

# Måling af det blodfortyndende lægemiddel Rivaroxaban i plasma

Ved brug af analysemetoden Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry sammenlignet med en funktionel analyse på ACL TOP

De orale antikoagulerende midler (NOAK) har vist sig at have en række fordele, og i flere tilfælde kan de erstatte behandlingen med vitamin K-antagonister. Men der kan dog være behov for målinger, der viser koncentrationen af NOAK i blodet. Dette bachelorprojekt har undersøgt målingen af lægemidlet Rivaroxaban. Studiet viser, at det er muligt at måle Rivaroxaban-koncentrationen i plasma med analysemetoden Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). Men ved metodesammenligning ses, at det er problematisk at måle koncentrationer over 500 µg/L med en funktionel analyse på ACL TOP.

## Baggrund

Ifølge Lægemiddelstyrelsen er mindst 100.000 patienter i Danmark i behandling med antikoagulerende lægemidler (AK-behandling); oftest er det vitamin K-antagonister, fx Warfarin (1). Vitamin K-antagonister bevirker, at koagulationsfaktorerne II, VII, IX og X ikke er aktive, og vitamin K-antagonister har derfor effekt flere steder i koagulationskaskaden (2). Hovedparten af patienterne er i behandling på grund af tromboiserisiko i forbindelse med kronisk atrieflimren. Det estimeres, at mere end 50.000 danskere har atrieflimren, og antallet er støt stigende. Antallet forventes at være tredoblet i 2050, hvor en af årsagerne er befolkningens stigende gennemsnitsalder. Atrieflimren kan føre til apopleksi og hjerteinsufficiens og er skyld i ca. 25 % af alle apopleksitilfælde (3).

På trods af at vitamin K-antagonister har været i brug længe, er der en risiko for alvorlige bivirkninger og blødninger forbundet med overdosering af lægemidlerne. Samtidig påvirkes vitamin K-antagonisternes virkning betydeligt af andre lægemidler og fødevarer. Der er derfor behov for løbende monitorering af koagulationssystemet med INR-bestemmelser (1,4).

## Nye orale antikoagulerende midler

I det sidste årti er der frigivet nye orale antikoagulerende midler (NOAK), som hver især hæmmer én enkelt koagulationsfaktor. I flere tilfælde kan NOAK erstatte vitamin K-antagonister og har en række fordele, fx et bredere terapeutisk vindue, fast dosering, virkningen påvirkes ikke af kosten og andre læge-

midler, og det er ikke nødvendigt med løbende monitorering af behandlingen (4).

På trods af det manglende behov for løbende monitorering er der i nogle tilfælde alligevel et behov for at kunne bestemme koncentrationen af NOAK i blodet. Fx i forbindelse med større operationer og ved mistanke om overdosering, som kan have alvorlige følger, hvis det ikke opdages i tide (5,6). Der er gennemført flere studier, som belyser, hvordan de almindeligt brugte koagulationsanalyser påvirkes af NOAK. Samlet set viser studierne, at det ikke er muligt at benytte almene koagulationsanalyser til monitorering af patienter i behandling med NOAK (7,8,9). Derfor er der behov for en analysemetode, som kan give information om NOAK's effekt på koagulationssystemet eller give et kvantitativt mål for lægemiddelkoncentrationen i plasma.

Et eksempel på NOAK er Rivaroxaban, som hæmmer koagulationsfaktor Xa (KFXa). Studier har undersøgt forskellige analysemetoder til koncentrationsbestemmelse af Rivaroxaban, hvor specielt to analysemetoder har vist sig anvendelige. Den ene analysemetode er massespektrometri kombineret med væskechromatografi, en analysemetode, som er anerkendt for sin høje sensitivitet og specificitet (10). Den anden analysemetode er kromogene assays til måling af direkte faktor Xa-hæmning (9,11).

