

STANOVENÍ PLASMATICKÝCH KONCENTRACÍ KYSELINY SALICYLOVÉ PŘI OVĚŘOVÁNÍ SPOLUPRÁCE PACIENTA V LÉČBĚ KYSELINOU ACETYLSALICYLOVOU

ŠTEFAN ALUŠÍK^{a,b}, VĚRA JEDLIČKOVÁ^a, ZOLTÁN PALUCH^a a MAGDALENA LEJSKOVÁ^{a,b}

^a I. interní klinika, Fakultní Thomayerova nemocnice, Vídeňská 800, 140 59 Praha 4, ^b Institut pro postgraduální vzdělávání ve zdravotnictví, Praha stefan.alusik@ftn.cz

Došlo: 14.8.09, přepracováno 14.10.09, přijato 25.1.10.

Klíčová slova: kyselina acetylsalicylová, kyselina salicylová, krevní plasma, compliance

Úvod

Malé dávky kyseliny acetylsalicylové (ASA) jsou nejčastější antiagregační léčbou používanou v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. U značné části nemocných je však antiagregační efekt kyseliny acetylsalicylové nedostatečný. Problematika rezistence na účinek kyseliny acetylsalicylové (ASA rezistence) je dnes široce diskutována^{1,2}. Jednou z příčin jejího nedostatečného efektu je i tzv. non-compliance* (nonadherence)³. Její rozpoznávání je obtížné a spolehlivá data v literatuře chybí. Kromě toho se literární údaje o non-compliance ke kyselině acetylsalicylové pohybují v širokém rozmezí od extrémně nízkých (0,4 %)⁴ až po nezvykle vysoké (42 %)⁵, podle složení souboru pacientů a použité metodiky. K nej přesnějším, ale také k nejnáročnějším metodám pro ověření compliance, patří stanovení koncentrace léčiv v biologických tekutinách, nejčastěji v krevní plasmě. Zajímala nás compliance v našem souboru starých, polymorbidních pacientů. Užívání kyseliny acetylsalicylové bylo ověřováno stanovením farmakokinetiky plasmatické koncentrace kyseliny salicylové, hlavního metabolitu kyseliny acetylsalicylové. Koncentrace kyseliny salicylové v plasmě⁶ za 4 hodiny po požití 100 mg čisté kyseliny acetylsalicylové dosahovala 2,5 µg ml⁻¹, po 6 hodinách kolem 1 µg ml⁻¹ a po 8 hodinách kolem 0,7 µg ml⁻¹. Pro porovnání⁷ průměrná hodnota kyseliny salicylové v séru u jedinců neužívajících kyselinu acetylsalicylovou byla 9,7 ng ml⁻¹.

Experimentální část

Soubor pacientů a metody

Soubor vyšetřených tvořilo 97 pacientů ambulantně sledovaných, kteří dlouhodobě (déle než 6 měsíců) z důvodů sekundární prevence měli předepisováno 100 mg kyseliny acetylsalicylové denně (Anopyrin, Zentiva, Česká republika). Všichni pacienti potvrdili, že předepsané léčivo užívají pravidelně. Kontrolní skupinu tvořilo 33 pacientů neužívajících Anopyrin, ani jiné léky obsahující kyselinu acetylsalicylovou. Žádný z pacientů nebyl vegetarián. Obě skupiny byly podrobně klinicky a laboratorně vyšetřeny podle protokolu a jejich charakteristika je uvedena v tab. I. Ze studie byli vyloučeni pacienti s akutním onemocněním, poruchou funkce jater nebo ledvin, chronickou respirační insuficiencí, nádorovým onemocněním. Studie byla povolena místní etickou komisí.

K ověření, zda pacienti užívají kyselinu acetylsalicylovou, byla u všech stanovena plasmatická koncentrace kyseliny salicylové, hlavního metabolitu kyseliny acetylsalicylové.

