

# Laboratórne monitorovanie priamych perorálnych antikoagulancií

Prof. MUDr. Ján Staško, PhD.<sup>1</sup>, MDDr. Ján Staško, jr.<sup>2</sup>, MUDr. Lucia Stančiaková, PhD.<sup>1</sup>, doc. MUDr. Miroslava Dobrotová, PhD.<sup>1</sup>, RNDr. Jela Ivanková<sup>1</sup>, Ing. Ingrid Škorňová, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Juraj Sokol, PhD.<sup>1</sup>, doc. MUDr. Dagmar Stateľová, CSc., mim. prof.<sup>2</sup>, prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin

<sup>2</sup>Klinika maxilofaciálnej chirurgie, Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin

**Priame perorálne antikoagulanciá (direct oral anticoagulants – DOAC) sú novou generáciou antitrombotík, ktoré priamo inhibujú buď trombín (aktivovaný faktor II; FIIa), alebo aktivovaný faktor X (FXa). Cieľom tohto prehľadového článku je stručne zhrnúť poznatky o využití rôznych laboratórnych testov na kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie účinku DOAC a v konečnom dôsledku poukázať na výhody a limitácie týchto testov pre klinickú prax.**

**Kľúčové slová:** priame perorálne antikoagulanciá, dabigatran, rivaroxaban, apixaban, edoxaban, laboratórne monitorovanie

## Laboratory monitoring of direct oral anticoagulants

**The direct oral anticoagulants (DOAC) represent a new generation of antithrombotic agents, providing direct inhibition of either thrombin (factor IIa; FIIa) or activated factor X (FXa). This narrative review aims to briefly summarise the evidence concerning utility of different laboratory assays for qualitative and quantitative assessment of DOAC and ultimately discussing advantages and limitations of these processes in clinical practice.**

**Key words:** direct oral anticoagulants, dabigatran, rivaroxaban, apixaban, edoxaban, laboratory monitoring

Vask. med., 2019,11(1):6-12

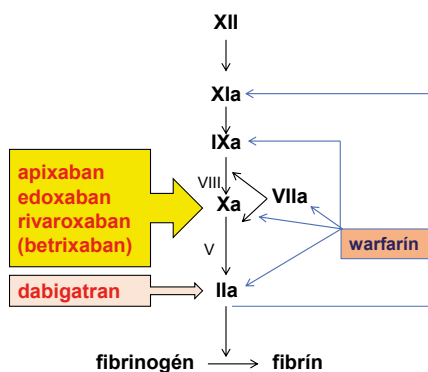
## Úvod

Významnou nevýhodou tradične používaných antikoagulancií (antagonisty vitamínu K, nefrakcionovaný heparín) je potreba ich monitorovania. V poslednom desaťročí boli do antitrombotickej liečby zavedené priame perorálne antikoagulanciá (direct oral anticoagulants – DOAC) (tabuľka 1), ktoré priamo inhibujú buď trombín (aktivovaný faktor II; FIIa), alebo aktivovaný faktor X (FXa) (obrázok 1) (1). Okrem termínu DOAC je táto skupina antikoagulancií označovaná aj ako cieľovo špecifické perorálne

antikoagulanciá (target-specific oral anticoagulants – TSOAC) alebo aj ako nové alebo tzv. „non-antivitamin K“ perorálne antikoagulanciá (new/novel/non-vitamin K antagonists (VKA) oral anticoagulants – NOAC). Vedecký a štandardizačný výbor (Scientific and standardization Committee-SSC) medzinárodnej spoločnosti pre trombózu a hemostázu (International Society on Thrombosis and Hemostasis-ISTH) odporúča používať názov DOAC (2). DOAC majú predvídateľný farmakologický profil, a preto v štandardnom dávkovaní nevyžadujú rutinné monitorovanie (tabuľka 2) (3 – 6). Počas liečby DOAC sa však môžu vyskytnúť situácie, ako sú napr. závažné krvácavé komplikácie, predávkovanie, zlyhanie liečby, urgentný operačný výkon alebo overenie spolupráce pacienta, kedy treba zvážiť možnosť laboratórneho monitorovania aj v prípade liečby DOAC (tabuľka 3) (7).

DOAC, ktorá je založená na priamom stanovení plazmatickej koncentrácie lieku, je tandémová kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) (8, 9). Táto metóda však nie je vhodná pre bežnú prax z dôvodu jej nedostupnosti pre väčšinu rutinných laboratórií. Jej nevýhodou je aj časová a finančná náročnosť, ako aj nepoužitelnosť pre urgentné klinické situácie. Konceptným nedostatkom LC-MS/MS, ale aj všetkých ďalších testov určených na kvantifikáciu koncentrácie DOAC je to, že namerané plazmatické koncentrácie DOAC neodrážajú presne skutočnú „antikoagulačnú“ aktivitu *in vivo*. Je to zapríčinené viacerými faktormi, akými sú samotná povaha daného vyšetrenia, potenciálna antikoagulačná aktivita metabolitov DOAC a celkový hemostatický potenciál pacienta (t. j. prítomnosť vrodeného alebo získaného stavu, ktorý môže v konečnom dôsledku zvyšovať alebo znižovať antikoagulačný účinok DOAC). Inými slovami, aj keď testy ako LC-MS/MS dokážu presne namerať koncentráciu DOAC, nedokážu presne odzrkadliť bio-