## Projektet

På Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet er der opsat et kromogent assay til måling af direkte faktor Xa-hæmmere (Biophen DiXaI) på analyseapparatet ACL TOP. Derudover er afdelingen også i besiddelse af massespektrometrisk udstyr, som benytter sig af væskechromatografi i form af Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

For at undersøge afdelingens muligheder for at måle kvantitative koncentrationer af Rivaroxaban i patientblod blev i efteråret 2014 udført et bachelorprojekt med følgende formål:

1. At etablere en analysemetode til bestemmelse af Rivaroxaban-koncentrationer i plasma på LC-MS/MS samt at undersøge denne analysemetodes analytiske variation.
2. At udføre en metodesammenligning imellem Rivaroxaban-



**Af bioanalytiker //**  
**Amalie Jesting**  
**Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet**

Under vejledning af bioanalytikerunderviser Kathrine Overgaard Foss Jensen, Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet, og lektor, cand.scient. Henrik Hansen, Professionshøjskolen Metropol

Targetværdi (µg/L)	90	300	600	900
Serie 1 N	20	20	20	20
Middel (µg/L)	103,8	306,8	589,9	872,5
SD (µg/L)	5,4	14,4	41,9	51,5
CV (%)	5,2	4,7	7,1	5,9
Bias (µg/L)	13,8	6,8	-10,1	-27,5
Bias (%)	15,4	2,3	-1,7	-3,1
Genfindning (%)	115,4	102,3	98,3	96,9

**Figur 1** viser antal målinger (N), middelværdi, standardafvigelse (SD), variationskoefficient (CV) i procent, bias, bias i procent og genfindning i procent for hvert kontrolniveau målt over 4 analyseserier.

analysemetoden på LC-MS/MS og Biophen DiXaI-analysemetoden på ACL TOP.

Formålet med projektet var ikke, at den ene analysemetode skulle erstatte den anden. Målet var at give et billede på analysemetodernes evner til at give et troværdigt svar på patienternes koncentration af Rivaroxaban i blodet.

### Rivaroxaban-bestemmelse på LC-MS/MS

På baggrund af molekylers masse bestemmer et LC-MS/MS-apparat mængden af et givet molekyle i fx en blodprøve. Analysemetoden indebærer flere selektive trin, der giver en høj analytisk specificitet.

Første del af projektet gik ud på at tilpasse indstillingerne på LC-MS/MS for at give de bedst mulige resultater. Her undersøgte ligeledes for eventuel matrixeffekt og afsmitning. Afdelingen har behov for at kunne måle høje Rivaroxaban-koncentrationer hos patienter mistænkt for en overdosering. Derfor blev det valgt at fremstille kalibratorer med en øvre værdi på 1000 µg/L, hvilket er ca. dobbelt så højt som den øverste terapeutiske grænse (12). Derudover valgtes kalibratorer i koncentrationer 0, 50, 100, 300 og 500 µg/L. Disse kalibratorer blev fremstillet ved at tilsætte Rivaroxaban i forskellige koncentrationer til en pool af blankt plasma.

Derefter blev analysemetodens korrekthed og præcision undersøgt ved gentagne målinger på kontrolmateriale i fire niveauer. I alt blev de fire kontrolprøver hver analyseret 20 gange over fire analyseserier. To af kontrolprøverne var fra producenten HYPHEN BioMed med koncentrationer på 90 og 300 µg/L. De sidste to kontrolprøver blev fremstillet på samme måde som kalibratorerne med koncentrationer på 600 og 900 µg/L.

Analysemetodens korrekthed blev vurderet ud fra genfindingsforsøg, som bør give et resultat imellem 80 og 120 %. Og bias og bias i procent, som viser forskellen mellem middelværdien for en række målinger på samme prøve og prøvens vedtagne sande værdi. Analysemetodens præcision vurderes ud fra målingernes middelværdi, standardafvigelse og variationskoefficient.

Resultaterne for de 20 målinger på de fire niveauer af kontrolmateriale er vist i figur 1. Her ses, at analysemetoden har en acceptabel korrekthed med en genfindning mellem 96,9 og 115,4 %. Resultaterne viser ligeledes acceptabel præcision, når resultaterne sammenholdes med acceptgrænser fra lignende analysemetoder på LC-MS/MS samt acceptgrænser, som benyttes i en artikel, som beskæftiger sig med en lignende problemstilling (10).

Derudover blev der ikke observeret afsmitning imellem prø-

verne, eller at matrix fra den blanke plasmapool påvirker bestemmelse af Rivaroxaban-koncentrationer ved brug af LC-MS/MS-analysemetoden. Den første del af projektet viste dermed, at det er muligt at benytte afdelingens LC-MS/MS-udstyr til at måle Rivaroxaban i plasma.

### Metodesammenligning

Da det endelige analyseopsæt på LC-MS/MS var fundet og afprøvet, begyndtes metodesammenligningen imellem analysemetoden på LC-MS/MS og Biophen DiXaI-analysemetoden.

