

Aus der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Böhm

# **Adhärenzmessung antihypertensiver Medikamente durch hochauflösende Massenspektrometrie im Speichel**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2019

vorgelegt von  
Michael Kunz  
geboren am 24. Mai 1995  
in Hanau

Tag des Kolloquiums: 09.03.2021  
Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Felix Mahfoud  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Hannig

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Zusammenfassung / Summary</b> .....	<b>5</b>
1.1 Zusammenfassung .....	5
1.2 Summary.....	6
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
2.1 Arterielle Hypertonie.....	8
2.2 Adhärenz.....	16
2.3 Fragestellung .....	21
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>36</b>
5.1 Limitationen .....	41
5.2 Fazit .....	43
5.3 Perspektive .....	45
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>47</b>
<b>7 Danksagung</b> .....	<b>58</b>
<b>8 Publikationen</b> .....	<b>59</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>10 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>61</b>
<b>11 Lebenslauf</b> .....	<b>62</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABP	Langzeitblutdruck (engl. ambulatory blood pressure)
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (engl. angiotensin-converting enzyme)
ARB	Angiotensin-1-Rezeptorblocker
BB	Betablocker
BMI	Body-Maß-Index
CCB	Kalziumkanal-Blocker (engl. calcium channel blocker)
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (engl. estimated glomerular filtration rate)
HBP	häuslicher Blutdruck (engl. home blood pressure)
HCT	Hydrochlorothiazid (Diuretikum)
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Pumpfunktion (engl. heart failure with preserved ejection fraction)
HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Pumpfunktion (engl. heart failure with reduced ejection fraction)
LC-HRMS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie (engl. liquid-chromatography high resolution mass spectrometry)
MRA	Mineralocorticoid Rezeptor Antagonist
OBP	Praxisblutdruck (engl. office blood pressure)
RAS	Renin-Angiotensin-System
SPC	Kombinationspräparate/Fixkombination (engl. single pill combination)

# 1 Zusammenfassung / Summary

## 1.1 Zusammenfassung

### *Hintergrund*

Eine Blutdruckreduktion kann bei Patienten mit arterieller Hypertonie das Risiko für Schlaganfälle, Herzinsuffizienz und koronare Herzkrankheit signifikant senken. Viele Patienten erreichen jedoch keine leitliniengerechte Blutdruckkontrolle. Eine häufige Ursache der unkontrollierten Hypertonie ist die schlechte Einnahmetreue der antihypertensiven Medikamente. Eine mangelnde Einnahmetreue ist mit kardiovaskulären Ereignissen und erhöhter Sterblichkeit assoziiert. Die toxikologische Untersuchung des Urins und des Blutplasmas mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-HRMS/MS) zum Nachweis antihypertensiver Medikamente gilt als Goldstandard in der Adhärenzmessung. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob 1.) der Nachweis von antihypertensiven Medikamenten oder deren Metaboliten im Speichel von Patienten mit Hypertonie möglich ist und 2.) die Ergebnisse der Speichelproben mit der Adhärenzmessung in Blutplasma und Urin vergleichbar sind.

### *Methoden*

Mittels LC-HRMS/MS wurden Speichel, Urin und Blutplasma von Patienten mit arterieller Hypertonie auf das Vorhandensein blutdrucksenkender Wirkstoffe oder deren Metaboliten untersucht.

### *Ergebnisse*

Insgesamt wurde Urin, Blutplasma und Speichel von 56 Patienten analysiert. Im Urin konnten mittels LC-HRMS/MS mehr Wirkstoffe oder deren Metaboliten nachgewiesen werden als im Blutplasma oder im Speichel (181 vs. 119 vs. 88,  $p=0,001$ ).

ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptorblocker und Diuretika konnten seltener im Speichel nachgewiesen werden als im Urin oder Plasma. Dagegen bestand kein statistischer Unterschied zwischen Speichel und Urin beziehungsweise zwischen Speichel und Blutplasma was den Nachweis von Betablocker ( $p=1,000$  bzw.  $p=1,000$ ) und Kalziumkanal-Blocker ( $p=0,063$  bzw.  $p=0,727$ ) angeht.

59% der Patienten waren vollständig adhärent, das heißt es konnten alle verordneten Wirkstoffe im Urin nachgewiesen werden. 13% der Patienten waren nicht-adhärent (mindestens zwei verschriebene Wirkstoffe konnten im Urin nicht nachgewiesen werden) und 29% teilweise adhärent (ein Wirkstoff konnte im Urin nicht nachgewiesen werden). Bei adhärennten Patienten war im Vergleich zu nicht-adhärennten oder teilweise adhärennten Patienten die Anzahl der verschriebenen Wirkstoffe ( $p=0,001$ ) und der Einzeldosen ( $p=0,012$ ) niedriger. Außerdem hatten adhärennte Patienten einen niedrigeren systolischen ( $p=0,012$ ) und diastolischen ( $p=0,009$ ) 24h-Langzeitblutdruck als nicht- oder nur teilweise

adhärente Patienten. Die Adhärenz war weitgehend unabhängig von der Wahl der verordneten Wirkstoffe.

### *Schlussfolgerung*

Mittels LC-HRMS/MS können einige antihypertensive Medikamente im Speichel nachgewiesen werden. Gut nachzuweisen waren Medikamente ohne Säuregruppe (Betablocker, Kalziumkanal-Blocker), schlechter nachweisbar waren Präparate mit Säuregruppe (ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptorblocker und Diuretika). Sofern Patienten initial leitlinienkonform mit zwei antihypertensiven Wirkstoffen in Form einer Fixkombination (SPC= single pill combination) eingestellt sind, könnte der Nachweis einer Substanz ausreichen, um eine vollständige Adhärenz anzunehmen. Der Nachweis blutdrucksenkender Medikamente im Speichel stellt einen neuen Ansatz zur Untersuchung der medikamentösen Adhärenz dar, der im Vergleich zur Urin- und Blutprobengewinnung weniger aufwändig ist und in weiteren Studien untersucht werden sollte.

## **1.2 Summary**

### *Background*

Blood pressure reduction lowers the risk for cardiovascular events, including stroke, heart failure and coronary artery disease. However, blood pressure control rates remain unsatisfactorily low worldwide. A commonly found reason for uncontrolled hypertension is non-adherence to antihypertensive treatment. Non-adherence associates with cardiovascular events and increased mortality. The most accurate method for the assessment of adherence to antihypertensive drugs is toxicological analyses of plasma and urine with liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS/MS). The present thesis examines whether i) the detection of antihypertensive drugs or their metabolites in oral fluid is feasible and ii) the results are comparable to the adherence measurements in plasma and urine.

### *Methods*

Oral fluid, urine and plasma of patients with arterial hypertension was examined by toxicological analyses (LC-HRMS/MS) for the presence of antihypertensive agents or their metabolites.

### *Results*

The urine, plasma and oral fluid of 56 patients with hypertension was investigated. The LC-HRMS/MS identified more antihypertensive drugs in urine (n=181) compared with plasma (n= 119) and oral fluid (n=88, p=0.001).

ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers and diuretics had lower detection rates in oral fluid compared with plasma or urine. In contrast, LC-HRMS/MS analyses of oral fluid compared with urine

## Zusammenfassung / Summary

or plasma had similar detection rates for beta blockers ( $p=1.000/p=1.000$ ) and calcium channel blockers ( $p=0.063/p=0.727$ ).

59% of the patients were totally adherent and took all antihypertensive drugs as prescribed. 29% of the patients were classified as partially adherent (one drug was not identifiable in the urine) and 13% were completely non-adherent (at least two prescribed drugs were not detectable in urine). In comparison to non-adherent or partially adherent patients, adherent patients had less different antihypertensive drugs ( $p=0.001$ ) and a smaller number of daily doses ( $p=0.012$ ). Furthermore, adherent patients had a significantly lower systolic ( $p=0.012$ ) and diastolic ( $p=0.009$ ) 24h-ambulatory blood pressure compared with non-adherent or partially adherent patients. Adherence was largely independent of the prescribed antihypertensive drug classes.

### *Conclusion*

The detection of various antihypertensive drugs in oral fluid is feasible. Drugs without acidic components (such as beta blockers and calcium channel blockers) are better detectable in oral fluid when compared with weakly acid drugs, which can be poorly detected in oral fluid (ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers, and diuretics). In case patients are treated according to the current hypertension guidelines with a two-drug-combination in a single pill, the detection of only one drug may be sufficient to assume complete adherence. Assessment of adherence to antihypertensive medication in oral fluid represents an interesting, novel method, which is less demanding when compared with urine or plasma collection and should be investigated in future studies.

## 2 Einleitung

### 2.1 Arterielle Hypertonie

#### *Epidemiologie und Einteilung*

Die arterielle Hypertonie ist mit erhöhter kardiovaskulärer Morbidität und Sterblichkeit assoziiert [36]. Ungefähr 1,13 Milliarden Menschen hatten im Jahr 2015 eine arterielle Hypertonie, dabei scheinen Männer etwas häufiger betroffen zu sein (24,1%) als gleichaltrige Frauen (20,1%) [86]. Somit haben weltweit 30-45% der Erwachsenen einen Bluthochdruck [11,82], diese Prävalenz steigt mit dem Alter, denn >60% der über 60-jährigen sind betroffen [11]. Im Zeitraum von 1975 bis 2015 verdoppelte sich weltweit die Prävalenz [86]. Prognosen zufolge soll 2025 die Prävalenz auf 29,2% der Weltbevölkerung (1,56 Milliarden erwachsene Mensch) ansteigen [36]. Die hohe Prävalenz macht den Bluthochdruck zu einem der wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren [43,52].

Die Reduktion eines erhöhten Blutdrucks kann das Risiko für kardiovaskuläre Mortalität senken [20,70]. Die Therapie der arteriellen Hypertonie umfasst Lebensstil-Modifikationen für alle Patienten und eine medikamentöse Therapie für die meisten Patienten [82]. Trotz der guten Behandlungsmöglichkeiten bleibt eine adäquate Blutdruckeinstellung oft aus [11,20]. Die Gründe hierfür können verschieden sein, wie beispielsweise keine Diagnosestellung aufgrund fehlender Symptomatik, eine nicht ausreichende Dosierung der antihypertensiven Medikation, eine fehlende Kombinationstherapie, mangelnde Einnahmetreue oder das Vorliegen einer resistenten Hypertonie [11,46].

Die primäre oder essentielle Hypertonie, die mit ca. 90-95% den Hauptteil der Patienten betrifft [47], ist eine heterogene Erkrankung multifaktorieller Genese [47]. Dem gegenüber steht in 5-10% der Fälle die sekundäre Hypertonie [62]. Hier ist durch einen identifizierbaren Grund der arterielle Blutdruck erhöht [62]. Die häufigsten Ursachen für diese Bluthochdruckform sind: obstruktives Schlafapnoe-Syndrom, parenchymale Nierenerkrankung, Nierenarterienstenose, primärer Hyperaldosteronismus, Schilddrüsenerkrankung, Cushing-Syndrom, Phäochromozytom und Aortenisthmusstenose [62].

Ein chronisch erhöhter Blutdruck hat Auswirkungen auf verschiedene Organsysteme [82]. Dabei handelt es sich vor allem um hypertoniebedingte Endorganschäden am Herzen, den Blutgefäßen, den Nieren, den Augen und dem Gehirn. Der hohe Druck im arteriellen System verursacht eine chronische Steigerung der linksventrikulären Nachlast, die wiederum zu einer linksventrikulärer Hypertrophie und myokardialen Relaxationsstörung führen kann [82]. Durch die Druck- und Volumenbelastung des linken Vorhofes dilatiert dieser [82]. Dies kann mit einem erhöhten Risiko für supraventrikuläre Arrhythmien (v.a. Vorhofflimmern) assoziiert sein [82]. Außerdem haben Patienten mit Hypertonie ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Herzinsuffizienz, sowohl mit reduzierter Pumpfunktion (HFrEF) als

## Einleitung

auch mit erhaltener Pumpfunktion (HFpEF) [82]. Hypertonie ist ferner ein Risikofaktor für eine periphere arterielle Verschlusskrankheit und trägt zu deren Entstehung bei [24]. Neben dem Diabetes mellitus als häufigster Grund für eine chronische Niereninsuffizienz, reiht sich die arterielle Hypertonie als zweithäufigster Grund für diese Erkrankung ein [82]. Am Auge führt der Bluthochdruck durch eine Schädigung der kleinen Gefäße zu einer hypertensiven Retinopathie, die funduskopisch in der maximalen Ausprägung durch retinale Einblutungen, Mikroaneurysmen, harte Exsudate, Cotton-Wool-Spots und ein Papillenödem charakterisiert ist [31,82]. Das Vorliegen eines solchen Fundusbefunds ist ein Risikofaktor für die Mortalität [82], weswegen bei Patienten mit einer Hypertonie Grad zwei/drei oder bei Diabetikern eine Vorstellung beim Augenarzt empfohlen wird [82]. Vor allem durch Hypertonie-bedingte stumme Mikroinfarkte, Mikroblutungen (besonders in den Stammganglien) und resultierender Gehirnatrophie durch die Zerstörung/ Schädigung der kleinen Blutgefäße [75], erhöht der Bluthochdruck signifikant das Auftreten von Hirnschäden [75,82]. Die gefährlichsten Akutfolgen einer solcher Schädigung sind mögliche transitorische ischämische Attacken und Schlaganfälle, langfristig kann es zu einer kognitiver Einschränkung und einer vaskulären Demenz kommen [75,82].