**Obrázok 1.** Miesto účinku DOAC (1, upravené)



## Laboratórne testy pre DOAC

Kvantitatívne najpresnejšou, resp. referenčnou metódou na meranie účinku

**Tabuľka 1.** Hlavné indikácie DOAC (3 – 6, upravené)

| Indikácia  | Dabigatran  | Rivaroxaban   | Apixaban  | Edoxaban   |
|--|---|---|---|--|
| Nevalvulárna fibrilácia predsiení (SPAF)                         | 150 mg 2-krát/deň<br>110 mg 2-krát/deň (pri CrCl 30 – 50 ml/min., vek ≥ 80 rokov) | 20 mg 1-krát/deň<br>15 mg 1-krát/deň (pri CrCl 30 – 50 ml/min.)   | 5 mg 2-krát/deň<br>2,5 mg 2-krát/deň (pri CrCl 30 – 50 ml/min., vek ≥ 80 rokov, hmotnosť 60 ≤ kg) | 60 mg 1-krát/deň<br>30 mg 1-krát/deň (pri CrCl 15 – 50 ml/min., hmotnosť 60 ≤ kg, inhibitory P-Gp) |
| ↓ renálny klírens (GF)   | pri CrCl < 30 ml/min. kontraindikovaný  | pri CrCl 15 – 30 ml/min. len 15 mg 1-krát/deň   | pri CrCl 15 – 30 ml/min. len 2,5 mg 2-krát/deň  | pri CrCl 15 – 30 ml/min. len 30 mg 1-krát/deň  |
| Akútny VTE   | 5 – 10 dní LMWH, potom dabigatran 150 mg 2-krát/deň                               | rivaroxaban 15 mg 2-krát/deň počas 21 dní, potom 20 mg 1-krát/deň (15 mg 1-krát/deň pri CrCl 30 – 50 ml/min.) | apixaban 10 mg 2-krát/deň počas 7 dní, potom 5 mg 2-krát/deň                                      | ≥ 5 dní LMWH, potom edoxaban 60 mg 1-krát/deň  |
| Prevenia rekurentnej VTE/PE po ukončení 6-mesačnej liečby VTE/PE |   |   | apixaban 2,5 mg 2-krát/deň  |  |
| Sekundárna prevencia AKS   |   | rivaroxaban 5 mg alebo 10 mg spolu s ASA ev. s DAT  |   |  |
| Primárna VTE prevencia pri elektívnom ortopedickom výkone        | dabigatran 110 mg 1-krát/deň v deň operácie, potom 220 mg 1-krát/deň              | rivaroxaban 10 mg 1-krát/deň v deň operácie   | apixaban 2,5 mg 2-krát/deň v deň operácie   | len v Japonsku   |

*Vysvetlivky: SPAF – stroke prevention in atrial fibrillation (prevencia ischemickej cievnnej mozgovej príhody pri nevalvulárnej fibrilácii predsiení), VTE – venózný tromboembolizmus, PE – pľúcna embolizácia, CrCl – klírens kreatinínu, LMWH – heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou, ASA – kyselina acetylsalicylová, DAT – duálna protidoštičková liečba*

logický ani fyziologický antikoagulačný účinok daného DOAC v prípade individuálneho pacienta. Z tohto dôvodu sú potrebné iné, „praktickejšie“ testy, a to tak testy na rutinné hodnotenie, ako aj testy na urgentné hodnotenie účinku DOAC (obrázok 2) (8, 10 – 12).

Rutinné skriningové koagulačné testy, t. j. aktivovaný parciálny tromboplastínový čas (aPTT), protrombínový čas (PT) a trombínový čas (TT), bežne dostupné v klinických laboratóriách, nie sú spoľahlivými testami na meranie antikoagulačného účinku DOAC. Príčinou je variabilita citlivosti PT a aPTT v závislosti od použitých reagensí, ako aj potreba zohľadniť pri meraní dané špecifické DOAC. Z tohto dôvodu sa výsledky PT a aPTT v prítomnosti danej koncentrácie DOAC významne líšia podľa použitej reagensie a nedajú sa medzilaboratórne štandardizovať (tabuľka 4) (8, 12 – 15). Okrem toho, keďže DOAC inhibujú obe formy proteáz (voľnú a viazanú), dané predĺženie zrážacieho času (napr. PT v sekundách) nezodpovedá vždy tej istej hodnote antikoagulácie, ako je to napr. v prípade pacienta na warfaríne (16). Príkladom takejto nezohody je účinne antikoagulovaný pacient na apixabane, ktorý má len malé predĺženie PT (17) alebo pacient na dabigatrane, u ktorého je predĺžený nadmerne citlivý TT, pričom hodnoty koncentrácie dabigatranu môžu byť takmer nulové (18).

**Tabuľka 2.** Potenciálne výhody a nevýhody rôznych antikoagulancií (8, upravené)

| Antikoagulancium | Výhody   | Nevýhody  |
|------------------|--|---|
| <b>Warfarín</b>  | perorálna aplikácia                                | veľká inter-individuálna variabilita  |
|                  | potvrdená účinnosť a bezpečnosť                    | veľa potravinových a liekových interakcií   |
|                  | dostupné antidotum (vitamín K)                     | potreba pravidelného monitorovania na dosiahnutie INR v rámci úzkeho terapeutického intervalu (invazívnosť, nepohodlie, náklady)  |
|                  | dlhodobé používanie a klinická skúsenosť           | teratogenita vo včasnej tehotnosti a krvácavé riziko v pokročilej tehotnosti  |
|                  | bezpečný na použitie u dojčiacich žien             |   |
| <b>UFH</b>       | potvrdená účinnosť a bezpečnosť                    | potreba injekčného (parenterálneho) podania   |
|                  | dostupné antidotum (protaminsulfát)                | významná inter-individuálna variabilita   |
|                  | dlhodobé používanie a klinická skúsenosť           | potreba pravidelného monitorovania na dosiahnutie aPTT alebo anti-Xa aktivity v rámci terapeutického intervalu                    |
|                  | bezpečný v tehotnosti a u dojčiacich žien          |   |
| <b>LMWH</b>      | potvrdená účinnosť a bezpečnosť                    | potreba injekčného (parenterálneho) podania   |
|                  | dostatočný čas používania a klinická skúsenosť     | možná inter-individuálna variabilita  |
|                  | bezpečný v tehotnosti a u dojčiacich žien          | potenciálna potreba monitorovania na dosiahnutie anti-Xa aktivity v rámci terapeutického intervalu u vybraných pacientov          |
| <b>DOAC</b>      | perorálna aplikácia                                | limitované údaje o praktickom používaní lieku a limitovaná klinická skúsenosť   |
|                  | potvrdená účinnosť a bezpečnosť                    | absencia antidota pre anti-Xa DOAC  |
|                  | teoreticky bez potreby laboratórneho monitorovania | liekové interakcie s niektorými liekmi, z ktorých všetky nie sú známe   |
|                  |  | zákaz podania lieku v tehotnosti a šesťnedeľ<br>zákaz podania lieku u viacerých klinických skupín pacientov a klinických situácií |

*Vysvetlivky: DOAC – priame perorálne antikoagulanciá, UFH – nefrakcionovaný heparín, LMWH – heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou, INR – medzinárodný normalizačný pomer pre protrombínový čas, aPTT – aktivovaný parciálny tromboplastínový čas, anti-Xa – anti-Xa aktivita*