Použité přístroje

Stanovení probíhalo na HPLC chromatografu s fluorescenční detekcí v této sestavě: automatický dávkovač

Tabulka I
Charakteristika pacientů léčených kyselinou acetylsalicylovou a kontrolní skupiny

Charakteristika	Léčená skupina <i>n</i> = 97	Kontrolní skupina <i>n</i> = 33
Věk, roky	67,5 ± 10,6	66 ± 10,1
Ženy, <i>n</i> (%)	46 (42,6)	15 (45,5)
BMI, kg m ⁻² ^a	26,9 ± 4,6	28,0 ± 4,5
Leukocyty, 10 ⁹ dm ⁻³	6,8 ± 1,5	7,0 ± 1,4
Erytrocyty, 10 ⁹ dm ⁻³	4,5 ± 0,4	4,5 ± 0,5
Hemoglobin, 10 ⁹ dm ⁻³	142 ± 13,8	143 ± 12,8
Trombocyty, 10 ⁹ dm ⁻³	222 ± 42,3	213 ± 41,6
Glykémie, mmol dm ⁻³	5,9 ± 1,5	5,7 ± 1,3
Celkový cholesterol, mmol dm ⁻³	4,5 ± 0,9	4,9 ± 1,5
Kreatinin, µmol dm ⁻³	89,9 ± 16,7	87,3 ± 17,6
C-reaktivní protein, mg dm ⁻³	6,6 ± 5,4	5,3 ± 3

^a BMI = Body Mass Index = hmotnost (kg) / [výška (m)]²

* Compliance (med.): dodržování předepsaného léčebného režimu. Termín non-compliance se v medicíně používá zejména pro neužívání předepsaných léčiv pacientem.

vač vzorků Shimadzu Sil-Advp, pumpa Shimadzu LC-10Advp, odplynovač Degasser DGU-14A a fluorescenční detektor typu RF-10AXL (Shimadzu, Japonsko). Sběr dat a vyhodnocení výsledků bylo provedeno počítačovým programem CLASS VP verze 5.0, (Shimadzu, Japonsko).

Chemikálie, standardy, roztoky

K přípravě mobilní fáze A byl použit acetonitril (ACN) pro kapalinovou chromatografii (Merck, Německo), k přípravě mobilní fáze B 0,033 M roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Německo) a 85% H_3PO_4 (Merck, Německo) v poměru 25:75 (pH 2,5). K přípravě vzorků byla použita deionizovaná voda Milli-Q kvality. K přípravě standardního roztoku byla použita salicylová kyselina čistoty 99,9 % (Fluka Chemie, Švýcarsko).

Příprava vzorků a chromatografie

Krevní vzorky od pacientů byly odebírány v intervalu od 1 do 4 hodin po udávaném užití kyseliny acetylsalicylové do odběrových zkumavek s obsahem heparinu. Poté byly zkumavky centrifugovány 10 min při 3000 otáčkách za minutu. Po odsátí plasmy byly její vzorky zmrazeny na -28°C a analyzovány do 14 dnů.

Do 1 ml plasmy bylo přidáno 2 ml zředěné H_3PO_4 (1 ml 85% H_3PO_4 v 500 ml vody). Takto upravený vzorek byl extrahován v SPE (Solid Phase Extraction) kolonkách OASIS-HLB (Waters GmbH, ČR). Eluce vzorku do HPLC

vialek byla provedena 1 ml methanolu. Takto připravený vzorek byl analyzován HPLC. Výsledky byly získány z pětibodové kalibrační křivky ($y = 1,4807 x^2 + 13089 x$; $R^2 = 1$). RSD se pohybovalo od 0,1 % do 2,2 %.