Eine isoliert systolische Hypertonie und ein erhöhter Pulsdruck können Folge einer Versteifung großer Arterien sein, was zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen führen kann [42,82]. Des Weiteren begünstigt die isoliert systolische Hypertonie die Entstehung einer Carotisstenose [68], die ein Prädiktor für Schlaganfall und Herzinfarkt darstellt [82].

### *Definition und Diagnostik*

Zur Diagnostik einer arteriellen Hypertonie ist eine Blutdruckmessung im häuslichen Umfeld (HBPM= engl. home blood pressure measurement), in der Praxis (OBPM= engl. office blood pressure measurement) oder im Rahmen einer ambulanten 24h-Langzeitblutdruckmessung (ABPM= engl. ambulatory blood pressure measurement) möglich [82]. In Abhängigkeit der unterschiedlichen Messmethoden definieren die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) und die Europäische Gesellschaft für Hypertonie (ESH) unterschiedliche Grenzwerte in den gültigen Leitlinien (Tabelle 1) [82].

## Einleitung

*Tabelle 1: Grenzwerte arterielle Hypertonie je nach Messmethode*

<b>Messmethode</b>	<b>Systolischer Blutdruck (mmHg)</b>		<b>Diastolischer Blutdruck (mmHg)</b>
Praxisblutdruckmessung (OBPM)	≥140	und/oder	≥90
Häuslicher Blutdruck (HBP)	≥135	und/oder	≥85
Ambulante 24-h Langzeitblutdruckmessung (ABPM)			
• 24-h Mittelwert	≥130	und/oder	≥80
• Mittelwert Wachphase	≥135	und/oder	≥85
• Mittelwert Schlafphase	≥120	und/oder	≥70

Entsprechend der Höhe des vorliegenden Praxisblutdrucks, wird in verschiedene Grade der Hypertonie eingeteilt (Tabelle 2) [82].

*Tabelle 2: Klassifikation der arteriellen Hypertonie gemäß des Praxisblutdrucks*

<b>Kategorie</b>	<b>Systolischer Blutdruck (mmHg)</b>		<b>Diastolischer Blutdruck (mmHg)</b>
Optimal	<120	und	<80
Normal	120-129	und/oder	80-84
Hochnormal	130-139	und/oder	85-89
Hypertonie Grad 1	140-159	und/oder	90-99
Hypertonie Grad 2	160-179	und/oder	100-109
Hypertonie Grad 3	≥180	und/oder	≥110
Isolierte systolische Hypertonie	≥140	und	<90

Die Messung eines validen Praxisblutdrucks (OBP) ist ausschlaggebend für die Definition der arteriellen Hypertonie und sollte folglich nach einem festen Schema durchgeführt werden [82]. Der Patient sollte vor der Messung mindestens fünf Minuten in bequemer Position und ruhiger Umgebung sitzen [82]. Die passende Oberarmmanschette ist auf Herzhöhe anzulegen und der Arm sollte abgelegt und entspannt sein [82]. Anschließend sind drei Messungen mit ein- bis zweiminütiger Pause dazwischen durchzuführen. Eine zusätzliche Messung ist vonnöten, sofern die ersten beiden Messungen >10 mmHg auseinander liegen [82]. Der Praxisblutdruck berechnet sich aus dem Mittelwert der letzten beiden Messungen [82].

## Einleitung

Der häusliche Blutdruck (HBP) sollte morgens und abends in einem ruhigen Raum nach fünfminütigem Sitzen mit einem validierten Blutdruckmessgerät gemessen werden [82]. Je Messzeitpunkt sollen zwei Messungen im Abstand von ein bis zwei Minuten durchgeführt werden [82]. Folglich wird in der Praxis oder Klinik der Mittelwert aus allen Messungen, welche zu Hause durchgeführt wurden, berechnet [82]. Es müssen Messungen von mindestens drei Tagen vorliegen, diese sollten am besten sechs bis sieben Tage vor dem Arztbesuch entstanden sein [82].

Bei einer Langzeitblutdruckmessung (ABPM) wird über einen definierten Zeitraum (meist 24 Stunden) in definierten Intervallen (meist alle 15-30 min) der Blutdruck dokumentiert [82]. Es ist eine Aussage über den mittleren Blutdruck am Tag, in der Nacht und im gesamten Tagesverlauf möglich. Für einen validen Langzeitblutdruck müssen nach aktuellen Leitlinien mehr als 70% der Messungen korrekt sein [82]. Darüber hinaus kann hierbei eine Aussage über das Ausmaß des Blutdruckabfalls während des Schlafes getroffen werden [82]. Als „dipper“ werden Patienten bezeichnet, deren Blutdruck um >10% im Vergleich zum Tagesmittel abfällt, andernfalls gilt der Patient als „non-dipper“ [58,82]. Hervorzuheben ist, dass der Langzeitblutdruck, im Vergleich zur Praxisblutdruckmessung, eine bessere Korrelation zu hypertoniebedingten Endorganschäden aufweist [26] und ein signifikant besserer Prädiktor für die kardiovaskuläre und Gesamtmortalität ist [3,84].

### *Therapie*

Ab wann eine antihypertensive Therapie einzuleiten ist, wird nach der europäischen Gesellschaft für Kardiologie anhand des Praxisblutdrucks ermessen [82]. Im Falle eines maskierten Bluthochdrucks, welcher durch einen unauffälligen Praxisblutdruck und einen erhöhten Langzeitblutdruck charakterisiert ist, sollte Letzterer zur Therapieindikation herangezogen werden [69,82]. Generell gilt, dass eine Therapie bei allen Patienten  $\geq 18$  Jahren, ungeachtet der möglichen Komorbiditäten, ab einem Praxisblutdruck von systolisch  $\geq 140$  mmHg und/oder diastolisch  $\geq 90$  mmHg begonnen werden sollte [82]. Lediglich bei Patienten  $\geq 80$  Jahren liegen die Grenzwerte höher ( $\geq 160/\geq 90$  mmHg) [82]. Ob bei einem Patienten mit Hypertonie Grad 1 direkt eine dauerhafte medikamentöse Therapie initiiert werden muss, hängt dabei vom individuellen kardiovaskulären Risiko ab und bleibt eine Einzelfallentscheidung [82].

Oberstes Therapieziel für alle Patienten ist die Blutdruckreduktion auf Werte  $< 140/90$  mmHg [82]. Wird die Therapie vertragen, sollte im Sinne einer Reduktion des kardiovaskulären Risikos der Blutdruck auf Werte zwischen  $120-130/< 80$  mmHg eingestellt werden [20,70,82]. Bei Patienten über 65 Jahre sind jedoch systolische Blutdruckwerte von  $130-139$  mmHg anzustreben [20,70,82]. Zielwert für den diastolischen Blutdruck ist bei allen Patienten kleiner  $80$  mmHg [82]. Allerdings sollte der Blutdruck

## Einleitung

bei Patienten nicht unter 120 mmHg systolisch und nicht unter 70 mmHg diastolisch eingestellt werden; auf eine gute Verträglichkeit der Therapie ist zu achten [82].

Über die Wichtigkeit einer konsequenten Blutdruckeinstellung, auch bei fehlender klinischer Symptomatik, sollte der Patient ausführlich aufgeklärt werden, denn die relative Risikoreduktion verhält sich proportional zum Ausmaß der Blutdrucksenkung [20]. Auch eine möglicherweise dem Patienten gering erscheinende Reduktion des systolischen Blutdrucks um 10 mmHg verringert das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse um 20%, für eine koronare Herzkrankheit um 17%, für einen Schlaganfall um 27%, für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz um 28% und senkt darüber hinaus die Gesamt-Mortalität um 13% [20]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die Senkung des diastolischen Blutdrucks um 5 mmHg [82]. Dabei war die erzielte relative Risikoreduktion vom Grad der Hypertonie, dem kardiovaskulären Risiko, den Komorbiditäten, dem Alter und dem Geschlecht unabhängig [20,82]. Positive Effekte auf die Nierenfunktion konnten bis jetzt weitgehend nur bei Patienten mit Diabetes mellitus oder chronischer Niereninsuffizienz gezeigt werden [44,82]. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist: bei einem Patienten mit Bluthochdruck ohne weitere Komorbiditäten verschlechtert sich die Nierenfunktion eher langsam. Bei einem solchen, schleichenden Prozess ist es schwieriger, signifikante positive Auswirkungen der Blutdrucksenkung auf die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz nachzuweisen [82].

Die Beratung über Lebensstil-Änderungen und die Unterstützung zur Durchführung dieser sollten die Grundlage einer jeden Therapie darstellen. Es zeigte sich, dass ein „gesunder“ Lebensstil das kardiovaskuläre Risiko senkt und darüber hinaus die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie verhindert/verzögert [47,82]. Die von den Leitlinien empfohlenen Modifikationen des Lebensstils, welche einen blutdrucksenkenden Effekt zeigten, sind vor allem Reduktion der Salzaufnahme [32], Verringerung des Alkoholkonsums [16], eine mediterrane Ernährung [19,82], Gewichtsreduktion [53], Nikotinverzicht [82] und die Durchführung eines kontinuierlichen körperlichen Trainings [12,47,82]. Eine relevante Herausforderung bleibt sicherlich die oftmals fehlende Ausdauer der Patienten, solche Lebensstil-Änderungen über Jahre konsequent beizubehalten [80,82].

In der medikamentösen Therapie des Bluthochdrucks werden vor allem fünf Medikamentenklassen empfohlen, denn Vertreter dieser Klassen zeigten zum einen, dass sie nachweislich den Blutdruck senken und zum anderen sind sie in der Lage die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zu verringern [82]. Dabei handelt es sich um ACE-Hemmer, Angiotensin-1-Rezeptorblocker (ARB), Kalziumkanal-Blocker (CCB) und Diuretika [82]. Betablocker (BB) sind bei kardiovaskulären Begleiterkrankungen indiziert [82].