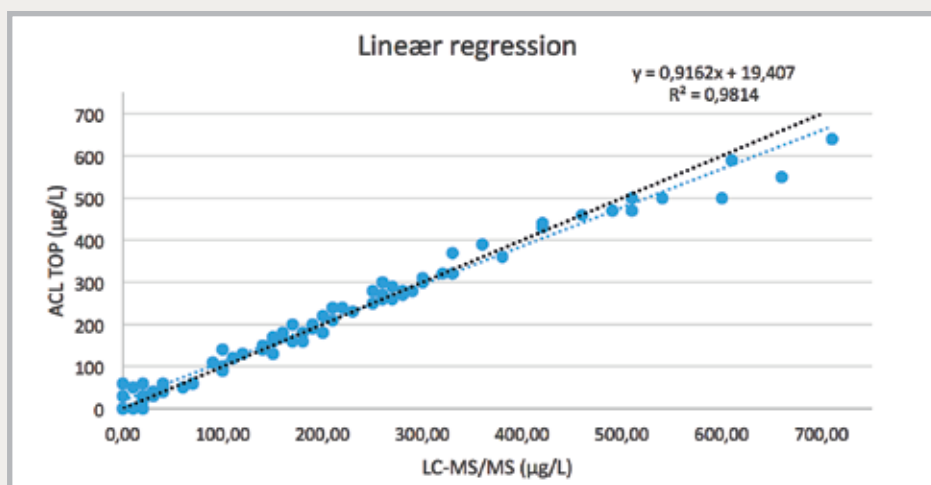
Biophen DiXaI-analysemetoden adskiller sig fra LC-MS/MS ved ikke at måle på selve stoffet Rivaroxaban, men i stedet at bestemme den overskydende mængde af koagulationsfaktor Xa i prøven. Dette resultat omregnes ved hjælp af en kalibreringskurve til koncentrationen af Rivaroxaban i den pågældende prøve. En anden forskel er, at Biophen DiXaI-analysemetoden kalibreres op til ca. 500 µg/L, altså halvdelen af, hvad analysemetoden på LC-MS/MS kalibreres til.

Til metodesammenligningen mellem Biophen DiXaI-analysemetoden på ACL TOP og analysemetoden til bestemmelse af Rivaroxaban-koncentrationer på LC-MS/MS blev sammenholdt resultater fra 84 patienter i behandling med Rivaroxaban. Til at vurdere sammenhæng og overensstemmelse mellem de to analysemetoder benyttes lineær regression og Bland-Altman plot, som er vist i figur 2-5.

Uoverensstemmelsen mellem analysemetodernes måleområde bedømmes til at give en vis usikkerhed på Rivaroxaban-koncentrationerne, som giver over 500 µg/L målt med Biophen DiXaI-analysemetoden. Derfor vises lineær regression og Bland-Altman plot i to udgaver. En, hvor alle 84 patientprøver er vist, og en, hvor patientprøver med Rivaroxaban-koncentrationer under 500 µg/L er vist.

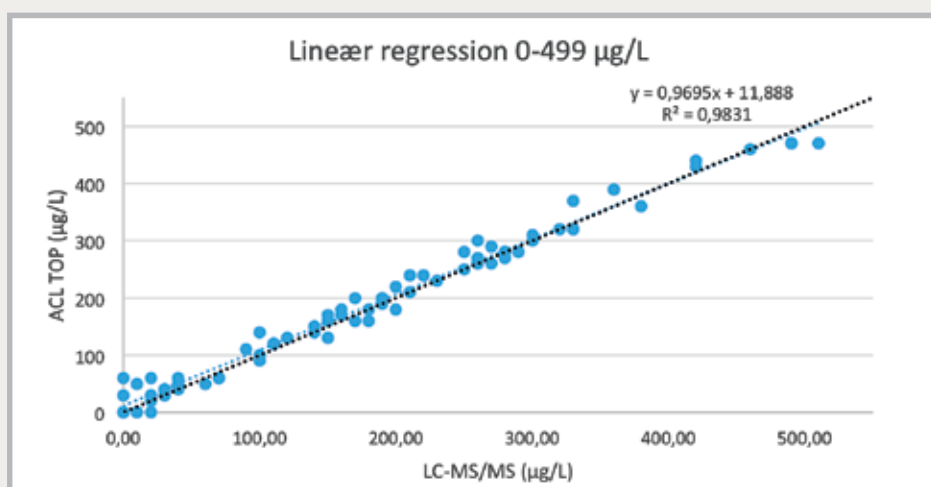
Ved at vurdere de to grafer med lineær regression ses, at der er lineær sammenhæng imellem de to analysemetoder; dog ses også, at usikkerheden på de høje værdier har en betydning for den lineære sammenhæng imellem målingerne af Rivaroxaban-koncentrationer målt med den nye analysemetode på LC-MS/MS og med Biophen DiXaI-analysemetoden.