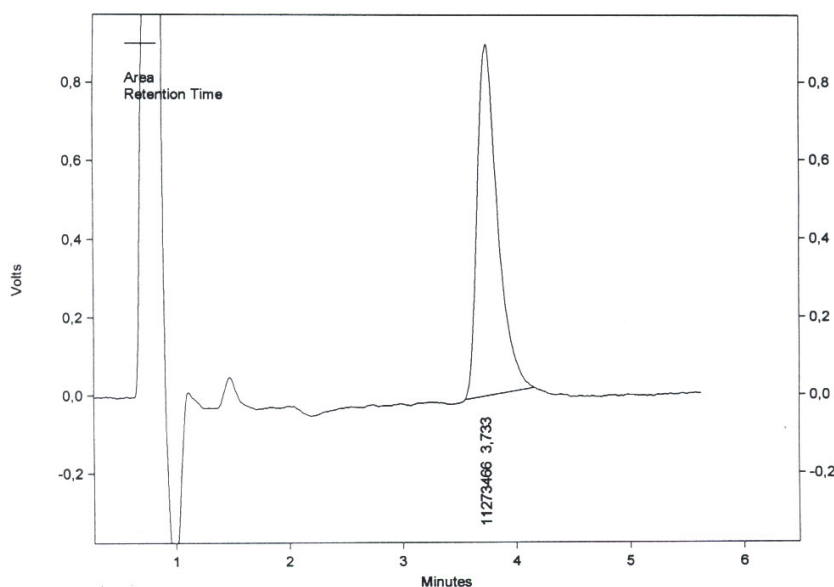
K vlastní analýze byla použita chromatografická kolona typu LiChrospher 60 RP-select-B, $125 \times 4 \text{ mm}$ s částicemi $5 \mu\text{m}$ (Merck, Německo). Teplota kolony byla 35°C , nastříkovaný objem vzorku byl $15 \mu\text{l}$, průtok mobilní fáze $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ a doba analýzy 4,5 min. Parametry fluorescenčního detektoru: Ex 300 nm, EM 500 nm. Typický chromatogram je uveden na obr. 1.

Koncentrace kyseliny salicylové v plasmě jsou uváděny jako aritmetické průměry $\pm \text{SD}$ i jako mediány pro jednotlivé časové intervaly po užití 100 mg kyseliny acetylsalicylové u léčených pacientů i v kontrolní skupině.

Výsledky

V kontrolní skupině pacientů neužívajících kyselinu acetylsalicylovou se koncentrace kyseliny salicylové pohybovaly v rozmezí 2,2 až $77,3 \text{ ng ml}^{-1}$, s průměrem $30,8 \pm 18,8 \text{ ng ml}^{-1}$ a mediánem $26,6 \text{ ng ml}^{-1}$.

Z 97 léčených pacientů, se koncentrace kyseliny salicylové pohybovaly u 19 (19,6 % všech vyšetřených) v rozmezí od 3,5 do $59,3 \text{ ng ml}^{-1}$ (průměr $30,7 \pm 16,0$; medián $29,9 \text{ ng ml}^{-1}$), tj. byly identické jako u osob z kontrolní skupiny neléčené kyselinou acetylsalicylovou.



Obr. 1. Chromatografický záznam analýzy plasmy s kyselinou salicylovou ($0,8 \text{ mg l}^{-1}$) metodou HPLC s fluorescenční detekcí (Ex 300, Em 500 nm). Kolona C_{18} LiChrospher 60RP Select B $5 \mu\text{m}$, ($125 \times 4 \text{ mm}$); mobilní fáze: acetonitril: fosfátový pufr: 25:75; pH 2,5; průtok mobilní fáze $1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Podrobnosti v textu – Metodika

Tabulka II

Plasmatické koncentrace kyseliny salicylové po údajném užití léku, v jednotlivých časových intervalech po hodinách; u pacientů s předepisovanou kyselinou acetylsalicylovou

Čas po podání h	<i>n</i>	Medián [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Průměr \pm SD [$\mu\text{g ml}^{-1}$]
<i>Pacienti užívající kyselinu acetylsalicylovou</i>			
1,0–1,9	26	4,31	4,68 \pm 1,91
2,0–2,9	27	2,50	2,49 \pm 0,66
3,0–4,0	25	1,38	1,54 \pm 0,59
1,0–4,0	78	2,57	2,92 \pm 1,78
<i>Pacienti neužívající lék (non-compliance)</i>			
1,0–4,0	19	0,030	0,031 \pm 0,016