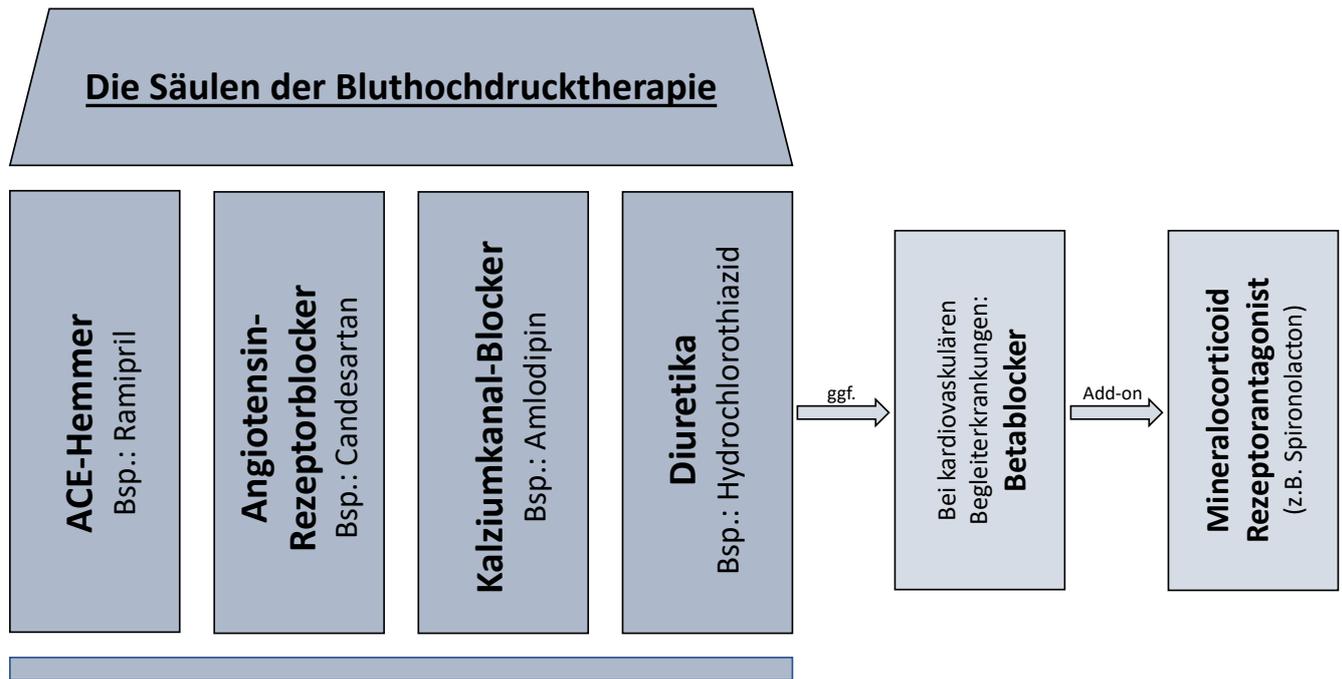


Abbildung 1: Die Säulen der Bluthochdrucktherapie

Tabelle 3 fasst die wichtigsten Aspekte der fünf Hauptmedikamentenklassen zusammen, wobei ACE-Hemmer und ARB unter dem Punkt „RAS-Inhibitoren“ zusammengefasst wurden.

Tabelle 3: Wichtige Informationen zu den fünf Hauptmedikamentenklassen der Bluthochdrucktherapie

Klasse	Vertreter (Beispiele)	Wichtige Informationen
RAS-Inhibitoren	ACE-Hemmer Ramipril Enalapril  ARB Valsartan Candesartan	-ACE-Hemmer und ARB gleich effektiv bzgl. Senkung der kardiovaskulären Morbidität [60] -ARB haben das beste Verträglichkeitsprofil und somit die höchste medikamentöse Adhärenz [38] -ACE-Hemmer und ARB reduzieren das Risiko für ein Nierenversagen [71,82] -kontraindiziert bei Schwangerschaft, Hyperkaliämie, bilaterale Nierenarterienstenose [82]
BB	Bisoprolol Metoprolol	-Reduktion kardiovaskuläres Risiko bei Hypertoniepatienten [72,82] aber inferior in der Verhinderung von kardiovaskulären Erkrankungen, Schlaganfall und Niereninsuffizienz im Vergleich zu anderen Blutdruckmedikamenten [20] -reduzierte medikamentöse Adhärenz im Vgl. zu RAS-Blocker [82]

## Einleitung

		<p>-v.a. eingesetzt bei kardialen Komorbiditäten wie bei Angina pectoris, zur Herzfrequenzkontrolle, bei Zustand nach Myokardinfarkt, bei Herzinsuffizienz (HF<sub>r</sub>EF) oder bei Schwangerschaft [82]</p> <p>-bevorzugter Gebrauch von Bisoprolol, Carvedilol, Nebivolol und Metoprolol [25,27,57,63,82]</p> <p>-kontrainduziert bei Asthma, Bradykardie [82]</p>
CCB	Amlodipin (Dihydropyridin-Typ)	<p>-gleiche Effektivität bzgl. Blutdrucksenkung und Mortalitätssenkung im Vergleich zu anderen Antihypertensiva [20,82]</p> <p>-superior in der Verhinderung von Schlaganfällen [20]</p> <p>-inferior in der Verhinderung der Herzinsuffizienz [20]</p> <p>-kontraindiziert bei Beinödemen [82]</p>
Diuretika	<p>Thiazide</p> <p style="padding-left: 40px;">Hydrochlorothiazid</p> <p style="padding-left: 40px;">Bendrofluazid</p> <p>Thiazid-ähnliche Diuretika</p> <p style="padding-left: 40px;">Chlorthalidon</p> <p style="padding-left: 40px;">Indapamid</p>	<p>-superior in der Verhinderung von Herzinsuffizienz [20]</p> <p>-aufgeführte Diuretika gleiche Effekte auf das kardiovaskuläre Outcome [72] deshalb alle empfohlen [82]</p> <p>-schlechteres Nebenwirkungsprofil im Vgl. zu RAS-Blocker deshalb schlechtere medikamentöse Adhärenz [72,82]</p> <p>-reduzierte Wirksamkeit bei Patienten mit Niereninsuffizienz (eGFR&lt;45 ml/min) und aufgehobene Wirksamkeit wenn eGFR &lt;30 ml/min (dann Schleifendiuretika einsetzen) [82]</p> <p>-kontrainduziert bei Hypokaliämie, Hyperkalzämie, metabolischem Syndrom [82]</p>

Erst bei Therapieversagen sollten weitere Substanzklassen, wie Mineralocorticoid Rezeptor Antagonisten (MRA z. B. Spironolacton), zentral wirksame Medikamente (z. B. Clonidin, Moxonidin) oder alpha-1-Blocker (z. B. Uradipil, Doxazosin) hinzugefügt werden [82]. Spironolacton bewies in diesem Fall die beste Wirksamkeit als Medikament der 4. Wahl [81].

Bei der Blutdruckeinstellung sollten folgende Punkte beachtet werden:

1. Als Basis einer medikamentösen Blutdrucktherapie sollten ACE-Hemmer, ARB, BB, CCB und Diuretika zum Einsatz kommen [82].
2. Bei Therapieeinleitung sollten die meisten Patienten eine Kombinationstherapie in Form einer SPC, bestehend aus zwei Wirkstoffen unterschiedlicher Klasse erhalten [82]. Eines der beiden Wirkstoffe sollte ein RAS-Blocker sein und das andere ein CCB oder ein Diuretikum [82].
  - 2.1. Alternativ sollte bei spezifischen Indikationen ein BB als Kombinationspartner mit einer anderen Substanzklasse (ACE-Hemmer, ARB, CCB, Diuretikum) eingesetzt werden [82]. Dies

## Einleitung

wäre z. B. bei Angina pectoris, Zustand nach Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz oder bei der Notwendigkeit einer Herzfrequenzkontrolle der Fall [82].

3. Eine Monotherapie sollte lediglich Niedrigrisikopatienten mit Hypertonie Grad 1, Hochrisikopatienten mit hochnormalem Blutdruck oder alten gebrechlichen Patienten vorbehalten bleiben [82].
4. Falls der Blutdruck mithilfe der initialen Kombinationstherapie (SPC) mit zwei Wirkstoffen nicht unter den Zielblutdruck gesenkt werden kann, sollte die Therapie im Sinne einer Kombinationstherapie in Form einer SPC, welche drei Wirkstoffe (also ein RAS-Blocker, ein CCB und ein Diuretikum) enthält, eskaliert werden [82].
5. Wenn nun der Blutdruck mit dieser Dreierkombination nicht zu kontrollieren ist und somit per Definition eine therapieresistente Hypertonie vorliegt, sollte Spironolacton dem bestehenden Therapieregime hinzugefügt werden [82].
6. Für den seltenen Fall, dass unter einer Therapie wie sie bei Punkt (5.) beschrieben ist, der Blutdruck noch nicht unter Kontrolle ist oder Spironolacton nicht vertragen wird, sollten weitere Antihypertensiva anderer Klassen, wie z. B. andere Diuretika (Amilorid), BB oder alpha-Blocker, hinzugefügt werden [82].
7. Die Kombination von zwei RAS-Blockern wird nicht mehr empfohlen [82].

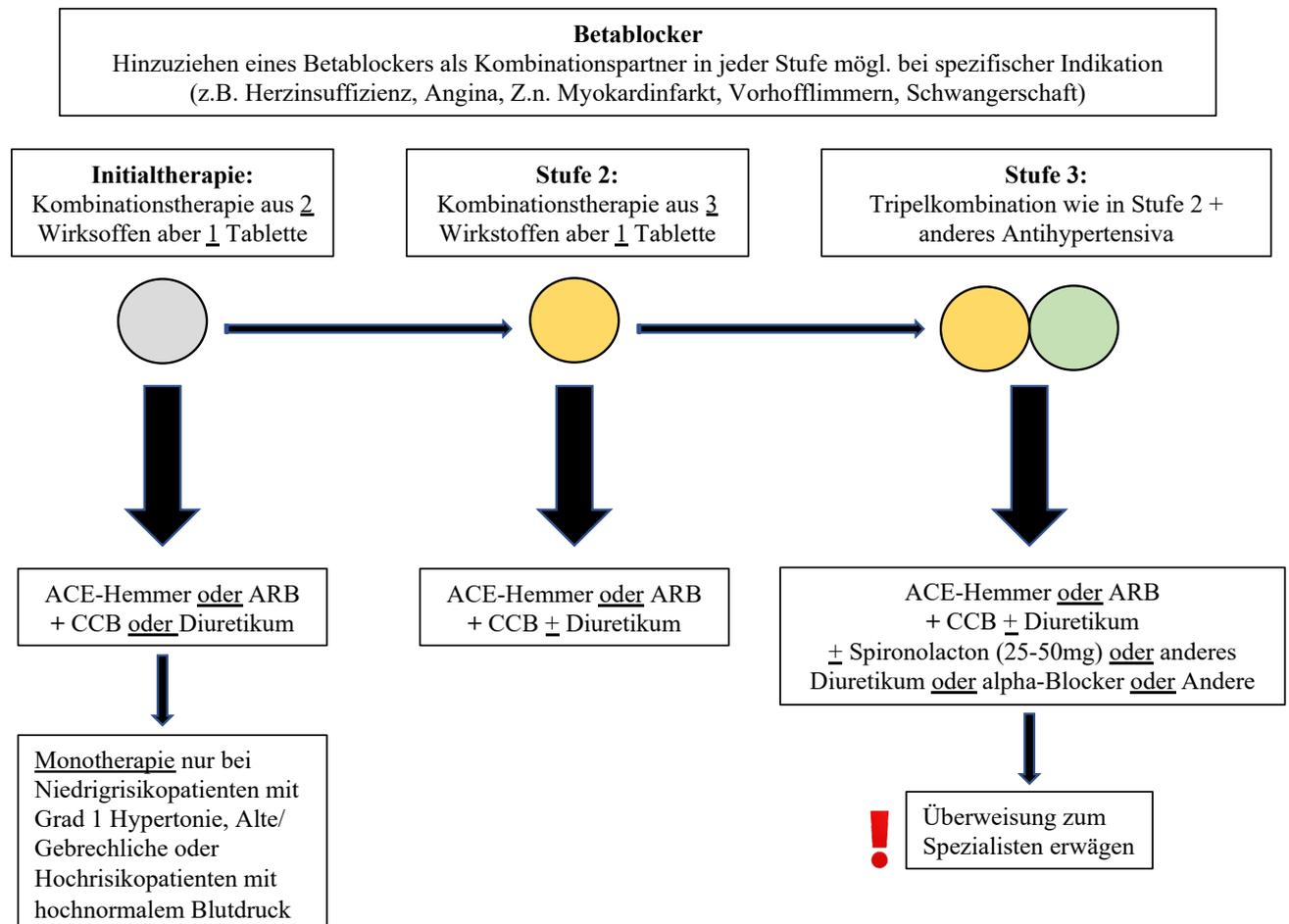


Abbildung 2: Therapieschema bei unkomplizierter arterieller Hypertonie gemäß aktuellen Leitlinien

## Einleitung

Es konnte gezeigt werden, dass der blutdrucksenkende Effekt einer Kombinationstherapie von zwei Medikamenten ungefähr fünfmal größer ist im Vergleich zur Dosisverdopplung einer Monotherapie [79]. Außerdem verringert man durch eine Kombination von zwei Medikamenten eine Variabilität im Therapieansprechen [82]. Eine Blutdruckkontrolle wird schneller erreicht [82] und das Therapieregime ist mit einer besseren Persistenz verbunden [13]. Mit der Zweierkombination sollte eigentlich bei ca. zweidrittel der Patienten der Blutdruck einzustellen sein [79]. Die Empfehlung zur Verschreibung einer SPC wurde ausgesprochen, da gezeigt werden konnte, dass eine geringere tägliche „Tablettenlast“ des Patienten mit einer verbesserter Adhärenz und höherer Blutdruckkontrolle verbunden ist [13,28,35]. Es besteht also eine umgekehrt proportionale Verbindung zwischen der Tablettenanzahl und der Adhärenz [82].

