**, Al-Khalili F, Antovic A, Ammar M, Pruner I, Vranic A, Soutari N, Zdravkovic N, Malmström RE, Jakovljevic V, Antovic JP. Effects of rivaroxaban and dabigatran on global hemostasis in patients with atrial fibrillation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2020;31(4):243-252.
 15. Dragojlovic RR, Radovanovic D, Milanovic Z, **Petkovic A**, Jeremic J, Nikolic TT, Milosavljevic I, Srejsovic I, Zivkovic V, Krivokuca Z, Jakovljevic V, Djordjevic D. Training/detraining gender specific functional adaptations of isolated rat heart. *Vojnosanit Pregl.* 2020. doi.org/10.2298/VSP191127027D.

ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS CITED IN EMBASE

1. Jevdjevic M, Srejsovic I, Zivkovic V, Barudzic N, **Petkovic A**, Bradic J, Djuric D, Jakovljevic V. The effects of diclofenac and ibuprofen on heart function and oxidative stress markers in the isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2014; 15(1): 11-19.
2. Jakovljevic B, Plecevic S, **Petkovic A**, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, Radoman K, Srejsovic I. Is 3 weeks of exercise enough to change blood pressure and cardiac redox state in hypertensive rats? *Ser J Exp Clin Res.* 2017; 20(4): 319-326. doi: 10.1515/sjecr-2017-0049.
3. Bradic J, **Petkovic A**, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties of some species of the genus *Galium L.* (*Galium verum* and *mollugo*). *Ser J Exp Clin Res.* 2017; doi: 10.1515/sjecr-2017-0057.
4. Jeremic N, Zivkovic V, Srejsovic I, Jeremic J, **Petkovic A**, Bradic J, Jakovljevic V. Effects of ischemic and proton pump inhibitors preconditioning on oxidative stress of isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19(2): 131-139.
5. Krivokapic M, Bradic J, **Petkovic A**, Tomovic M. Phytochemical and pharmacological properties *Allium Ursinum*. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; doi: 10.2478/sjecr-2018-0003.
6. **Petkovic A**, Ravic M, Plecevic S, Jeremic J, Srejsovic I, Bolevich S, Rankovic G, Nikolic Turnic T, Jakovljevic V, Jeremic N. Swimming attenuates blood pressure and oxidative stress in hypertensive rats. *Ser J Exp Clin Res.* 2020; doi: 10.2478/sjecr-2020-0006.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Аница Петковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Ефекти директних оралних антикоагуланаса на глобалну хемостазу код пацијената са атријалном фибрилацијом

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 13.5.2020. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Аница Петковић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Ефекти директних оралних антикоагуланаса на глобалну хемостазу код пацијената са атријалном фибрилацијом

која је одбрањена на Факултету медицинаких наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 13.5.2020. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>