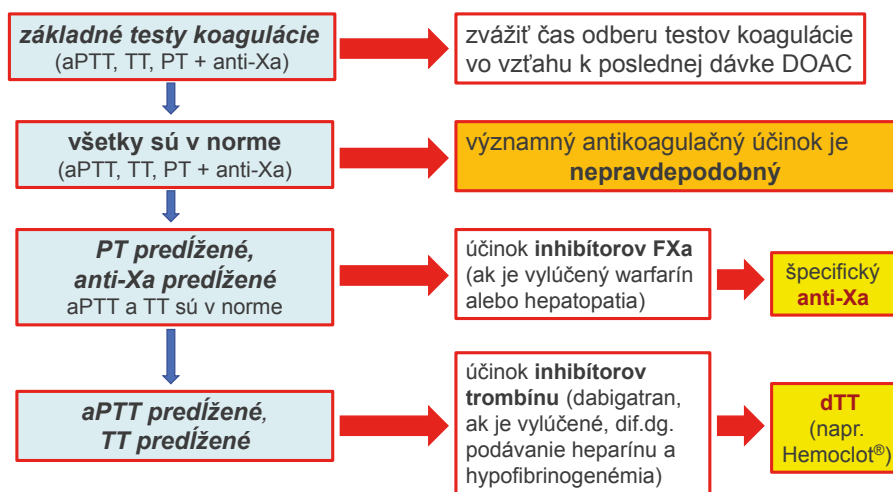
Treba pripomenúť, že priame inhibítory FXa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban a betrixaban) nepredlžujú TT (tabuľka 4) (8, 12 – 15).

Špecifickými metódami na stanovenie DOAC sú dilučný TT (dTT), ekarínový zrážací čas (ECT), ekarínová chromogénna metóda (ECA) a chromogénna

**Tabuľka 3.** Kedy je indikované monitorovanie DOAC? (7, upravené)

| Klinická situácia  | Otázka  |
|--|---|
| Epizóda krvácania, ↑ riziko krvácania, susp. predávkovanie | Aká je koncentrácia DOAC?   |
| Akútna tromboembolická príhoda                             | Aká je účinnosť DOAC? Poddávkovanie DOAC?                               |
| Urgentný operačný výkon, trombolýza                        | Dá sa eliminovať účinok DOAC?   |
| Obličková dysfunkcia                                       | Ide o akumuláciu DOAC? (najmä pri dabigatrane > 80 % obličkový klírens) |
| Hepatálna dysfunkcia                                       | Ide o akumuláciu DOAC? (najmä pri apixabane > 50 % hepatálny klírens)   |
| Nadváha  | Je dávka DOAC primeraná?  |
| Potenciálne liekové interakcie                             | Aká je koncentrácia DOAC?   |
| Spolupráca s pacientom pri liečbe DOAC                     | Aká je kompliance pacienta?   |

Vysvetlivky: DOAC – priame perorálne antikoagulanciá

**Obrázok 2.** DOAC – algoritmus zhodnotenia stavu antikoagulácie (10, 11 – upravené)

Vysvetlivky: DOAC – nové perorálne antikoagulanciá, aPTT – aktivovaný parciálny tromboplastínový čas, TT – trombínový čas, PT – protrombínový čas, anti-Xa – anti-Xa aktivita, dTT – dilučný trombínový čas

**Tabuľka 4.** Účinky DOAC na rutinné testy hemostázy (8, 12 – 15, upravené)

| Test  | Dabigatran | Rivaroxaban | Apixaban | Edoxaban | Komentár  |
|-------|------------|-------------|----------|----------|---|
| PT    | ↑          | ↑↑(↑)       | (↑)      | ↑        | rôzne reagencie = rôzna citlivosť; poradie citlivosti DOAC: rivaroxaban > dabigatran > edoxaban > apixaban ( <b>PT nepoužívať na hodnotenie účinku apixabanu!</b> ) |
| aPTT  | ↑↑(↑)      | ↑           | (↑)      | ↑        | rôzne reagencie = rôzna citlivosť; poradie citlivosti DOAC: dabigatran > rivaroxaban > edoxaban > apixaban  |
| TT    | ↑↑↑↑       | -           | -        | -        | nadmerné citlivý na dabigatran, <b>normálny TT vylučuje účinnú koncentráciu dabigatranu!</b> necitlivý na anti-Xa DOAC  |
| fbg   | (↓)        | (↓)         | (↓)      | (↓)      | väčšina koag. Clauss. metód necitlivá, ojedinele koag. a na PT založené metódy → možné falošne ↓ fbg a i. KF  |
| dRVVT | ↑↑         | ↑↑          | ↑↑       | ↑↑       | dRVVT citlivé k všetkým DOAC; treba konfirmačnú reagenciu na odlíšenie od LA  |

Vysvetlivky: DOAC – priame perorálne antikoagulanciá, PT – protrombínový čas, aPTT – aktivovaný parciálny tromboplastínový čas, TT – trombínový čas, fbg – fibrinogén, dRVVT – dilučný test s jedom Russelovej zmije, LA – lupus antikoagulans, KF – koagulačné faktory

anti-Xa metódy (tabuľka 5) (8, 12 – 15). Všetky tieto testy však vyžadujú použitie kalibrátorov a kontrol špecifických pre dané merané DOAC (14, 19 – 21). Tieto testy majú aj svoje limitácie. Je to najmä:

a) absencia validácie očakávaných terapeutických koncentrácií DOAC a b) určenie prediktívnych plazmatických koncentrácií DOAC pre riziko krvácania a trombózy. Okrem toho, koagulačné a chromogénne

metódy vykazujú odchýlky v rámci analytických a reagenčných systémov a majú aj nedostatočnú špecificitu (21).