Die Rate des Therapieerfolges ist unter anderem niedrig, da von allen Patienten mit arterieller Hypertonie lediglich 50% über das Vorhandensein der Erkrankung informiert sind und entsprechend eine Therapie erhalten [11,50]. Unter den Patienten die eine Therapie erhalten, ist der Blutdruck bei nur ca. einem Drittel unter Kontrolle [11,50]. Es sind multiple potentielle Gründe für diesen schlechten Therapieerfolg bekannt: fehlender Zugang zu einer Therapie [46], Trägheit der Ärzte die Patienten leitliniengerecht zu therapieren [46,82], schlechte Adhärenz der Patienten [46,82], nicht flächendeckender Gebrauch einer Kombinationstherapie/inadäquate Dosierung [46,82], komplexe Therapieregime die wiederum zu schlechter Adhärenz führen [30,82], nicht ausreichendes Screening nach sekundäre Hypertonie [82] oder therapieresistente Hypertonie [46].

## 2.2 Adhärenz

### *Definition und Überblick*

Das Wort Adhärenz hat seinen Ursprung im Lateinischen von „adhaerere“ was so viel bedeutet wie „anhängen“. Im Englischen spricht man von „adherence“, was übersetzt für „einhalten, befolgen, festhalten“ steht. Die WHO definierte 2001 Adhärenz wie folgt: „Das Ausmaß inwieweit ein Patient medizinischen Anweisungen folgt.“ [17]. Diese Definition ist unter anderem aufgrund der Formulierung, die eine paternalistische Arzt-Patienten-Beziehung impliziert, nicht mehr zeitgemäß [17]. Deshalb wurde in den folgenden Jahren die Formulierung überarbeitet. Heute spricht man von dem „Ausmaß, inwieweit das Verhalten eines Menschen, wie zum Beispiel die Einnahme von Medikamenten, dem Befolgen eines Diätplans und/oder die Ausführung einer Lebensstiländerung, mit den vereinbarten und von beiden Seiten zugestimmten Empfehlungen des Arztes/des Therapeuten übereinstimmt“ [17].

Die Adhärenz ist klar von der Compliance abzugrenzen, was das englische Wort für „Einverständnis, Einhalten, Fügsamkeit“ ist [17]. Der Unterschied liegt vor allem darin, dass bei der Adhärenz die

## Einleitung

Zustimmung zu den Empfehlungen/der Therapie von Seiten des Patienten von Nöten ist [17,74]. Es handelt sich in diesem Fall eher um eine partizipative Entscheidungsfindung, wobei der Patient ein „aktiver Partner“ ist, denn eine gute Arzt-Patienten-Kommunikation ist die Grundlage für eine effektive Behandlung [17]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein adhärenter Patient stets, beständig und nach besten Möglichkeiten dem Therapieplan nachgeht, den er zuvor mit seinem behandelten Arzt zusammen ausgearbeitet hat.

Nach Angaben der WHO beträgt die Adhärenz bei der Langzeittherapie einer chronischen Erkrankung durchschnittlich lediglich 50% [17]. Folglich ist Nicht-Adhärenz ein großes und häufiges Problem bei chronischen Erkrankungen/kardiovaskulären Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie oder Diabetes mellitus [23,33]. Nicht-Adhärenz wiederum ist verbunden mit einem Anstieg der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität [14,33]. Momentan haben die Adhärenzmessung und im Falle einer nicht adäquaten Adhärenz, die Interventionen zur Verbesserung der Adhärenz, noch nicht den Stellenwert im klinischen Alltag, der nötig wäre [33].

Das “Ascertaining Barriers to Compliance” (ABC)-Projekt versuchte sich 2012 an einer allgemein gefassten Definition der medikamentösen Adhärenz [74,78]. Diese wurde beschrieben als „Prozess währenddessen der Patient seine Medikamente wie verordnet nimmt.“ [78]. Es wurde vor allem Wert darauf gelegt, dass dieser Begriff drei Hauptkomponenten umfasst, nämlich die Initiierung, die Durchführung und die Unterbrechung [78]. Der Prozess beginnt mit der Initiierung, also dem Therapiestart, der den Zeitpunkt festlegt, an dem der Patient die erste Dosis des verordneten Medikaments zu sich nimmt [78]. Danach folgt die Durchführung, wobei diese das Ausmaß beschreibt, inwieweit das vom Patienten angewendete Dosierungsschema dem verordneten Schema entspricht [78]. Das Ende des Prozesses ist die Unterbrechung, hier wird eine eigentlich noch ausstehende Dosis ausgelassen und danach keine weitere mehr genommen [78]. Der Begriff der Persistenz beschreibt in diesem Fall den Zeitraum zwischen Initiierung und Unterbrechung [78]. Die beiden in dieser Studie verwendeten exakten Definitionen der medikamentösen Adhärenz, sind unter dem Punkt 3.2.4 zu finden.

Bezogen auf die medikamentöse Behandlung einer arterielle Hypertonie senkt ein adhärentes Verhalten das kardiovaskuläre Risiko [14] und erhöht darüber hinaus die Blutdruckkontrollrate [7]. Trotzdem sind die Adhärenzraten sehr gering, je nach Studie und je nach Messmethode schwanken die Angaben einer vollständigen Adhärenz zwischen ungefähr 35-80% [2,21,23,35,59,64,73,77]. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass jeder zweite Bluthochdruckpatient seine Medikamente nicht wie verordnet nimmt, dies aber nicht ausreichend erkannt wird [17]. Somit besteht vor allem dringender Bedarf in der Entwicklung einer einfachen, kostengünstigen, nichtinvasiven und zuverlässigen Möglichkeit der Adhärenzmessung, da eine solche momentan noch nicht etabliert wurde [4,9,40,56].

## Einleitung

### *Messung der Adhärenz*

Die Adhärenz kann durch direkte oder indirekte Methoden gemessen werden [56]. Zu den indirekten Methoden zählen: Patientenfragebögen, „Tablettenzählen“, das Betrachten der Rate an neu ausgefüllten Rezepten, die Beobachtung des klinischen Ansprechens auf die Medikation, elektronische Therapieüberwachungssysteme und das Patiententagebuch [56].

Zu den einfachen Methoden zählen Patientenfragebögen und ein Patiententagebuch, die zwar einfach und kostengünstig sind, aber vom Patienten möglicherweise verfälscht werden können, wodurch eine Überschätzung der Adhärenz möglich ist [56]. Die Betrachtung des klinischen Ansprechens auf eine Medikation, wie zum Beispiel die Herzfrequenzreduktion durch einen Betablocker, ist zwar auch mit einem geringen Aufwand verbunden, kann aber auch durch andere Faktoren und Umwelteinflüsse leicht verfälscht werden [56]. Beim „Tablettenzählen“ wird die Anzahl der in der Packung zurückgebliebenen Tabletten bestimmt und so ausgerechnet, ob der Patient alle Dosierungen eingenommen hat [56]. Obwohl auch diese objektive und einfache Methode ihre Vorteile hat, ist sie sehr anfällig für Störfaktoren, denn der Patient könnte Tablette aus der Packung entnehmen und wegwerfen [56]. Außerdem erhält man so keine Informationen über den Einnahmezeitpunkt oder über eventuell vorhandene „drug holidays“, was das Weglassen der Medikation für mehr als drei aufeinanderfolgende Tage beschreibt [56]. Die Rate an neu ausgefüllten Rezepten ist eine objektive Methode, deren Daten digital leicht zu erfassen sind, aber keine Garantie liefern, dass die Tabletten eines neuen Rezeptes auch tatsächlich genommen werden [56]. Die genaueste indirekte Methode ist das elektronische Therapieüberwachungssystem, ein System was das Öffnen der Medikamentenschachtel elektronisch registriert und speichert [56]. So erhält man einen Einblick zu welchem Zeitpunkt und wie oft der Patient das Behältnis öffnet, jedoch weiß man nicht, ob die richtige Dosis genommen wurde oder ob das Medikament überhaupt genommen wurde [56].

Eine direkte Messmethode ist die direkte Überwachung der Medikamenteneinnahme durch eine andere unabhängige Person (engl. directly observed drug intake, DOT) [56]. Dies ist die genaueste aller Methoden, allerdings ist sie für den täglichen und vor allen ambulanten Gebrauch nicht umsetzbar [56]. Eine andere direkte Methode ist die Messung bzw. der Nachweis der entsprechenden Medikamente oder deren Metabolite in einem Körpermedium, meist Urin oder Blut [56]. Hier kommt in den meisten Fällen die LC-HRMS/MS (siehe unten) zum Einsatz [4,21,30,35,73]. So kann genau und objektiv nachgewiesen werden ob das Medikament tatsächlich eingenommen wurde [56]. Aber auch diese Messungen sind nur Momentaufnahmen der Adhärenz und können durch unterschiedlich schnelle Metabolisierung der Medikamente oder durch die „Weißkitteladhärenz bzw. den Zahnputzeffekt“ beeinflusst werden, wodurch die Adhärenz unter- oder überschätzt werden könnte [4,56]. Dabei beschreiben die Begriffe „Weißkitteladhärenz bzw. Zahnputzeffekt“ das Phänomen der

## Einleitung

Adhärenzsteigerung einige Tage vor dem Arztkontakt [4]. Zu erwähnen sind auch die relativ hohen Kosten dieser Messung.

*Tabelle 4: Übersichtstabelle Adhärenzmessung*

<b>Indirekte Methoden</b>		<b>Direkte Methoden</b>	
<u>Vorteile:</u> -Einfacher in der Durchführung -Kostengünstiger	<u>Nachteile:</u> -Einfache Verfälschung möglich -Überschätzung der Adhärenz möglich	<u>Vorteile:</u> -sehr genaue Methoden -weniger Überschätzung der Adhärenz	<u>Nachteile:</u> -Im klinischen Alltag nur schwer umzusetzen -theoretisch auch Verfälschung möglich -teurer
<u>Beispiele:</u> -Patientenfragebögen/ Patiententagebuch -„Tablettenzählen“ (engl. pill count) -Rate an neu ausgefüllten Rezepten registrieren -klinisches Ansprechen auf die Medikation evaluieren -elektronische Therapieüberwachungssysteme		<u>Beispiele:</u> -direkte Überwachung der Tabletteneinnahme durch unabhängige Person -toxikologischer Nachweis der Medikamente/deren Metaboliten im Urin oder Blutplasma (oder Speichel)	

Zur direkten Adhärenzmessung kommt häufig die Massenspektrometrie zum Einsatz. Durch dieses Verfahren ist es möglich, Kenntnisse über Molekülmassen, Summenformeln und die Struktur von Verbindungen zu erhalten [85]. Dank der extremen Messgenauigkeit und einer möglichen Vorausschaltung bzw. Kopplung mit chromatographischen Trennverfahren, wie beispielsweise einer Flüssigkeitschromatographie (LC-HRMS/MS), ist die Massenspektrometrie eine etablierte Messmethode in der Analytik [85]. Die zu untersuchende Substanz wird in die Gasphase überführt, dabei ionisiert und anschließend im Magnetfeld entsprechend des Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt [85].

Dabei besitzt das Massenspektrometer drei Hauptbauteile, eine Ionenquelle, in welcher die Substanz ihre Ladung erhält, also ionisiert wird, einen Analysator, der unter Vakuum die Auftrennung entsprechend des Masse-Ladungs-Verhältnis vollzieht und einen Detektor, der wiederum dem Erkennen der eintreffenden Ionen und der Registrierung der entsprechenden Signale dient [85]. Folglich entsteht ein spezifisches und für ein Molekül charakteristisches Massenspektrum, wobei auf der x-Achse die detektierten Ionen und auf der y-Achse die dazugehörigen Signalintensitäten gegeneinander aufgetragen werden [85].