Proto jsme tuto skupinu 19 pacientů považovali za non-compliantní, tj. neužívající předepsanou léčbu. U dalších 78 léčených pacientů byla průměrná koncentrace kyseliny salicylové ve sledovaném období $2,9 \pm 1,8 \mu\text{g ml}^{-1}$, medián $2,6 \mu\text{g ml}^{-1}$. Koncentrace v jednotlivých časových intervalech jsou uvedeny v tab. II a graficky znázorněny na obr. 2.

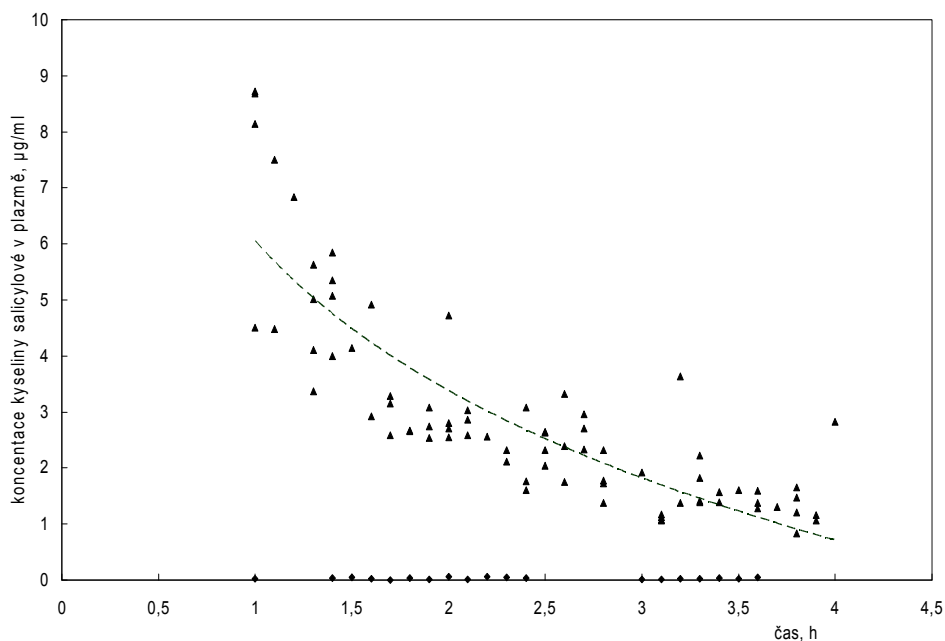
Diskuse

Pro ověření užívání kyseliny acetylsalicylové jsme použili metodiku stanovení plasmatické koncentrace kyseliny

liny salicylové, jejího hlavního metabolitu. Nevýhodou je, že kyselina salicylová a salicyláty se v nízkých koncentracích nacházejí i u jedinců, kteří kyselinu acetylsalicylovou neužívají⁸. Do organismu se tyto látky dostávají hlavně potravou (zejména ovoce a zelenina), nebo vstřebáváním pokožkou, protože salicyláty jsou součástí různých kosmetických přípravků, šamponů a lokálních léčiv. Zvýšené sérové koncentrace kyseliny salicylové byly zjištěny u vegetariánů⁷. Přes značné individuální rozdíly však medián koncentrace kyseliny salicylové u vegetariánů byl přibližně 100× nižší než ve skupině pacientů užívajících 75 mg kyseliny acetylsalicylové denně. Koncentrace kyseliny salicylové v plasmě v naší kontrolní skupině odpovídaly nálezům Blacklocka⁷ a byly více než stonásobně nižší v porovnání s maximálními koncentracemi u pacientů, kteří dlouhodobě užívali 100 mg kyseliny acetylsalicylové denně.