### Dabigatran – rutinné skriningové testy

Z rutinných hemokoagulačných testov je na dabigatran citlivejší aPTT než PT, zatiaľ čo TT je na dabigatran nadmerne citlivý (tabuľka 4) (8, 12 – 15). Avšak samotné aPTT nemôže spoľahlivo odlišiť terapeutickú hodnotu dabigatranu od subterapeutickej hodnoty. V štúdiu, ktorá hodnotila sedem aPTT reagencií, bolo dokázané, že až 18 % pacientov malo normálny aPTT napriek terapeutickým hodnotám dabigatranu nameraným metódou LC-MS/MS (18). V prípade krvácajúceho pacienta na liečbe dabigatranom preto neplatí odporúčanie Amerického kolégia hrudných lekárov (ACCP 9. vydanie) v časti „Antitrombotická a trombolytická liečba“ prevzaté z praktických odporúčaní Americkej hematologickej spoločnosti (ASH 2011), že „normálny aPTT je ukazovateľom toho, že je nepravdepodobné, aby bol dabigatran príčinou krvácania“ (22). Dokázalo sa, že v závislosti od použitých reagencií 15 – 35 % pacientov s plazmatickou hodnotou dabigatranu > 100 ng/ml malo normálny aPTT, čo je v kontradikcii s odporúčaním British Committee for Standards in Haematology (BCSH), ktorý uzatvára, že „pri koncentrácii dabigatranu > 100 ng/ml je aPTT konštantne predĺžený“ (23, 24). Ako je uvedené, TT je na rozdiel od aPTT extrémne citlivý na dabigatran a bolo dokázané, že normálny TT svedčí pre neprítomnosť alebo minimálnu plazmatickú hodnotu dabigatranu (18, 25). Účinok dabigatranu je možné merať aj alternatívnymi metódami, t. j. pomocou dilučného testu s jedom Russelovej zmije (dRVVT) a globálnymi testami hemostázy – trombínovým generačným testom (TGT), aktivovaným časom zrážania (ACT) a rotačnou trombelastometriou (Rotem)/trombelastografiou (TEG) (8, 14).

### Dabigatran – špecifické testy

Plazmatická koncentrácia dabigatranu sa meria viacerými metódami, z ktorých sú pre klinickú prax najvýznamnejšie: dTT, ECT alebo ECA (tabuľka 5) (8, 12 – 15). Tieto metódy majú špecifické štandardné krivky pre

**Tabuľka 5.** Účinky DOAC na špeciálne (kvantitatívne) testy hemostázy (8, 12 – 15, upravené)

| Test    | Dabigatran | Rivaroxaban | Apixaban | Edoxaban | Komentár  |
|---------|------------|-------------|----------|----------|---|
| dTT/DTI | ↑↑         | -           | -        | -        | veľmi citlivý k dabigatranu, necitlivý k anti-Xa DOAC       |
| ECT/ECA | ↑↑         | -           | -        | -        | veľmi citlivý k dabigatranu, necitlivý k anti-Xa DOAC       |
| PICT    | ↑↑         | ↑↑          | ↑↑       | ↑↑       | treba modifikáciu metódy z dôvodu citlivosti na všetky DOAC |
| anti-Xa | -          | ↑↑          | ↑↑       | ↑↑       | citlivý k anti-Xa DOAC, necitlivý k dabigatranu             |

Vysvetlivky: DOAC – priame perorálne antikoagulanciá, dTT – dilučný trombinový čas, DTI – priamy trombinový inhibítor, ECT – ekarínový koagulačný čas, ECA – ekarínová chromogénna metóda, PICT – protrombinázou navodený čas zrážania, anti-Xa – anti-Xa aktivita

**Tabuľka 6.** Interferencie DOAC so špeciálnymi testami hemostázy (14, upravené)

| Test         | Dabigatran | Rivaroxaban | Apixaban | Komentár  |
|--------------|------------|-------------|----------|---|
| PT faktory   | ↓/↓↓       | ↓/↓↓        | ↓/↓↓     | všetky PT faktory sú ovplyvnené, najviac dabigatranom a rivaroxabanom; falošný nález inhibítora koagulačného faktora                |
| aPTT faktory | ↓/↓↓↓      | ↓/↓↓        | ↓/↓↓     | všetky aPTT faktory sú ovplyvnené, najviac dabigatranom a rivaroxabanom; falošný nález inhibítora koagulačného faktora              |
| Protein C    | -/↑        | -/↑         | -/↑      | chromogénne metódy sú neovplyvnené, ale koagulačné áno  |
| Protein S    | -/↑        | -/↑         | -/↑      | chromogénne metódy sú neovplyvnené, ale koagulačné áno  |
| Antitrombín  | -/↑        | -/↑         | -/↑      | anti-II metódy sú ovplyvnené dabigatranom, anti-Xa metódy, naopak, anti-Xa DOAC   |
| APC-R        | -/↑        | -/↑         | -/↑      | metódy na princípe aPTT sú ovplyvnené   |
| LA           | ↑/↑↑       | ↑/↑↑        | -/↑      | predĺženie skríningových testov pri DOAC je oveľa väčšie než pri konfirmačných testoch → falošný nález LA – dabigatran, rivaroxaban |
| vWF          | -          | -           | -        |   |
| TEG          | ↓/↓↓       | ↓/↓↓        | ↓/↓↓     | rôzne parametre sú zmenené  |
| LTA          | -          | -           | -        |   |
| PFA          | -          | -           | -        |   |
| TGA          | ↓/↓↓       | ↓/↓↓        | ↓/↓↓     | rôzne parametre sú zmenené  |

DOAC – priame perorálne antikoagulanciá, PT – protrombinový čas, aPTT – aktivovaný parciálny tromboplastínový čas, APC-R – rezistencia na aktivovaný proteín C, LA – lupus antikoagulans, vWF – von Willebrandov faktor, TEG – trombelastografia, LTA – svetelná agregometria, PFA – analyzátor funkcie trombocytov, TGA – trombinový generačný test

dabigatran (26 – 27), pre dTT pozri aj [www.ssht.sk](http://www.ssht.sk) (28). V multicentrickej štúdií (29) všetky uvedené metódy preukázali lineárnu koreláciu s koncentráciou dabigatranu nameranou LC-MS/MS. Senzitívnou metódou na meranie koncentrácie dabigatranu sa ukázal aj čas zrážania indukovaný protrombinázou (prothrombinase-induced clotting time – PICT), tento však vyžaduje pred zavedením do rutínnej praxe lepšiu optimalizáciu a štandardizáciu testu (8, 14).