Durch dieses Prinzip und die mittlerweile stark weiterentwickelten Möglichkeiten zur Beschleunigung und Ablenkung der Ionen, kann die exakte Masse der Teilchen ermittelt werden [85]. Bei der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS engl. high resolution mass spectrometry) wird durch

## Einleitung

den Vergleich mit Referenzmolekülen, deren Masse und Summenformel bekannt ist, die genaue Masse des Ions bestimmt, wobei eine Berechnung der Summenformel des betrachteten Ions aus diesen Angaben möglich ist [85].

Der eigentlich entscheidende Schritt zur Bestimmung des Massenspektrums, das eine Substanz charakterisiert, ist deren Ionisation, also die Überführung von einer ungeladenen in eine geladene Form [85]. Dazu dienen unterschiedliche Ionisationsmethoden, wie zum Beispiel die Elektronenstoß-Ionisation, wobei hier durch den Beschuss der zu untersuchenden Substanz mit Elektronen durch Zerfallsprozesse charakteristische Fragmente entstehen (Fragmentierung), die die genau Interpretation des Massenspektrums möglich machen [85]. Andere Ionisationsmethoden sind beispielsweise die chemische Ionisation (CI), das fast atom bombardment (FAB), die matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) oder die Elektrospray-Ionisation (ESI) [85]. Letztere macht nicht nur eine „schonende Ionisation“ von Makromolekülen und Proteinen möglich sondern lässt sich auch hervorragend mit vorgeschalteten Chromatographieverfahren, wie zum Beispiel bei der LC-HRMS/MS, verbinden [85].

Der toxikologische Nachweis von Wirkstoffen und deren Metaboliten in Urin und Plasma gilt als Goldstandard der Adhärenzmessung [41]. Dennoch ist die LC-HRMS/MS zum Assessment der Adhärenz noch nicht in breiter klinischer Anwendung aufgrund der hohen Kosten und der Notwendigkeit einer invasiven Probenentnahme (Blut, Urin) [41]. Ein neuartiger, interessanter Ansatz der Adhärenzmessung ohne invasive Probenentnahme ist die LC-HRMS/MS von Speichel zur Detektion verschiedener Medikamente [61].

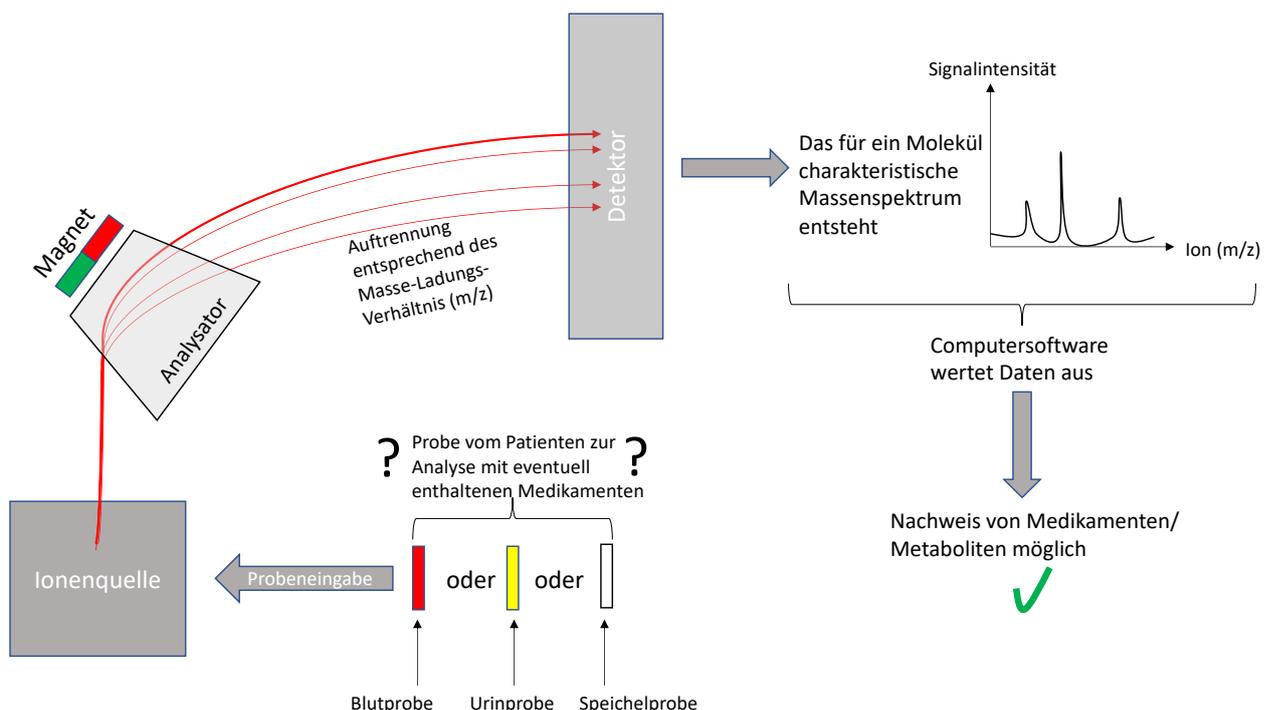


Abbildung 3: Schema- vereinfachtes Prinzip einer Massenspektrometrie zu Analyse Zwecken

## Einleitung

### *Interventionen zur Verbesserung der Adhärenz*

Bevor man eine Verbesserung der Adhärenz mit geeigneten Interventionen erzielen kann, muss die Nicht-Adhärenz erstmal mit eine der oben genannten Methoden diagnostiziert werden [56]. Es kann hilfreich sein, nach Anzeichen für eine schlechte Adhärenz (nicht wahrgenommene Arzttermine, zu wenig neu ausgestellte Rezepte) oder nach Gegebenheiten, die eine mangelnde Adhärenz wahrscheinlich machen (Behandlung asymptomatischer Erkrankungen, nebenwirkungsreiche Medikamente, zuzahlungspflichtige Medikamente) zu fahnden [56].

Die Maßnahmen, die zur Verbesserung der Adhärenz zur Anwendung kommen, lassen sich in vier Kategorien einteilen, nämlich die Patientenschulung (1), verbesserte Therapiepläne (2), besserer und leichter Zugang zum Arztkontakt (3) und eine verbesserte Arzt-Patient-Beziehung (4) [56]. Beispiele für die direkte Umsetzung wären den Patient ausführlich über die Wichtigkeit der Behandlung aufzuklären (1), ein einfaches Therapiekonzept mit dem Gebrauch von SPC um die „Tablettenlast“ zu minimieren (2), flexible Terminvergabe auch in den Abendstunden (3) und auf den Patienten und seine Wünsche einzugehen und diese im Therapieplan zu berücksichtigen (4) [56].

## **2.3 Fragestellung**

Eine LC-HRMS/MS von Urin oder Plasma zum Nachweis von Wirkstoffen oder deren Metaboliten ist eine bekannte Methode der direkten Adhärenzmessung und gilt als Goldstandart. Eingenommene Medikamente verteilen sich jedoch in jedem Kompartiment des Körpers, somit auch im Speichel und es wäre denkbar, dass ein Nachweis dieser Arzneimittel auch dort möglich ist [41].

Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob ein Nachweis von antihypertensiven Medikamenten oder deren Metaboliten im Speichel von Patienten mit Hypertonie mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-HRMS/MS) möglich ist [41]. Falls ein valider Nachweis der oben genannten Substanzen im Speichel möglich wäre, könnte prinzipiell eine neuartige Form der direkten Adhärenzmessung ohne invasive Probengewinnung etabliert werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Ergebnisse der Speichelproben mit der Adhärenzmessung in Blutplasma und Urin vergleichbar sind.

### 3 Material und Methoden

#### *Studienkohorte und Studiendesign*

In diese Querschnittsstudie wurden von November 2017 bis März 2018 insgesamt 56 Patienten mit arterieller Hypertonie, die in der Hochschulambulanz des Universitätsklinikum des Saarlandes (Homburg/Saar) vorstellig wurden, eingeschlossen. Alle Patienten willigten in die Studienteilnahme schriftlich ein. Die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes bewilligte die Durchführung der Studie. Alle zur Teilnahme berechtigten Patienten waren  $\geq 18$  Jahre und hatten gemäß den aktuellen Leitlinien [82] eine arterielle Hypertonie. Das gesamte Patientenkollektiv erhielt eine antihypertensive Therapie, welche mindestens seit zwei Wochen nicht umgestellt worden war.

#### *Durchgeführte Untersuchungen*

Im Vorfeld wurden alle Patienten ausdrücklich darauf hingewiesen, am Tag ihres Termins in der Ambulanz morgens ihre Medikation gemäß des Therapieplans einzunehmen. Während der Visite wurde bei allen Patienten eine Aufarbeitung ihrer Vorerkrankungen und des Medikationsplans, eine körperliche Untersuchung, eine Blutuntersuchung und eine Praxisblutdruckmessung vorgenommen und dokumentiert. Dabei wurde die Messung des Praxisblutdrucks streng nach den Empfehlungen der aktuellen Leitlinien [82] durchgeführt. Dies bedeutet, dass der Patient vor der eigentlichen Messung mindestens fünf Minuten in ruhiger Umgebung entspannt sitzen musste. Erst im Anschluss wurden im Abstand von ungefähr einer Minute drei aufeinanderfolgende Blutdruckmessungen mit einem validierten automatischen Blutdruckmessgerät (Omron Health Care, Inc., Lake Forest, IL, USA) durchgeführt. Lagen dabei die ersten beiden Messergebnisse mehr als 10 mmHg auseinander, war dies die Indikation für eine vierte Blutdruckmessung, welche gegebenenfalls mit einer Minute Abstand zur dritten Messung erfasst wurde. Der dokumentierte Praxisblutdruck ist dabei der Mittelwert aus den letzten beiden Messungen.

Zusätzlich wurde bei entsprechender Indikation ein Langzeitblutdruckmessgerät angelegt und in der Folge eine 24h-Langzeitblutdruckmessung (Mobil-O-Graph; I.E.M GmbH, Stolberg, Germany) absolviert. Dies war bei insgesamt 42 Patienten der Fall. In dieser Studie litt ein Patient per Definition an einer chronischen Niereninsuffizienz, wenn die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR)  $< 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> betrug. Unter chronischer Herzinsuffizienz wurden Patienten mit dokumentierter Herzinsuffizienz mit reduzierter (HF<sub>r</sub>EF) oder erhaltener Pumpfunktion (HF<sub>p</sub>EF) zusammengefasst.

## Material und Methoden

### *Probengewinnung von Speichel, Blutplasma und Urin*

Alle zu analysierende Proben wurden während der Visite abgenommen. Dabei wurde die Speichelprobe gemäß den Herstellerangaben mit dem Quantisal oral fluid collection device (Immunoanalysis Corporation, Pomona, CA, USA) abgenommen, eine speziell für den Medikamenten-oder Drogennachweis entwickelte Vorrichtung zur Gewinnung einer Speichelprobe. Dieses Device besteht aus einem steril verpacktem Wattepad, welches an einem Stäbchen befestigt ist und das sich beim Einführen in den Mundraum mit ca. 1 ml ( $\pm 10\%$ ) Speichel vollsaugt. Das Stäbchen mit dem Wattepad wurde dem Patienten unter die Zunge gelegt bis es sich ausreichend vollgesaugt hatte. Das Erreichen eines angemessenen Füllungsstatus des Wattepads wird durch Blauverfärbung der Volumenanzeige am Ende des Stäbchens sichtbar. Nach der Probenentnahme des Speichels wurde das Wattepad in ein verschließbares Röhrchen, welches eine Pufferlösung enthält, eingetaucht und verschlossen. Danach kann das Röhrchen theoretisch zwei Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden, wobei die Nachweisbarkeit der Medikamente erhalten bleibt. Bei der Abnahme der Speichelprobe wurden keine Substanzen zur Förderung des Speichelflusses wie beispielsweise Zitronensäure verwendet, da dies die Messung bzw. die Konzentration der Medikamente beeinflussen könnte [15,55]. Nach Entnahme der Speichelprobe wurde das beschriftete Device mit dem enthaltenen Wattepad ausreichend lange (2 h) bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend, nachdem die zu analysierenden Substanzen in den Puffer übergegangen waren, das Wattepad entfernt.