Literárních údajů o farmakokinetice malých dávek kyseliny acetylsalicylové je poskrovnu, ale i tak se všechny shodují na značných individuálních rozdílech v koncentracích kyseliny salicylové, podobně jako v našem souboru, a to bez ohledu na to, zda šlo o jednoduché přípravky, nebo o přípravky se zpomaleným uvolňováním kyseliny acetylsalicylové^{9–11}.

V literatuře^{12–14} se non-compliance u antiagregační léčby nejčastěji pohybuje kolem 10 %. V našem souboru byla non-compliance vyšší, podobně jako v souboru Cottera¹⁵, kde dosahovala 16 %. I horní hranice non-compliance v našem souboru dosahující téměř 20 % je však menší při porovnání s údaji z klinických studií¹⁶. Ve studii BRAVO



Obr. 2. Farmakokinetika koncentrace kyseliny salicylové v krevní plasmě po podání kyseliny acetylsalicylové. Závislost koncentrace kyseliny salicylové na časovém intervalu od údajného užití léčiva. \blacklozenge non-compliance: pacienti neužívající předepsanou kyselinu acetylsalicylovou, \blacktriangle compliance: pacienti užívající předepsanou kyselinu acetylsalicylovou

byla předčasně ukončena léčba u 22,9 % pacientů zařazených ve skupině s podáváním pouze kyseliny acetylsalicylové a ve skupině pacientů užívajících kyselinu acetylsalicylovou s lotrafibanem dokonce u 29,3 % zařazených¹⁷. Vysazení léčby kyselinou acetylsalicylovou přitom má za následek výrazné zhoršení prognózy u pacientů se středním a vysokým rizikem při diagnóze ischemické choroby srdeční¹⁸.

Kromě obvyklých příčin non-compliance³ se v našem souboru mohl uplatňovat zejména vyšší věk pacientů, polymorbidita a polymedikace. Důležitý je i fakt, že vysazení kyseliny acetylsalicylové nevede k bezprostředním subjektivním projevům zhoršení stavu, jako je tomu např. při vysazení furosemidu u kardiaka. Věk nad 65 let a zvýšená dávka kyseliny acetylsalicylové (300 mg vs. 30 mg) byly nezávislé rizikové faktory pro non-compliance k této léčbě¹⁹. Důležitým faktorem je i dlouhodobost léčby. Většina pacientů v našem souboru užívala kyselinu acetylsalicylovou déle než 1 rok. S délkou terapie se non-compliance zvyšuje. V souboru nemocných s ischemickou chorobou srdeční²⁰ spontánně přerušilo léčbu 18 % pacientů do 1 roku. Výsledky epidemiologických studií ukazují, že do 1 roku od začátku léčby ukončí léčbu 20–30 % pacientů s chronickým onemocněním^{21,22}. Odhaduje se, že v USA a ve vyspělých zemích dlouhodobě pokračuje v zavedené léčbě pouze zhruba polovina pacientů. Řada studií tak dokazuje, že ověřování spolupráce pacientů při léčbě kyselinou acetylsalicylovou by v rutinní klinické praxi mělo patřit ke standardním postupům. Popsaná metoda je nenáročná, rychlá a dostatečně citlivá.

Závěr

Stanovení plasmatických koncentrací kyseliny salicylové, jak zde bylo popsáno, se jeví jako metoda vhodná k ověření compliance léčených pacientů. Jak ukázaly výsledky, téměř 20 % našich pacientů předepisovanou léčbu neužívalo. Při diskusi o rezistenci k léčbě kyselinou acetylsalicylovou je nutné problematice non-compliance věnovat daleko více pozornosti. Ověření koncentrací kyseliny salicylové v plasmě je na místě při jakýchkoliv pochybnostech o užívané léčbě.