### Dabigatran – interferencie v špeciálnych koagulačných testoch

Dabigatran interferuje s väčšinou testov založených na princípe aPTT a s niektorými testami na princípe PT

v závislosti od svojej koncentrácie. S testami na princípe PT dabigatran interferuje len pri vysokých koncentráciách. Bolo dokázané, že už aj relatívne nízke koncentrácie dabigatranu (t. j. 75 ng/ml, ktoré sú pod typickou dolnou terapeutickou hranicou) viedli v zmesných testoch k výsledkom svedčiacim pre prítomnosť inhibítora (tabuľka 6) (8, 14). Relatívne vysoké koncentrácie dabigatranu (t. j. 200 ng/ml, ktoré sú vyššie než „horná terapeutická hranica“) už mali za následok výrazný inhibičný účinok v testoch založených na aPTT a PT (30). Koncentrácie dabigatranu 200 – 300 ng/ml viedli k zníženiu aktivity FVIII až pod 0,1 IU/ml (< 10 %), pričom pri dilučných testoch nebolo možné dosiahnuť normálne hodnoty FVIII (31). Preto treba brať do úvahy, že prítomnosť dabigatranu môže ovplyvniť testy na princípe

aPTT, t. j. aj zmesné testy, testy aktivity koagulačných faktorov a testy na vyšetrovanie špecifických inhibitorov koagulačných faktorov (napr. Bethesda metóda), čo môže viesť k falošným nálezom deficitu koagulačného faktora alebo prítomnosti špecifického inhibítora (31). Koagulačné metódy na vyšetrovanie proteínu C (PC), proteínu S (PS) a APC-rezistencia (APC-R) sú významne ovplyvnené už nízkymi koncentraciami dabigatranu, čo môže mať za následok nadmerne vysoké hodnoty aktivity PC a PS a falošnú pozitivitu výsledku APC-R. Chromogénnu metódu, ktorá sa rutínne používa na stanovenie PC, dabigatran a ani iné DOAC neovplyvňujú. Okrem toho dabigatran ovplyvňuje stanovenie aktivity antitrombínu, ak ho laboratórium stanovuje metódou inhibície trombínu. Prítomnosť dabigatranu môže zapríčiniť falošne pozitívne výsledky lupus antikoagulans (LA) (tabuľka 6) (8, 14). Dabigatran však neinterferuje s Elisa metódami na stanovenie antifosfolipidových protilátok (t. j. antikardiolipínové protilátky – ACLA a protilátky proti beta-2-glykoproteínu I) (31 – 32). Chromogénne a latexové metódy takisto nie sú dabigatranom ovplyvnené (31 – 32). Vzhľadom na uvedené by mali tie laboratória, ktoré majú len veľmi obmedzenú informáciu o klinickom stave pacienta (napr. referenčné laboratória), v záujme vylúčenia nesprávnej interpretácie výsledkov overiť (napr. pomocou TT), či vo vzorke nie je dabigatran.

### Dabigatran – súhrn

1. Najužitočnejší test na rýchle vylúčenie prítomnosti dabigatranu (normálna hodnota) alebo na potvrdenie prítomnosti dabigatranu (zvýšená hodnota) je štandardný TT pre svoju celkovú a extrémnu citlivosť k dabigatranu (tabuľka 4) (8, 14).
2. Potenciálne užitočný test je aj aPTT, ale je menej vhodný na urgentný skríning účinku dabigatranu. Normálnu hodnotu aPTT je možné zistiť aj vo vzorkách s účinnou koncentráciou dabigatranu, aj keď tento jav môže byť závislý od použitej reagentie pre aPTT (8, 14).
3. Dilučný TT (dTT), napr. HTI, ev. aj vhodne štandardizovaný ekarínový test (ECT/ECA) sú spoľahlivými tes-



- tami na určenie plazmatickej koncentrácie dabigatranu (konvertovaním výsledku zo štandardnej kalibračnej krivky dabigatranu) (tabuľka 5) (8, 14).
4. Z ďalších testov je do budúcnosti perspektívny dRVVT, ktorý by mohol byť v modifikovanej forme vhodný aj na monitorovanie antikoagulačnej aktivity dabigatranu (tabuľka 5) (8, 14).

### Priame anti-Xa DOAC – rutinné skriningové testy

Testy založené na PT sú citlivejšie na účinok priamych anti-Xa DOAC v závislosti od ich koncentrácie než testy založené na princípe aPTT. Odpoveď PT na priame anti-Xa DOAC sa líši podľa daného DOAC a použitej PT reagentie (tabuľka 4) (17, 20, 26, 33). Napríklad terapeutické koncentrácie apixabanu nepreukázali vplyv na metódy založené na aPTT, a pritom len slabo ovplyvňovali testy na princípe PT. Naopak, rivaroxaban a edoxaban môžu mať za následok predĺženie tak aPTT, ako aj PT (34 – 38). Príčina týchto rozdielov účinnosti jednotlivých anti-Xa DOAC na základné hemokoagulačné testy nie je známa. Preto ani koncentrácia špecifických anti-Xa DOAC sa nedá spoľahlivo odhadnúť podľa výsledkov aPTT alebo na základe nekalibrovaného PT, pri ktorom nie je možné predvídať odpoveď na dané DOAC. V štúdií pacientov liečených rivaroxabanom až 32 % vzoriek malo normálne hodnoty PT pri „terapeutických“ plazmatických hodnotách rivaroxabanu (37). Z toho vyplýva, že normálna hodnota PT nevylučuje účinnú plazmatickú koncentráciu rivaroxabanu u pacienta liečeného rivaroxabanom. Niektoré reagentie sú dostatočne citlivé na rivaroxaban, ale aj na edoxaban a dajú sa použiť na meranie koncentrácie týchto DOAC, ale stanovenie koncentrácie daného DOAC vyžaduje „scitlivenie“ metodiky špecifickým kalibrátorom pre dotyčné DOAC (38).

### Priame anti-Xa DOAC – špecifické testy

Koncentrácie priamych anti-Xa DOAC (rivaroxaban, apixaban, edoxaban a betrixaban) sa dajú presne stanoviť použitím chromogénnych anti-Xa metód so špecifickými kalibrátormi (tabuľka 5) (20 – 21, 35, 39 – 41). Rovnaká anti-Xa

metóda, ktorá sa zaviedla na meranie koncentrácie DOAC, sa využíva aj na meranie účinku nepriamych inhibítorov FXa (heparín, heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou – LMWH, fondaparinux). Všetky priame a nepriame inhibítory FXa sa dajú merať chromogénnou anti-Xa metódou, a to dokonca bez ohľadu na daný kalibrátor. Meranie koncentrácie priamych inhibítorov FXa metódou kalibrovanou na heparín, LMWH alebo fondaparinux sa však neodporúča, a to aj napriek tomu, že táto metóda má potenciál stanoviť prítomnosť DOAC v účinnej koncentrácii (8, 14, 21, 39).