For at kunne vurdere overensstemmelsen mellem analysemetoderne til Rivaroxaban-koncentrationsbestemmelse på LC-MS/MS og Biophen DiXaI-analysemetoden på ACL TOP er på figur 4 og 5 vist Bland-Altman plot, som viser differencerne imellem de to analysemetoder. Den grå stiplede linje viser, at der er en gennemsnitsdifference på + 1,79 µg/L for alle prøverne og + 6,41 µg/L for prøverne med Rivaroxaban-koncentration under 499 µg/L. Ud fra disse to gennemsnitsdifferencer ses, hvilken betydning usikkerheden for målingerne på de »



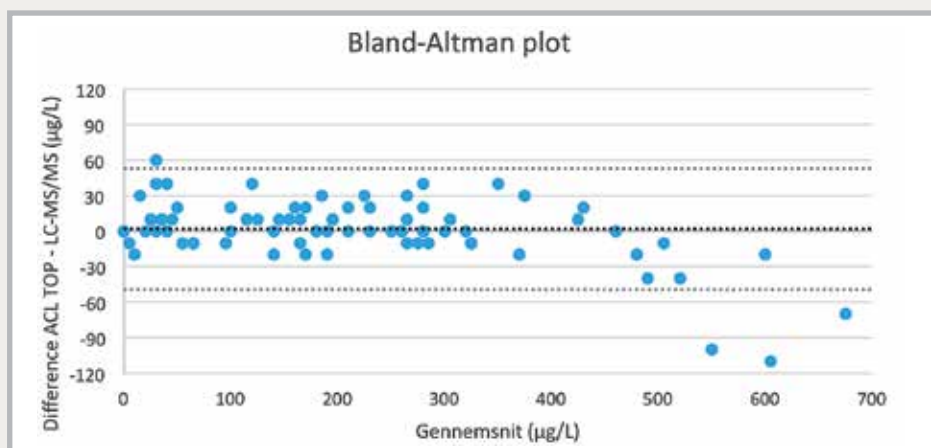
**Figur 2**

viser lineær regression mellem målinger af Rivaroxaban-koncentrationer på LC-MS/MS og ACL TOP. Den blå stiplede linje er regressionslinjen, og korrelationskoefficienten  $R^2$  er beregnet. Den sorte stiplede linje er identitetslinjen.



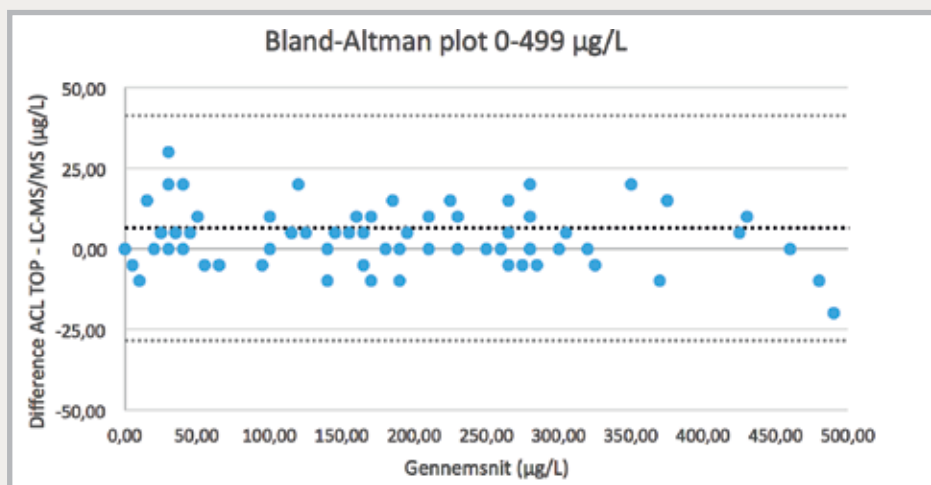
**Figur 3**

viser lineær regression mellem målinger af Rivaroxaban koncentrationer på LC-MS/MS og ACL TOP i intervallet 0-499 µg/L. Den blå stiplede linje er regressionslinjen og korrelationskoefficienten  $R^2$  er beregnet. Den sorte stiplede linje er identitetslinjen.