Außerdem wurde venöses Blut in ein EDTA-Röhrchen abgenommen und eine Spontanurin-Probe gewonnen. Beide Behältnisse wurden beschriftet, um eine Verwechslung auszuschließen. Anschließend wurde die Blutprobe zentrifugiert und der Überstand wurde zur Weiterverarbeitung in ein anderes Gefäß pipettiert. Daraufhin wurden die Speichelprobe, das Blutplasma und die Urinprobe bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, bis die Analyse erfolgte. Die Analysen wurden im Institut für experimentelle und klinische Toxikologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Homburg/Saar) durchgeführt.

### *Adhärenzmessung mit einer Flüssigkeitschromatographie-gekoppelten hochauflösenden Massenspektrometrie (LC-HRMS/MS)*

Die Details der biochemischen Methodik der verwendeten LC-HRMS/MS sind in der Literatur ausführlich beschrieben [61].

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Proben mithilfe einer ThermoFisher Accucore PhenylHexyl Säule (ThermoFisher, Dreieich, Deutschland) aufgetrennt wurden, diese enthält eine mobile Phase A bestehend aus 2mmol/l wässriger Ammoniumforminat-Lösung mit 0,1% Ameisensäure (v/v, pH3) und einer mobilen Phase B bestehend aus 2 mM wässriger Ammoniumforminat-Lösung mit Acetonitril:Methanol (50:50, v/v, 1% Wasser) und mit 0,1% Ameisensäure. Detektiert wurden die

## Material und Methoden

Wirkstoffe (APIs active pharmaceutical ingredients) oder deren Metabolite von dem ThermoFisher Scientific Dionex UltiMate 3000 (ThermoFisher) gekoppelt mit einem HTC PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) und einem TF Q-Exactive system mit einer erhitzten Elektrospray-Ionisationsquelle (HESI)-II sowohl im Positiv- als auch Negativ-Modus. Die massenspektrometrische Auswertung wurde zunächst im full scan acquisition mode und dann im SIM (single ion monitoring) mode mit den interessierenden Massen durchgeführt. Dazu wurde die TraceFinder 4.1 Software (ThermoFisher) genutzt. Diese Messungen wurden durch das Fachpersonal der experimentellen und klinischen Toxikologie ohne Bezug auf die Patientendaten durchgeführt.

### *Definition der medikamentösen Adhärenz*

In der Literatur werden unterschiedliche Definitionen der medikamentösen Adhärenz benutzt [74,77]. Die beiden im folgenden aufgeführten Klassifikationen werden häufig im Rahmen von Medikamentenbestimmungen mittels einer LC-HRMS/MS genutzt und wurden auch in dieser Untersuchung angewendet:

Einerseits (Definition 1) wird die Adhärenz definiert gemäß der Anzahl der Wirkstoffe, die nicht nachzuweisen sind. Ist jedes verordnete Medikament im Urin nachzuweisen, wird der Patient als „adhärent“ bezeichnet. Sind ein bzw. mindestens zwei verordnete Medikamente im Urin nicht nachzuweisen, gilt der Patient als „teilweise adhärent“ bzw. „nicht-adhärent“.

Die andere gängige Definition der Adhärenz (Definition 2) gründet auf einem zweispurigen Ansatz mit einem Schwellenwert von 80%. Für den Fall, dass  $\geq 80\%$  der verordneten Medikamente im Urin nachgewiesen werden können, ist der Patient „adhärent“, bei einer Nachweisrate von  $< 80\%$  der Medikamente gilt er als „nicht-adhärent“.

Bei der Auswertung der klinischen Charakteristika der Patienten wurde eine Korrektur der Adhärenz für single pill combinations (SPC) vorgenommen. Im Falle einer SPC, die mehrere Substanzen in einer Tablette enthält, reicht eine nachgewiesene Substanz aus, um eine vollständige Adhärenz aller Substanzen der SPC anzunehmen.

### *Statistische Auswertung*

Die aufgeführten Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) und als absolute Häufigkeiten (%) wiedergegeben. Aufgrund der relativ geringen Fallzahl wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test bzw. der Mann-Whitney-U Test zum Vergleich stetiger Variablen zwischen verbundenen bzw. unverbundenen Gruppen verwendet. Für Vergleiche stetiger Variablen zwischen

## Material und Methoden

adhärenten, teilweise-adhärenenten und nicht-adhärenenten Patienten, kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Bei einem signifikanten Ergebnis des Kruskal-Wallis-Test, wurde für paarweise Vergleiche die Dunn-Bonferroni post hoc Methode angewendet. Bei kategorischen Variablen wurde für Vergleiche zwischen unverbundenen Gruppen der Pearson's Chi<sup>2</sup>-Test oder der exakte Test nach Fisher angewendet und für Vergleiche zwischen verbundenen Gruppen der McNemar-Test oder Cochran Q-Test.

Bei nominalen Variablen wurde zur Überprüfung der Reliabilität Fleiss`Kappa ( $\kappa$ ) eingesetzt. Die Interrater-Reliabilität wurde betrachtet wie ursprünglich vorgeschlagen:  $\kappa < 0$  „schlechte Übereinstimmung“, 0-0,20 „etwas Übereinstimmung“, 0,21-0,40 „ausreichende Übereinstimmung“, 0,41-0,6 „mittelmäßige Übereinstimmung“, 0,61-0,80 „beachtliche Übereinstimmung“ und 0,81-1,00 „fast vollkommene Übereinstimmung“ [39]. Ein zweiseitiger p-Wert  $< 0,05$  wird dabei als statistisch-signifikant angesehen.

Zur statistischen Analyse wurde IBM SPSS Statistics, Version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) verwendet. Die Abbildungen wurden mithilfe von GraphPad Prism, Version 8.0.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt.

## 4 Ergebnisse

### *Patientenpopulation*

Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die eingeschlossenen Patienten (54% weiblich) waren durchschnittlich  $60 \pm 13$  Jahre alt und hatten einen Body Mass Index (BMI) von  $29 \pm 7$   $\text{kg/m}^2$ . Häufige Komorbiditäten waren koronare Herzkrankheit (23%), chronische Herzinsuffizienz (36%) und Diabetes mellitus Typ II (25%). Darüber hinaus lag bei 19% der Patienten eine chronische Niereninsuffizienz vor.

Obwohl den Patienten durchschnittlich  $3,8 \pm 1,4$  blutdrucksenkende Medikamente verschrieben wurden, waren sowohl der Praxisblutdruck ( $144/86 \pm 26/15$  mmHg) als auch der 24h-Langzeitblutdruck (24h-Mittelwert  $134/81 \pm 16/10$  mmHg) erhöht.

Therapie-adhärente Patienten hatten im Vergleich zu nicht-adhärenten und teilweise adhärennten Patienten einen signifikant niedrigeren systolischen 24h-Langzeitblutdruck ( $p=0,012$ ) und einen signifikant niedrigeren diastolischen Blutdruck in der 24h-Langzeitblutdruckmessung ( $p=0,009$ ).

## Ergebnisse

*Tabelle 5: Eigenschaften, Komorbiditäten und Untersuchungsergebnisse der Patienten unterteilt in nicht-adhärenzte, teilweise adhärenzte und adhärenzte Patienten*

	Nicht-adhärenzte Patienten		Teilweise adhärenzte Patienten		Adhärenzte Patienten		p-Wert*
	Wert	N	Wert	N	Wert	N	
Alter, Jahre	64,0±8,7	6	56,2±13,4	13	59,1±13,7	37	0,400
Frauen, n (%)	5 (83)	6	8 (62)	13	17 (46)	37	0,249 <sup>†</sup>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	26,1±8,2	4	30,0±6,5	11	29,3±6,9	36	0,695
Raucher, n (%)	2 (33)	6	4 (31)	13	9 (24)	37	0,726 <sup>†</sup>
DM II, n (%)	1 (17)	6	3 (23)	13	10 (27)	37	0,908 <sup>†</sup>
KHK, n (%)	3 (50)	6	2 (15)	13	8 (22)	37	0,242 <sup>†</sup>
CHI, n (%)	3 (50)	6	3 (23)	13	14 (38)	37	0,434 <sup>†</sup>
CKD, n (%)	0 (0)	6	2 (17)	12	8 (23)	35	0,575 <sup>†</sup>
OBP systolisch, mmHg	155,5±37,3	6	143,9±24,7	12	142,3±24,7	36	0,666
OBP diastolisch, mmHg	90,2±22,5	6	90,5±19,1	12	83,1±12,3	36	0,507
24h-SBP, mmHg	147,0±17,1	5	141,7±14,1	10	128,4±14,4	27	0,012
24h-DBP, mmHg	81,6±9,3	5	90,0±9,3	10	77,7±9,2	27	0,009
Herzfrequenz, 1/min	80,5±15,6	6	79,6±18,3	12	78,0±11,8	35	0,950

Werte in Mittelwert ± Standardabweichung (SD) oder Zahlenwerte in (%). <sup>†</sup>Exakter Test nach Fisher. \*p-Wert für Vergleiche zwischen den Gruppen untereinander. Adhärenzraten wurden korrigiert für SPC.

Abkürzungen: BMI= Body-Maß-Index; DM II= Diabestes mellitus Typ II; KHK= koronare Herzkrankheit; CHI= chronische Herzinsuffizienz; CKD= chronische Nierenerkrankung (engl. chronic kidney disease), OBP= Praxisblutdruck (engl. office blood pressure); 24h-SBP= systolischer Blutdruck im 24h-Langzeitblutdruck (engl.); 24h-DBP= diastolischer Blutdruck im 24h-Langzeitblutdruck (engl.)

## Ergebnisse

### Adhärenzmessung

Gemäß den beiden verschiedenen Definitionen der Adhärenz bezogen auf die Medikamenteneinnahme (siehe Abschnitt 3.2.4) war die Adhärenz wie folgt:

- Definition 1: 59% der Patienten waren adhären, es konnten also alle verschriebenen Medikamente im Urin nachgewiesen werden. 29% der Patienten wurden als teilweise adhären eingestuft, hier konnte eines der verschriebenen Medikamente im Urin nicht nachgewiesen werden, die Anderen jedoch schon. Die übrigen 13% der Patienten wurde als nicht-adhären klassifiziert, hier war ein Nachweis von mindestens zwei verschriebenen Medikamenten im Urin nicht möglich. Nach Korrektur der Adhärenzraten für SPC waren 66% adhären, 23% teilweise-adhären und 11% nicht-adhären.
- Definition 2: Bei 70% aller Patienten konnten  $\geq 80\%$  ihrer verschriebenen Medikamente im Urin nachgewiesen werden, sie waren gemäß dieser Definition adhären (77% nach Korrektur für SPC). Die restlichen 30% der Patienten wurde nach dieser Definition als nicht-adhären eingestuft, da  $< 80\%$  ihrer verschriebenen Medikamente im Urin nachzuweisen waren (23% nach Korrektur für SPC).

Abbildung 4 veranschaulicht die Ergebnisse gemäß der Definition 1 (Bildabschnitt B) und Definition 2 (Bildabschnitt A). Die Adhärenzraten sind hier jeweils für alle betrachteten Untersuchungsmedien (Urin, Blutplasma, Speichel) der LC-HRMS/MS wiedergegeben. Die höchsten Adhärenzraten waren im Urin als Medium der Massenspektrometrie zu verzeichnen.