Zatiaľ čo anti-Xa aktivita kalibrovaná na heparín lineárne koreluje s anti-Xa aktivitou DOAC, v prípade využitia anti-Xa aktivity kalibrovannej na heparín pri meraní koncentrácií DOAC existujú viaceré limitácie: 1) výsledky nepriamych inhibítorov FXa sa vyjadrujú v IU/ml, ale koncentrácie priamych inhibítorov FXa (DOAC) sa merajú v ng/ml, pričom neexistuje priamy vzťah medzi týmito jednotkami, 2) problémom je aj veľká variabilita v nameraných koncentráciách DOAC, čo bolo dokázané v prípade rivaroxabanu pri použití rôznych komerčných anti-Xa reagentií (kitov), 3) rozsah terapeutických koncentrácií anti-Xa, prinajmenšom pre rivaroxaban a apixaban, omnoho viac presahuje typický kalibračný rozsah pre heparín alebo LMWH, a často je v rozmedzí 5 – 9 IU/ml a 4) metóda nie je špecifická pre anti-Xa DOAC a bude zachytávať všetky anti-Xa antikoagulanty (8, 14, 21, 39). Navyše, dolný limit stanovenia anti-Xa metódou sa líši podľa použitých kalibrátorov a niektoré metódy kalibrované na heparín alebo LMWH môžu podhodnotiť koncentrácie DOAC. Napriek tomu, niektoré anti-Xa metódy kalibrované na heparín majú dostatočný dolný limit na stanovenie koncentrácie rivaroxabanu 5 ng/ml alebo nižšej, a preto by sa dali použiť aj na hodnotenie pacientov na rivaroxabane, napr. v prípade potreby urgentného operačného výkonu alebo trombolýzy (21). Alternatívou na stanovenie koncentrácie daného anti-Xa DOAC môže byť použitie dRVVT testu s vysokou koncentráciou fosfolipidov s kalibráciou na špecifický DOAC (tabuľka 4) (42).

### Anti-Xa DOAC – interferencie v špeciálnych koagulačných testoch

Rivaroxaban a edoxaban predlžujú PT vo väčšom rozsahu než aPTT, a preto môžu interferovať so špeciálnymi testami koagulačných faktorov, ktoré sú založené na PT (FVII, X, V, II). V týchto testoch môžu oba anti-Xa DOAC zapríčiniť falošne nízku aktivitu koagulačných faktorov v závislosti od koncentrácie lieku (32). Okrem toho v prítomnosti účinnej koncentrácie rivaroxabanu alebo edoxabanu vykazujú zmesné testy nekompletnú korekciu, čo môže viesť k falošnému nálezu špecifického inhibítora FVII, X alebo V (8, 14, 19) (tabuľka 6). Apixaban aj vo vysokých koncentráciách (napr. 400 ng/ml) len slabo ovplyvňuje testy založené na PT (19). Podobne ako pri dabigatranu sú koagulačné testy na aktivitu PC, PS a APC-R v prítomnosti rivaroxabanu alebo apixabanu falošne nadhodnotenú (8, 14, 19). Rovnako aktivita antitrombínu meraná metódou založenou na FXa bude falošne nadhodnotená v prítomnosti anti-Xa DOAC, naproti tomu aktivita antitrombínu meraná metódou založenou na FIIa nebude ovplyvnená týmito liekmi. Anti-Xa DOAC môžu tiež falošne a významne znížiť chromogénnu aktivitu FVIII (8, 14, 19) a taktiež môžu navodiť falošne pozitívne výsledky LA (dokonca aj vtedy, ak je aPTT v norme) (tabuľka 6). Anti-Xa DOAC neovplyvňujú antifosfolipidové testy na princípe Elisa (t. j. ACLA a protilátky proti beta-2-glykoproteínu I) (8, 14, 19). Iné chromogénne a latexové imunometódy (napr. aktivita plazminogénu, kvantitatívne D-diméry, voľný antigén PS, aktivita PC, antigén a aktivita von Willebrandovho faktora a i.) neinterferujú s účinkom anti-Xa DOAC (8, 14, 19). Rovnako ako v prípade dabigatranu aj pri anti-Xa DOAC platí, že tie laboratória, ktoré majú len veľmi obmedzenú informáciu o klinickom stave pacienta (napr. referenčné laboratória), by mali v záujme vylúčenia nesprávnej interpretácie výsledkov zväziť vykonanie analýzy, či vo vzorke nie sú prítomné anti-Xa DOAC.

### Priame anti-Xa DOAC – súhrn

1. Pre skrining antikoagulačného účinku rivaroxabanu v urgentnej situácii

- je možné použiť PT, hoci je známe, že aj vo vzorkách s účinnou koncentráciou rivaroxabanu sa zistia normálne hodnoty PT (možná závislosť PT od použitej reagentie) (tabuľka 4) (8, 14).
- Hodnoty PT by mali byť vždy označené ako „pomer“, a nie ako INR, keďže použitie INR pri skríningu anti-Xa DOAC nie je náležité a potenciálne zavádzajúce (INR bolo vyvinuté na monitorovanie antivitamínov K) (8).
  - Prítomnosť apixabanu nemôže byť spoľahlivo vylúčená a ani potvrdená rutinnými koagulačnými testami (PT a aPTT) pre ich nízku senzitivitu (tabuľka 4) (8, 14).
  - Nedávno bola vyvinutá senzitivnejšia modifikácia PT testu, ktorej výsledky korelujú s výsledkami väčšiny chromogénnych anti-Xa metód. Táto modifikácia PT testu by sa mohla stať do budúcnosti po špecifickej štandardizácii prvolíniovým skríningovým testom na hodnotenie antikoagulačného účinku apixabanu (43).
  - Najlepšou metódou na kvantifikáciu účinku anti-Xa DOAC (rivaroxabanu, apixabanu a edoxabanu) je anti-Xa aktivita kalibrovaná špecificky pre dané anti-Xa DOAC (tabuľka 5) (8, 14).
  - Do budúcnosti sa ako sľubná alternatívna metóda na hodnotenie aktivity anti-Xa DOAC ukazuje aj modifikovaná forma dRVVT testu (8, 14).