**Figur 4**

viser Bland-Altman plot, som på x-aksen viser gennemsnitsværdierne mellem målinger af Rivaroxaban-koncentrationer på ACL Top og LC-MS/MS, på y-aksen vises differencen mellem samme to metoder. Den grå stiplede linje viser gennemsnittet af differencerne på +1,79 µg/L. De to grå stiplede linjer viser 95 %-grænser for overensstemmelse imellem analysemetoderne (-49,32 – 52,90 µg/L).



**Figur 5**

viser Bland-Altman plot, som på x-aksen viser gennemsnitsværdierne mellem målinger af Rivaroxaban-koncentrationer på ACL Top og LC-MS/MS, på y-aksen vises differencen mellem samme to metoder i intervallet 0-499 µg/L. Den grå stiplede linje viser gennemsnittet af differencerne på +6,41 µg/L. De to grå stiplede linjer viser 95 %-grænser for overensstemmelse imellem analysemetoderne (-28,48 – 41,30 µg/L).



## At dække et behov, der ikke er der. Eller?

Af professor, overlæge, dr.med. //

Jens Peter Gøtze

Klinisk Biokemisk Afdeling, Rigshospitalet

I aktuelle udgave af dbio præsenterer bioanalytiker Amalie Jesting præliminære data for en massespektrometrisk baseret metode til molær kvantitering af et forholdsvis nyt blodfortyndende lægemiddel (Rivaroxaban) i patientblod. Blodfortyndende behandling har tidligere været en ret ensporet affære med warfariner (Marevan eller Marcomar), hvor effekten af disse vitamin-K-antagoniserende droger monitoreres biokemisk med bestemmelse af INR. Men lægemidler, der direkte hæmmer enkelte koagulationsfaktorer, har vundet kraftigt indpas i den kliniske hverdag, ikke mindst fordi de kan gives i fast dosis og uden løbende biokemisk monitorering.

Men virkeligheden har lært os, at der alligevel er et behov for at monitorere koncentrationen af lægemiddel i patientblod. Flere situationer har budt sig til: Først og fremmest er der et behov for biokemisk analyse hos patienter i pågående behandling, hvor patienten begynder at bløde, for da kan der foreligge en forgiftningssituation, hvor behandlingen kan målrettes mod det udløsende lægemiddel. Det vil dog bedst kunne iværksættes ved kvantificering af lægemidlet i patientplasma – før som efter behandling. Behandlingen er dyr og vil kun have effekt i tilfælde af forgiftning med fx Rivaroxaban. En anden situation med behov for biokemisk monitorering er i tilfælde af blodproppdannelse samtidig med pågående behandling. Her er spørgsmålet primært, om plasmakoncentrationen ligger i terapeutisk niveau, eller om der foreligger meget lave koncentrationer, som udtryk for at patienten ikke har taget sin medicin. På Rigshospitalet har vi være involverede i patientforløb med både forgiftninger og med manglende indtagelse af den ordinerede medicin.

Amalies opgave indeholder flere perspektiver for fremtidens laboratorier. De fleste koagulationsanalyser i dag er baseret på såkaldte "clot assays", hvilket vil sige en samlet vurdering af koagulationskaskaden gennem in vitro-aktivering i reagensglas. Men ved anvendelse af LC-MS/MS metodologi kan kvantitative data opnås, hvilket på sigt vil kunne bidrage til bedre diagnostik i patienter, – ikke mindst i patienter med flere problemstillinger på samme tid (hyppigt). Amalies arbejde tyder også på, at de tilgængelige funktionelle analyser for de "nye" lægemidler måske ikke er egnede til vurdering af forgiftningssituationer, hvilket er et vigtigt fund, der skal følges op på.

Den aktuelle LC-MS/MS-analyse er et flot eksempel på samarbejdet mellem en klinisk biokemisk afdeling og en professionshøjskole (Metropol). Ved at tage udgangspunkt i et reelt behov i hverdagens kliniske biokemi kan opgaver med reelle problemstillinger sættes i værk og bidrage både til uddannelse og hverdagens behov. Derfor bør Amalies studievejledere, lektor Henrik Hansen (PH Metropol) og bioanalytikerunderviser Kathrine Overgaard Foss Jensen (Rigshospitalet) takkes for deres vilje og evne til at gennemføre opgaver med relevans for både uddannelse og virkelighedens behov. ■