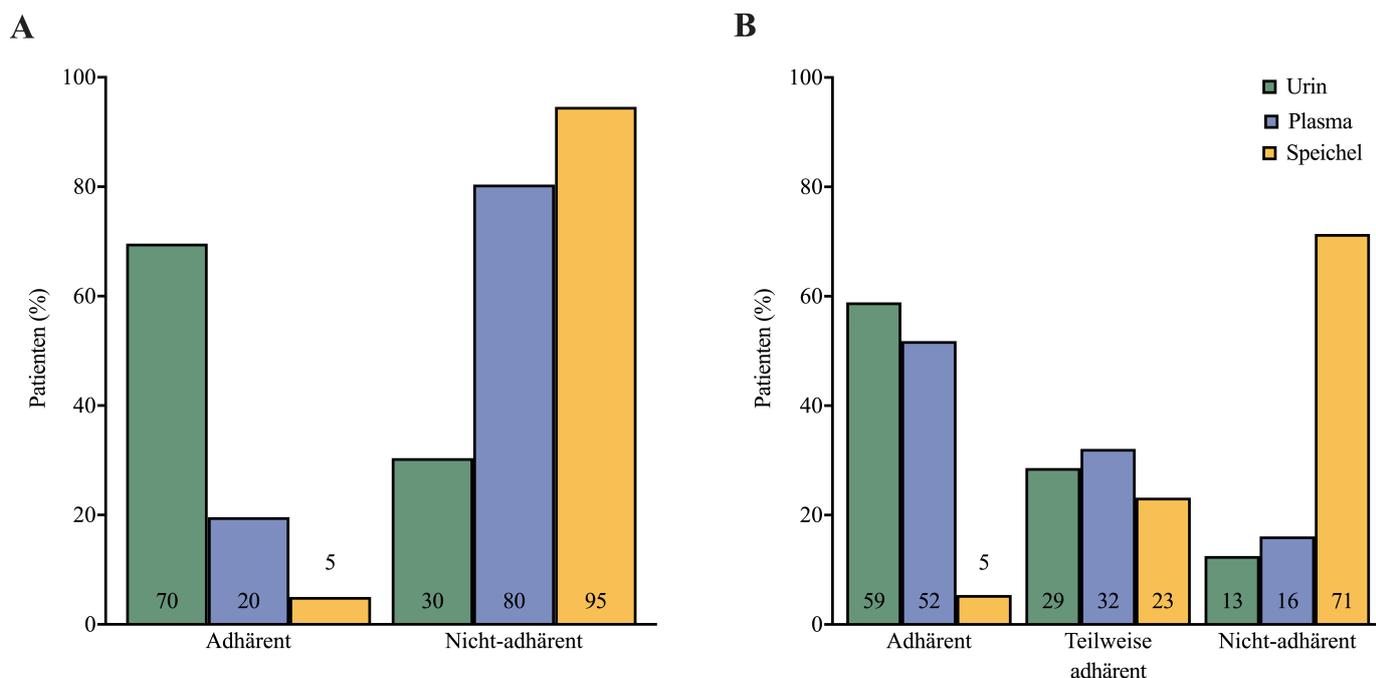


Abbildung 4: Adhärenzraten gemäß Definition 1 (Bildabschnitt B) und Definition 2 (Bildabschnitt A)

## Ergebnisse

Adhärente Patienten hatten weniger antihypertensive Medikamente in ihrem Medikamentenplan ( $p < 0,001$ ) und darüber hinaus eine geringere Anzahl an täglichen Einzeldosen einzunehmen ( $p = 0,012$ ) im Vergleich zu nicht-adhärenten und teilweise adhären Patienten. Adhärente Patienten erhielten durchschnittlich  $3,4 \pm 1,2$  verschiedene antihypertensive Medikamente und nahmen täglich  $4,2 \pm 1,9$  Tabletten zu sich. Dagegen wurden teilweise adhären Patienten  $4,5 \pm 1,1$  verschiedene Bluthochdruckmedikamente verschrieben und sie nahmen täglich  $6,1 \pm 2,4$  Tabletten, wohingegen nicht-adhären Patienten im Durchschnitt  $5,3 \pm 1,2$  Antihypertensiva verordnet wurden und täglich  $6,3 \pm 2,3$  Tabletten einzunehmen hatten.

Abbildung 5 gibt genau diesen Einfluss des Therapieplans bzw. des Medikamentenplans auf das Adhärenzverhalten wieder. Dabei ist hier die Auswirkung der Gesamtzahl an Bluthochdruckmedikamenten (Bildabschnitt A) und die Auswirkung der täglichen Einzeldosen (Bildabschnitt B) auf das Adhärenzverhalten abgebildet. Die Adhärenzraten wurden hierbei korrigiert für SPC.

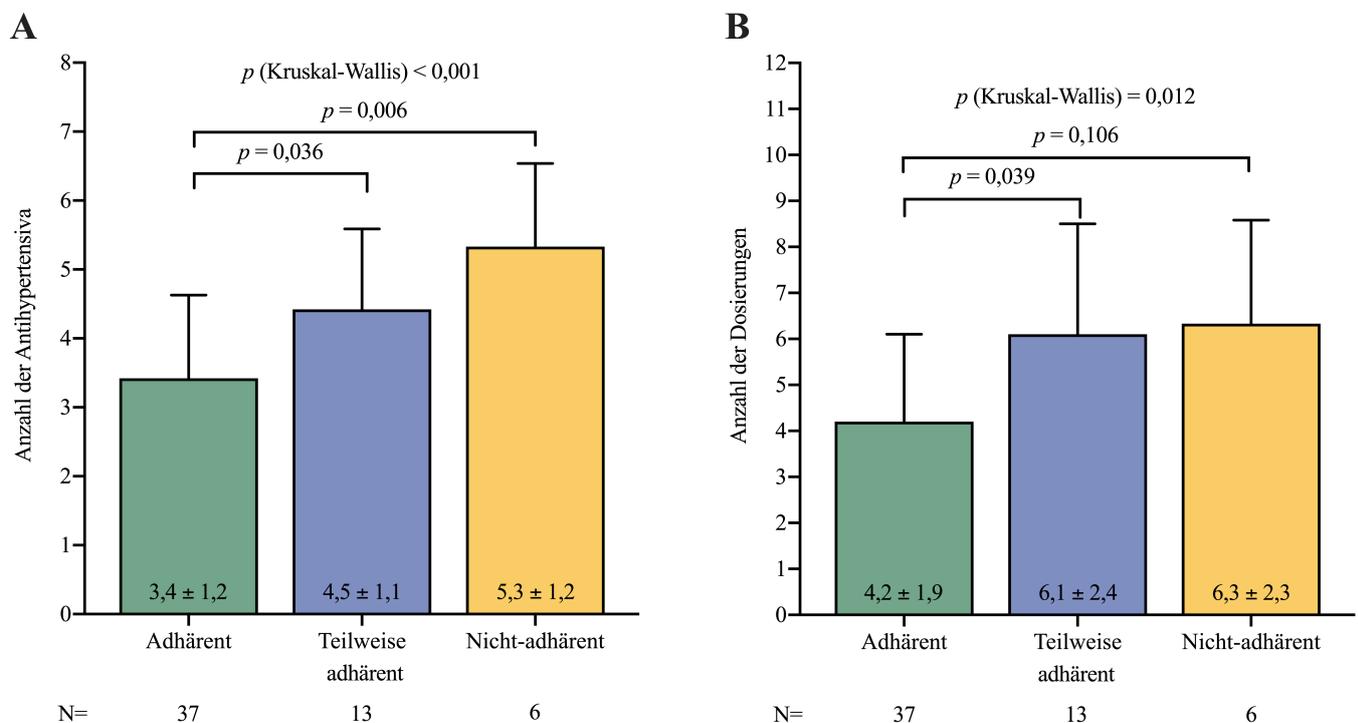


Abbildung 5: Einfluss des Therapieplans bzw. des Medikamentenplans auf das Adhärenzverhalten (A: Auswirkung der Gesamtzahl an Bluthochdruckmedikamenten auf das Adhärenzverhalten, B: Einfluss der täglichen Tablettenanzahl auf das Adhärenzverhalten);  $p$ -Werte sind für Vergleiche der Gruppen untereinander angegeben.

## Ergebnisse

Tabelle 6 fasst die antihypertensiven Medikamente zusammen, welche nicht-adhärenten, teilweise adhärenten und adhärenten Patienten erhielten.

*Tabelle 6: Verordnete antihypertensive Medikamente bei nicht-adhärenten, teilweise adhärenten und adhärenten Patienten*

	<b>Nicht adhärente Patienten</b>		<b>Teilweise adhärente Patienten</b>		<b>Adhärente Patienten</b>		<b>p- Wert*</b>
	<b>Wert</b>	<b>N</b>	<b>Wert</b>	<b>N</b>	<b>Wert</b>	<b>N</b>	
Gesamtzahl unterschiedliche Bluthochdruckmedikamente, n	5,3±1,2	6	4,5±1,1	13	3,4±1,2	37	<0,001
Tägliche Tablettenanzahl Bluthochdruckmedikamente, n	6,3±2,3	6	6,1±2,4	13	4,2±1,9	37	0,012
Kombinationspräparate SPC, n (%)	3 (50)	6	4 (31)	13	13 (35)	37	0,829 <sup>†</sup>
ACE-Hemmer, n (%)	2 (33)	6	5 (39)	13	11 (30)	37	0,906 <sup>†</sup>
ARB, n (%)	5 (83)	6	8 (67)	13	23 (62)	37	0,788 <sup>†</sup>
CCB, n (%)	5 (83)	6	8 (62)	13	20 (54)	37	0,500 <sup>†</sup>
Thiazide, n (%)	5 (83)	6	7 (54)	13	18 (49)	37	0,329 <sup>†</sup>
Schleifendiuretika, n (%)	1 (17)	6	5 (39)	13	11 (30)	37	0,676 <sup>†</sup>
Triamteren, n (%)	0 (0)	6	1 (8)	13	0 (0)	37	0,339 <sup>†</sup>
BB, n (%)	6 (100)	6	12 (92)	13	30 (81)	37	0,601 <sup>†</sup>
MRA, n (%)	3 (50)	6	6 (46)	13	6 (16)	37	0,042 <sup>†</sup>
Alpha1-Blocker, n (%)	2 (33)	6	1 (8)	13	0 (0)	37	0,008 <sup>†</sup>
Alpha2-Agonist, n (%)	4 (67)	6	5 (39)	13	5 (14)	37	0,008 <sup>†</sup>
Werte in Mittelwert ± Standardabweichung (SD) oder Zahlenwerte in (%). <sup>†</sup> Exakter Test nach Fisher. *p-Wert für Vergleiche zwischen den Gruppen untereinander. Adhärenzraten wurden korrigiert für SPC.							

## Ergebnisse

Die Adhärenz war weitgehend unabhängig von der Wahl der verordneten Medikamentenhauptklassen, welche zur Behandlung der arteriellen Hypertonie eingesetzt wurden. Lediglich Alpha-2-Agonisten ( $p=0,008$ ), MRA ( $p=0,042$ ) und Alpha1-Blocker ( $p=0,008$ ) erhielten nicht-adhärenente Patienten bzw. nicht-adhärenente und teilweise adhärenente Patienten signifikant häufiger im Vergleich zu adhärenenten Patienten.

Bei allen Patienten waren die fünf Hauptklassen von antihypertensiven Medikamenten stark vertreten. 32% hatten einen ACE-Hemmer im Medikamentenplan, 68% einen ARB, 59% einen CCB, 54% ein Thiaziddiuretikum und 86% einen Betablocker. Somit kann auf eine leitlinienkonforme Therapie geschlossen werden. Als weitere Kombinationspartner in der Bluthochdrucktherapie nahmen 27% ein MRA, 30% ein Schleifendiuretikum, 25% einen Alpha2-Agonisten, 5% einen Alpha1-Blocker und ein Patient ein Kalium-sparendes Diuretikum (Triamteren). Die absolute Anzahl an Patienten, die eine gewisse Substanzgruppe verschrieben bekam, ist in der folgenden Abbildung 6 angegeben. Die Verordnung einer SPC bestand bei 36% aller Patienten.

Abbildung 6 zeigt die für SPC-korrigierte Adhärenzraten der verschiedenen Klassen von Bluthochdruckmedikamenten. Durchschnittlich betrug die Adhärenzrate gemittelt über alle aufgeführten Substanzklassen 85%. Hervorzuheben ist die besonders hohe Adhärenzrate (100%) für ARB und die niedrigste für Alpha1-Blocker (67%). Da lediglich ein Patient ein Kaliumsparendes Diuretikum erhielt (Triamteren), ist dieses nicht explizit in der Abbildung aufgeführt.