### Výzvy a úskalia laboratórneho monitorovania DOAC

Klinické štúdie preukázali dobrú bezpečnosť DOAC bez potreby laboratórneho monitorovania s výnimkou situácií, ktoré sú uvedené v tabuľke 3 (7). Dôležité je, aby si klinik, ale aj laboratórny pracovník pri meraní účinku DOAC overil, a to obzvlášť v urgentnej situácii, či pacient liek užil, a rovnako aj to, aká bola dávka DOAC, a najmä kedy pacient liek užil. Podľa toho je možné zhodnotiť, či je koncentrácia DOAC maximálna (peak), bazálna (trough) alebo je koncentrácia pacientovho DOAC niekde medzi týmito rozmedziami. Treba zdôrazniť, že v súčasnosti neexistujú žiadne indikácie a ani odporúčania na úpravu dávkovania akéhokoľvek DOAC na základe výsledku laboratórneho testu (koncentrácie DOAC). Naopak, v prípade úpravy dáv-

ky DOAC podľa aktuálnej „nízkej“ alebo „vysokiej“ koncentrácie lieku hrozí riziko predávkovania alebo poddávkovania, najmä v situácii, ak údaj o dávke DOAC, resp. o čase užitia DOAC pacientom nebol adekvátny (8).

Pri hodnotení prítomnosti alebo absencie účinku (najmä pri skríningu) DOAC treba vziať do úvahy aj variabilitu citlivosti reagentii použitých pri testovaní na DOAC. Práve variabilita citlivosti reagentii môže byť vysvetlením, prečo normálny výsledok rutinného koagulačného testu nemusí odrážať neprítomnosť účinnej koncentrácie DOAC (napr. normálny PT pri účinnej koncentrácii rivaroxabanu, resp. normálny aPTT pri účinku dabigatranu) (8).

### Záver

Je známe, že v bežnej klinickej praxi si žiadne z dostupných DOAC nevyžaduje rutinné laboratórne monitorovanie. Po zavedení DOAC sa však stala veľkou výzvou pre väčšinu klinických laboratórií potreba stanovenia koncentrácie týchto liekov pri naliehavých situáciách (napr. urgentný operačný alebo invazívny výkon). Rozdiely v citlivosti rutinných koagulačných testov pre skríning DOAC však neumožňujú spoľahlivé meranie účinku DOAC. V prípade kvantitatívnych metód na stanovenie koncentrácie DOAC sa odporúča v prípade dabigatranu používať dTT (HTI) príp. ekarínové testy (ECT/ECA) a pri anti-Xa DOAC sú najspoľahlivejšie merania anti-Xa aktivity kalibrovanej na daný DOAC. Veľmi dôležitá je správna interpretácia výsledkov iných špeciálnych koagulačných testov (napr. aktivity koagulačných faktorov, špecifických inhibitorov, lupus antikoagulans, a i.) u pacientov liečených DOAC, aby sa predišlo nesprávnej diagnóze, niekedy aj s nežiaducou nasledujúcou intervenciou. Záverom je potrebné zdôrazniť, že pri hodnotení rizika krvácania alebo trombózy u pacientov liečených DOAC je nevyhnutné výsledky koagulačných testov interpretovať so zohľadnením klinického stavu a klinickej situácie týchto pacientov.

*Podakovanie: Práca bola podporená projektom APVV 16-0020, projektom Vega 1/0168/16 a projektami CEPV II a CEVYPET.*

### Literatúra

- Stanciáková L, Dobrotová M, Hollý P, et al. Nové antikoagulanty. In: Štvrtinová V, et al. Venózný tromboembolizmus. 1. vydanie, Bratislava: SAP – Slovak Academic Press s.r.o., 2018. 388 s.
- Steffel J, Verhamme P, Potpara TS, et al. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation. Eur Heart J. 2018;39(16):1330-1393.
- SPC Pradaxa 150 mg. Dostupné na: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/pradaxa-150-mg-tvrde-kapsuly-941954.html>. [4.1.2019].
- SPC Xarelto 20 mg. Dostupné na: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/xarelto-20-mg-filmom-obalene-tablety-646505.html>. [4.1.2019].
- SPC Eliquis 5 mg. Dostupné na: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/eliquis-5-mg-filmom-obalene-tablety-501241.html>. [4.1.2019].
- SPC Lixiana 60 mg. Dostupné na: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/lixiana-60-mg-filmom-obalene-tablety-821934.html>. [4.1.2019].
- Tripodi A, Palareti G. New anticoagulant drugs for treatment of venous thromboembolism and stroke prevention in atrial fibrillation. J Intern Med. 2012;271(6):554-565.
- Favaloro EJ, Pasalic L, Curnow J, et al. Laboratory monitoring or measurement of direct oral anticoagulants (DOACs): Advantages, limitations and future challenges. Curr Drug Metab. 2017;18(7):598-608.
- Gous T, Couchman L, Patel JP, et al. Measurement of the direct oral anticoagulants apixaban, dabigatran, edoxaban and rivaroxaban in human plasma using turbulent flow liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry. Ther Drug Monit. 2014;36(5):597-605.
- Tran HJJ, Young L, McRae S, et al. New oral anticoagulants: a practical guide on prescription, laboratory testing and peri-procedural/bleeding management. Intern Med J. 2014;44(6):525-536.
- Staško J, Kalnášová B, Firment J, et al. Premosujúca liečba a perioperačný manažment u dlhodobu antikoagulovaných pacientov. In: Štvrtinová V, et al. Venózný tromboembolizmus. 1. vydanie, Bratislava: SAP – Slovak Academic Press s.r.o., 2018. 388 s.
- Staško J, Ivanková J, Škorňová I, et al. Laboratórne monitorovanie nových perorálnych antikoagulantov. In Vitro. 2016;4(4):67-72.
- Gosselin R, Grant RP, Adcock DM. Comparison of the effect of the anti-Xa direct oral anticoagulants apixaban, edoxaban, and rivaroxaban on coagulation assays. Int J Lab Hematol. 2016;38(5):505-513.
- Favaloro EJ, Lippi G. Laboratory testing in the era of direct or non-vitamin K antagonist oral anticoagulants: a practical guide to measuring their activity and avoiding diagnostic errors. Sem Throm Hemost. 2015;41(2):208-227.
- Takatsuki S, Kimura T, Sugimoto K, et al. Real-world monitoring of direct oral anticoagulants in clinic and hospitalization settings. Sage Open Med. 2017;5:1-9.
- Haas S. Facts and artifacts of coagulation assays for factor Xa inhibitors. Thromb Haemost. 2010;103:686-688.
- Douxflis J, Chatelain C, Chatelain B, et al. Impact of apixaban on routine and specific coagulation assays: a practical laboratory guide. Thromb Haemost. 2013;110(2):283-294.
- Hawes EM, Deal AM, Funk-Adcock D, et al. Performance of coagulation tests in patients on therapeutic doses of dabigatran: a cross-sectional pharmacodynamics study based on peak and trough levels. J Thromb Haemost. 2013;11(8):1493-1502.
- Adcock DM, Gosselin R. Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review. Thromb Res. 2015;136(1):7-12.
- Harenberg J, Erdle S, Marx S, et al. Determination of rivaroxaban in human plasma samples. Semin Thromb Hemost. 2012;38(2):178-184.
- Gosselin RC, Francart SJ, Hawes EM, et al. Heparin calibrated chromogenic anti-Xa activity measurements in patients