høje værdier har. Gennemsnitsforskellen er tættere på 0 µg/L for alle prøverne, dog afsløres på Bland-Altman plottet, at de høje værdier ligger lavere og derfor trækker gennemsnittet for afvigelse ned. Når de høje værdier er udeladt i figur 5, ligger værdierne gennemsnitligt længere fra 0 µg/L, men værdierne fordeler sig jævnt igennem intervallet. Dette kommer ligeledes til udtryk ved 95 %-grænserne for overensstemmelse på -49,32 – 52,90 µg/L for alle prøverne og -28,48 – 41,30 for prøverne med Rivaroxaban-koncentrationer under 500 µg/L. Intervallet er smallere, når prøverne ≥ 500 µg/L er udeladt, og alle målinger ligger inden for 95 %-grænserne for overensstemmelse. Hvilket betyder, at overensstemmelsen i mellem de to analysemetoder er bedre for patientprøver med Rivaroxaban-koncentrationer <500 µg/L end for hele intervallet.

Metodesammenligningen afslører, at der er et problem, når Biophen DiXal-analysemetoden benyttes til at bestemme Rivaroxaban-koncentrationer over analysemetodens måleområde. Der ses også en tendens til at måle højere ved brug af Biophen DiXal-analysemetoden end ved brug af LC-MS/MS.

### Referenceinterval og måleområde

Som nævnt viser projektet, at der kan være et problem ved måling af Rivaroxaban-koncentrationer over 500 µg/L med Biophen DiXal-analysemetoden. Af de 84 patientprøver, som er analyseret i dette projekt, ligger 76 % ≤ 300 µg/L, og størstedelen ligger inden for måleområdet for Biophen DiXal. Patienternes sygehistorie, og hvornår de har taget deres medicin, er ikke oplyst. Hvis målingerne af Rivaroxaban-koncentrationer skal bruges ved mistanke om overdosering, er det dermed nødvendigt at kunne måle koncentrationer over 500 µg/L. Det er derfor vigtigt, at der bliver arbejdet videre med koncentrationsbestemmelserne af Rivaroxaban for at kunne tilbyde den bedst mulige monitorering af patienterne. ■

### Referencer:

- 1 Larsen, T.B. et al. Risiko for tromboemboli eller død efter afbrydelse af AK-behandling hos patienter med atrieflimren, Nyt Om Bivirkninger – nyhedsbrev fra Lægemiddelstyrelsen. Lokaliseret 13.6.14 på <http://laegemiddelstyrelsen.dk/-/media/6ED13B5D3BB045B7B024D2719F3E303C.ashx>
- 2 Borup, V. Biokemi, FADL.
- 3 Brandes, A. Behandling af atrieflimren. Månedstidsskriftet Rationel Farmakoterapi. 2008. Lokaliseret den 19. november 2014 tilgængelig på [http://www.irf.dk/dk/publikationer/rationel\\_farmakoterapi/maanedstidsskrift/2008/behandling\\_af\\_atrieflimren.htm](http://www.irf.dk/dk/publikationer/rationel_farmakoterapi/maanedstidsskrift/2008/behandling_af_atrieflimren.htm)
- 4 Lyngbye, J. (2010). Lyngbyes laboratoriemedicin (2. udgave). Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck.
- 5 Samama et al. Do new oral anticoagulants require laboratory monitoring? The clinician point of view. Thrombosis Research, august 2012.
- 6 Brødbæk, K., Gøtze, J.P. Fatal blødningskomplikation hos patient med akut nyresvigt behandlet med dabigatran. DKS Nytt 1:16-18, 2013.
- 7 Freyburger et al. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: Two observational studies in patients undergoing total hip or knee replacement. Thrombosis Research, januar 2011.
- 8 Asmis et al. Rivaroxaban: Quantification by anti-FXa assay and influence on coagulation test A study in 9 Swiss laboratories. Thrombosis Research, august 2011.
- 9 Douxfils et al. Comparison of calibrated chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban. Thrombosis and Haemostasis, juli 2013.
- 10 Rohde et al. Determination of rivaroxaban – a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor – in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, juli 2008.
- 11 Douxfils et al. Assessment of the impact of rivaroxaban on coagulation assays: Laboratory recommendation for monitoring of rivaroxaban and review of the literature. Thrombosis Research, 2012.
- 12 Peroral antikoagulansbehandling. Dansk Cardiologisk Selskab. Lokaliseret 4.8.15 på <http://nbv.cardio.dk/ak>