LITERATURA

1. Patrono C., García Rodríguez L. A., Landolfi R., Baigent C.: *N. Engl. J. Med.* 353, 2373 (2005).
2. Sanderson S., Emery J., Baglin T., Kimmonth A. L.: *Ann. Intern. Med.* 142, 370 (2005).
3. Rosner F.: *Mt. Sinai J. Med.* 73, 553 (2006).
4. Tantry U. S., Bliden K. P., Gurbel P. A.: *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1705 (2005).
5. Rieckmann N., Kronish I. M., Haas D., Gerin W., Chaplin W., Burg M. M., Vorchheimer D., Davidson K. W.: *Am. Heart. J.* 152, 922 (2006).
6. *Aspirin enteric coated antiplatelet therapy with acetylsalicylic acid*. Bayer AG, Leverkusen 1999.

7. Blacklock C. J., Lawrence J. R., Wiles D., Malcolm E. A., Gibson I. H., Kelly C. J., Paterson J. R.: *J. Clin. Pathol.* 54, 553 (2001).
8. Paterson J. R., Blacklock C., Campbell G., Wiles D., Lawrence J. R.: *Clin. Pathol.* 51, 502 (1998).
9. Benedek I. H., Joshi A. S., Pieniaszek H. J., King S. Y. P., Kornhauser D. M.: *J. Clin. Pharmacol.* 35, 1181 (1995).
10. Ruffin M. T., Krishnan K., Rock C. L., Normolle D., Vaerten M. A., Peters-Golden M., Crowell J., Kelloff G., Boland C. R., Brenner D. E.: *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 11521 (1997).
11. Cerletti C., Dell'Elba G., Manarini S., Pecce R., Di Castelnuovo A., Scorpiglione N., Feliziani V., DeGaetano G.: *Clin. Pharmacokinet.* 42, 1059 (2003).
12. Komiya T., Kudo M., Urabe T., Mizuno Y.: *Stroke* 25, 2337 (1994).
13. Tarjan J., Salamon A., Jager R., Poór F., Barczy V., Dinnyés J., Hamvas J., Kinczel A., Pál A., Blaskó G.: *Orv. Hetil.* 140, 2339 (1999).
14. Serebruany V. L., Hanley D. F. jr., Atar D., Ferguson J. J.: *Stroke* 35e, 143 (2004).
15. Cotter G., Shemesh E., Zehavi M., Dinur I., Rudnick A., Milo O., Vered Z., Krakover R., Kaluski E., Kornberg A.: *Am. Heart J.* 147, 293 (2004).
16. Serebruany V. L., Oshrine B. R., Malinin A. I., Atar D., Michelson A. D., Ferguson J. J.: *Am. Heart J.* 150, 882 (2005).
17. Topol E., Easton D., Harrington R. A., Amarenco P., Calif R. M., Graffagnino C.: *Circulation* 108, 399 (2003).
18. Biondi-Zoccai G. G. L., Lotrionte M., Agostoni P., Abbate A., Fusaro M., Burzotta F., Testa L., Sheiban I., Sangiorgi G.: *Eur. Heart J.* 27, 2667 (2006).
19. De Schryver E. L., van Gijn J., Kappelle L. J., Koudstttaal P. J., Algra A.: *J. Neurol.* 252, 1316, (2005).
20. Kulkarni S. P., Alexander K. P., Lytle B., Heiss G., Peterson E. D.: *Am. Heart J.* 151, 185 (2006).
21. Papaioannou A., Kennedy C., Dolovich L., Lau E., Adachi J.: *Drugs Aging* 24, 37 (2007).
22. Barron T., Connolly R., Bennet K., Feely J., Kennedy J.: *Cancer* 109, 832 (2007).

Š. Alušík, V. Jedličková, Z. Paluch, and M. Lejsková (*Department of Internal Medicine I., Thomayer University Hospital and Institute for Postgraduate Medical Education, Prague*): **Determination of Plasma Salicylic Acid Levels to Assess Compliance to Acetylsalicylic Acid Therapy**

The compliance of patients receiving long-term acetylsalicylic acid therapy was tested by determining plasma levels of salicylic acid by HPLC. The same determination was performed in a control group of untreated patients. Almost 20 % of the examined patients were not using the prescribed therapy.