receiving rivaroxaban: Can this test be used to quantify drug level? *Ann Pharmacother.* 2015;49(7):777-783.

22. Cushman M, Lim W, Zakai NA. 2011 Clinical Practice Guide on Anticoagulant Dosing and Management of Anticoagulant-Associated Bleeding Complications in Adults. Washington, DC: American Society of Hematology; 2011-Anticoagulant-Pocket-Guide.pdf. Dostupné na: <<http://www.google.sk/url?sa=t&rc=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKewijwYv2nNbfAhVMKVAKHdxEDhIQFjAAegQICRAC&url=http%3A%2F%2Fwww.hematology.org%2FClinicians%2FGuidelines-Quality%2FQuick-Ref%2F525.aspx&usg=AOvVaw-0CYkHawzsWsPLiYgKrkJ3j>>. [5.1.2019].

23. Baglin T, Keeling D, Kitchen S. Effects on routine coagulation screens and assessment of anticoagulant intensity in patients taking oral dabigatran or rivaroxaban: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2012;159(4):427-429.

24. Baglin T, Hillarp A, Tripodi A, et al. Measuring Oral Direct Inhibitors (ODIs) of thrombin and factor Xa: A recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2013;11:756-760.

25. Dager WE, Gosselin RC, Kitchen S, et al. Dabigatran effects on the international normalized ratio, activated partial thromboplastin time, thrombin time, and fibrinogen: a multicenter, in vitro study. *Ann Pharmacother.* 2012;46(12):1627-1636.

26. Samama MM, Guinet C. Laboratory assessment of new anticoagulants. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:761-772.

27. Stangier J, Feuring M. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012;23(2):138-143.

28. Staško J. Hemoclot® - test inhibície trombínu, použitie a hodnotenie v praxi, 02/2013. Dostupné na: <<http://www.ssht.sk/Sites/17/UserFiles/HEMOCLOT%20test.pdf>> .

29. Gosselin R, Hawes E, Moll S, et al. Performance of various laboratory assays in the measurement of dabigatran in patients receiving therapeutic doses. A prospective study based on peak and trough levels. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(2):262-267.

30. Van Ryn J, Stangier J, Haertter S, 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):1116-27.

31. Adcock DM, Gosselin R, Kitchen S, et al. The effect of dabigatran on select specialty coagulation assays. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(1):102-109.

32. Mani H. Interpretation of coagulation test results under direct oral anticoagulants. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(3):262-368.

33. Van Blerk M, Bailleul E, Chatelain B, et al. Influence of dabigatran and rivaroxaban on routine coagulation assays. *Thromb Haemost.* 2015;113(1):154-164.

34. Samama MM, Contant G, Spiro TE, et al. Evaluation of the prothrombin time for measuring rivaroxaban plasma concentrations using calibrators and controls: results of a multicenter field trial. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2012;18(2):150-158.

35. Hillarp A, Gustafsson KM, Faxälv L, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor apixaban on routine coagulation assays and anti-FXa assays. *J Thromb Haemost.* 2014;12:1545-1553.

36. Dale BJ, Ginsberg JS, Johnston M, et al. Comparison of the effects of apixaban and rivaroxaban on prothrombin and activated partial thromboplastin times using various reagents. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1810-1815.

37. Francart S, Hawes EM, Deal A, et al. Performance of coagulation tests in patients on therapeutic doses of rivaroxaban. A cross-sectional pharmacodynamic study based on peak and trough plasma levels. *Thromb Haemost.* 2014;111(6):1133-1140.

38. Morishima Y, Kamisato C. Laboratory measurements of the oral direct factor Xa inhibitor edoxaban. *Am J Clin Pathol.* 2015;743:241-247.

39. Barrett YC, Wang Z, Frost C, et al. Clinical laboratory measurement of direct factor Xa inhibitors: Anti-Xa assay is preferable to prothrombin time assay. *Thromb Haemost.* 2010;104(6):1263-1271.

40. Becker RC, Yang H, Barrett Y, et al. Chromogenic laboratory assays to measure the factor Xa-inhibiting properties of apixaban-an oral, direct and selective factor Xa inhibitor. *J Thromb Thrombolysis.* 2011;32(2):183-187.

41. Siriez R, Evrard J, Dogné JM, et al. Betrixaban: Impact on routine and specific coagulation assays - Practical laboratory guidance. *J Thromb Haemost: Research and Practice in thrombosis and haemostasis* 2018; 2(S1) [PB364]. Dostupné na: <<https://researchportal.unamur.be/en/publications/betrixaban-impact-on-routine-and-specific-coagulation-assays-a-pr-5>>. [5.1.2019].

42. Gosselin RC, Francart SJ, Hawes EM, Adcock Funk DM. Comparison of anti-Xa and DRVVT assays in quantifying drug levels in patients on therapeutic doses of rivaroxaban. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(12):1680-1684.

43. Harenberg J, Du S, Weiss C, et al. For the working party: Methods to determine apixaban of the subcommittee on control of anticoagulation of the ISTH. Report of the subcommittee on control of anticoagulation on the determination of the anticoagulant effect of apixaban: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):801-804.

---

**Prof. MUDr. Ján Staško, PhD.**  
 KHaT, JLF UK, UNM  
 Kollárova 2, 036 59 Martin  
 stasko@jlfmed.uniba.sk