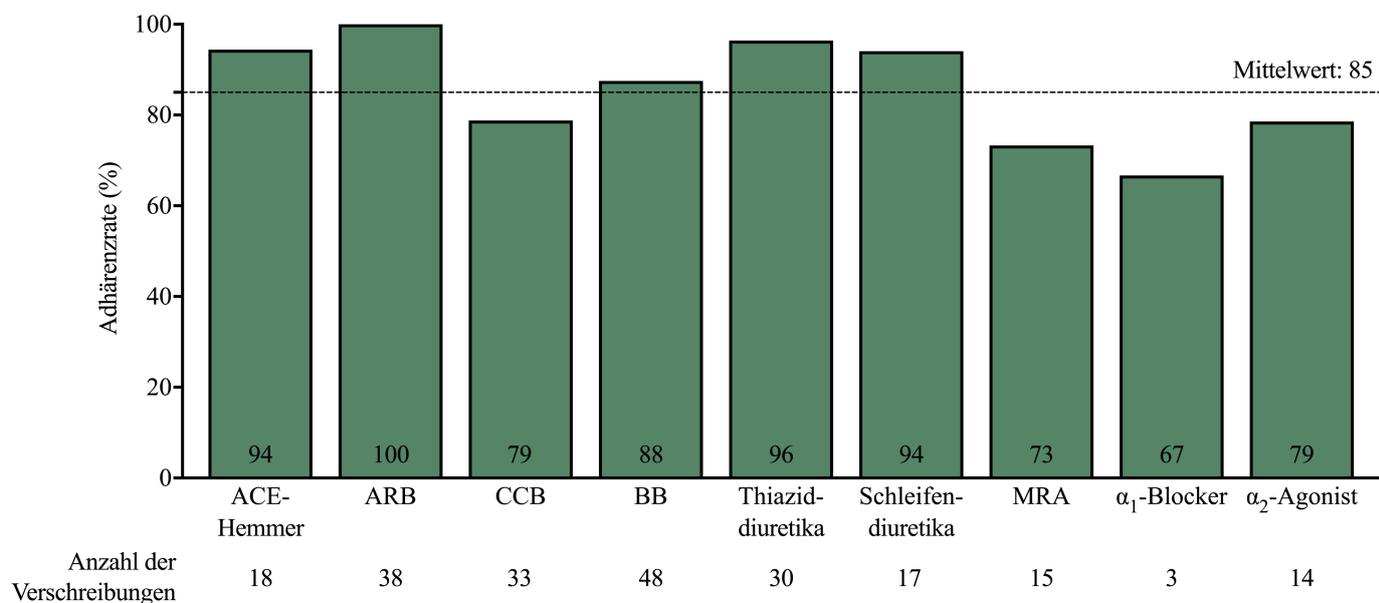


Abbildung 6: Adhärenzraten der verschiedenen Substanzklasse korrigiert für SPC; \*Die Gesamtzahl der detektierten Medikamente beinhaltet Triamteren.

## Ergebnisse

### *Vergleich der verschiedenen Medien zur Detektion von Bluthochdruckmedikamenten*

Abbildung 7 zeigt exemplarisch ein Massenspektrum von einem Patienten. Hier sind die rekonstruierten LC-HRMS/MS Chromatogramme aus Urin (A), Blutplasma (B) und Speichel (C) wiedergegeben. (BCD protoniertes Molekül; AE1E2 deprotoniertes Molekül; E3 fragmentiertes Ion)

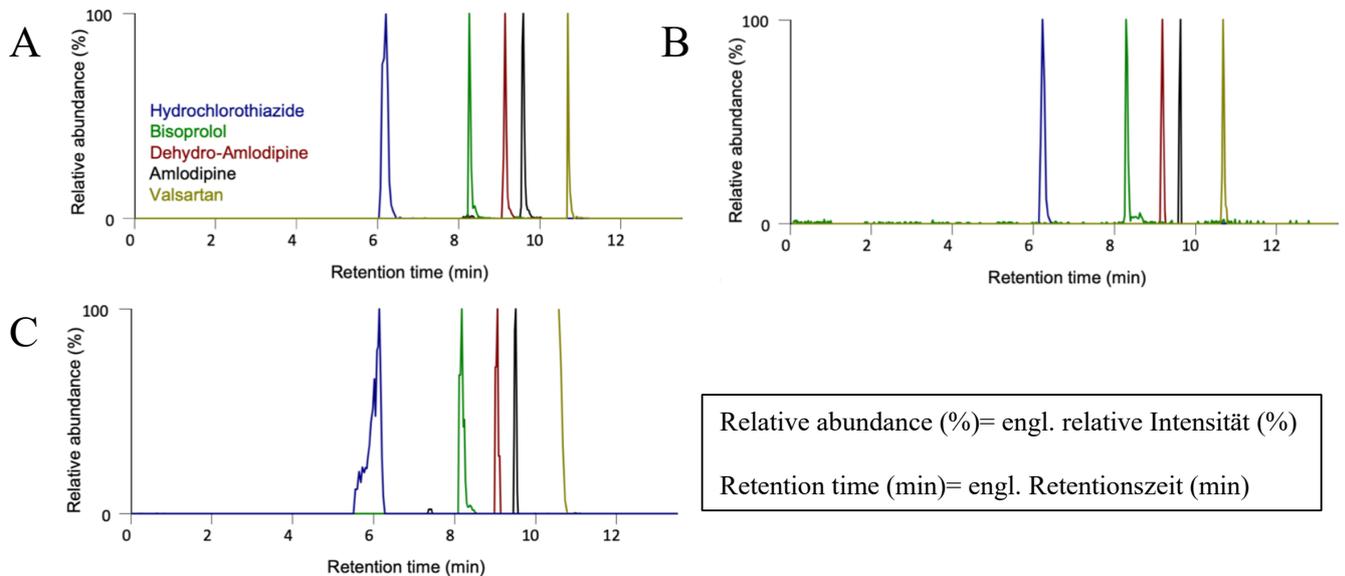
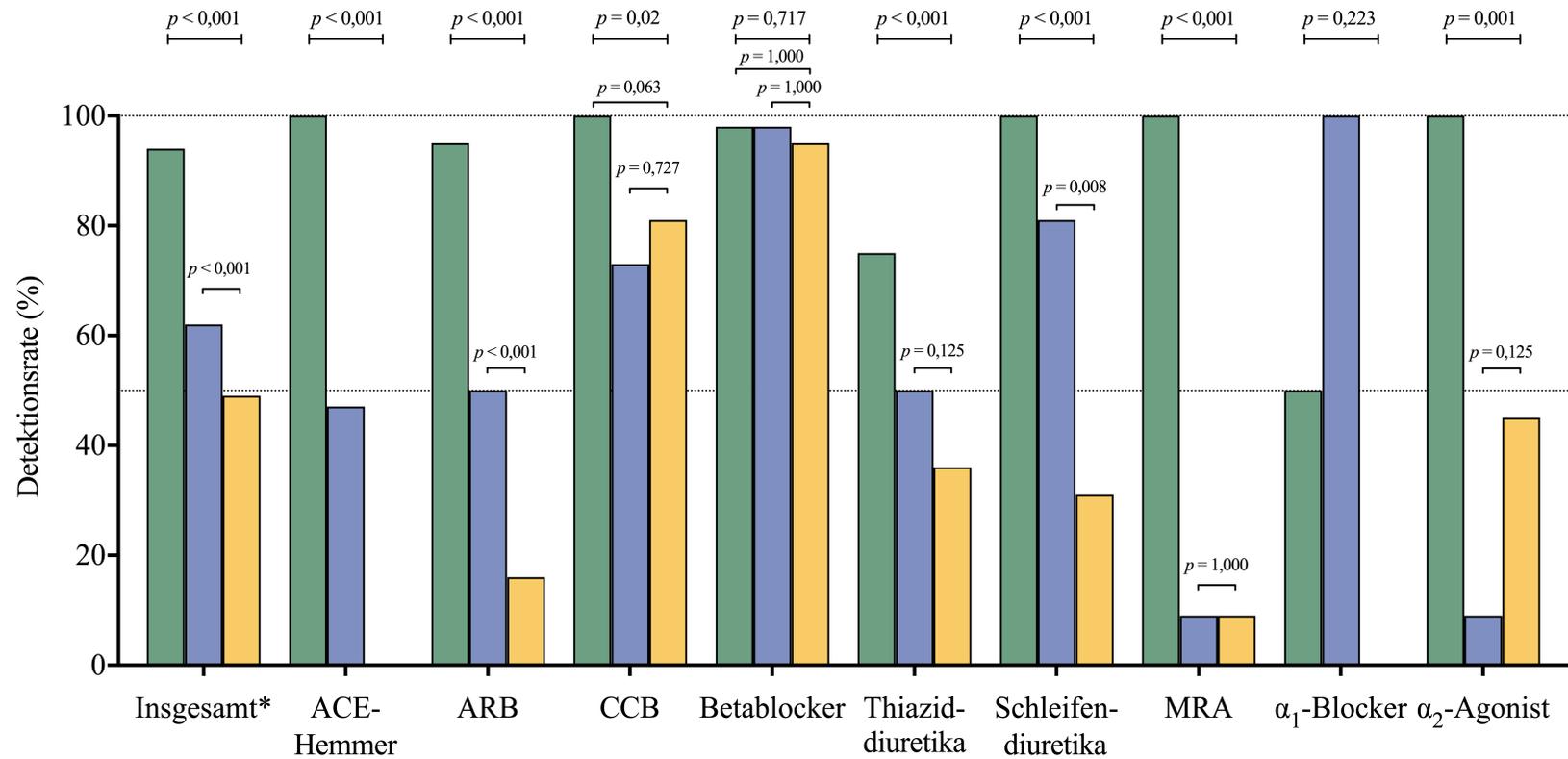


Abbildung 7: Beispiel eines LC-HRMS/MS Chromatogramms

Die Analyse der Medikamentenpläne aller Patienten ergab, dass insgesamt 215 Bluthochdruckmedikamente verordnet wurden. Davon konnten 182 Medikamente oder deren Metaboliten nachgewiesen werden. Die in dieser Studie durchgeführte LC-HRMS/MS konnte die meisten Antihypertensiva im Urin (n=181) nachweisen, gefolgt von Blutplasma (n= 119) und Speichel (n=88) mit einer geringeren Anzahl an nachgewiesenen antihypertensiven Medikamenten ( $p < 0,001$ ). Abbildung 8 zeigt die Detektionsraten von Bluthochdruckmedikamenten in den jeweils untersuchten Medien Urin, Blutplasma und Speichel. Zum einen wurden die p-Werte für den Vergleich der Anzahl an nachgewiesenen antihypertensiven Medikamenten zwischen allen untersuchten Medien berechnet, hierfür wurde der Cochran Q-Test verwendet. Zum anderen wurden die p-Werte für den Vergleich zwischen den Gruppen untereinander, also den Vergleich von Speichel mit Blutplasma oder Urin berechnet, dafür kam der McNemar-Test zur Anwendung. Da lediglich ein Patient ein Kalium-sparendes Diuretikum erhielt, ist dieses nicht explizit in der Abbildung aufgeführt.

## Ergebnisse



Nachweis <sup>†</sup>	Insgesamt*	ACE-Hemmer	ARB	CCB	Betablocker	Thiazid-diuretika	Schleifen-diuretika	MRA	α <sub>1</sub> -Blocker	α <sub>2</sub> -Agonist
■ Nachweis im Urin	192	17	38	26	42	28	16	11	2	11
■ Nachweis im Plasma	119	8	19	19	41	14	13	1	2	1
■ Nachweis im Speichel	88	0	6	21	40	10	5	1	0	5

Abbildung 8: Vergleich der Detektionsraten der Bluthochdruckmedikamente; <sup>†</sup> die Anzahl der detektierten Medikamente wurde hier korrigiert für SPC. \*Die Gesamtzahl der detektierten Medikamente beinhaltet Triamteren.

## Ergebnisse

Bei allen Substanzklassen war die Detektionsrate der angewendeten LC-HRMS/MS im Urin am höchsten, herauszunehmen ist hier nur die Klasse der Alpha1-Blocker. Bei Medikamenten mit enthaltener Säuregruppe war die Detektionsrate im Speichel kleiner. Bei solchen Medikamenten mit Säuregruppe handelt es sich zum Beispiel um ACE-Hemmer, ARB und Thiaziddiuretika.

Beim Vergleich der LC-HRMS/MS von Speichel mit der von Blutplasma stellte sich heraus, dass zwischen den Medien kein statistischer Unterschied in der Häufigkeit des Nachweises von CCB ( $p=0,727$ ), BB ( $p=1,000$ ), Thiaziddiuretika ( $p=0,125$ ) und Alpha2-Agonisten ( $p=0,125$ ) bestand. Diese Substanzklassen ließen sich also sowohl im Speichel als auch im Blutplasma gleich gut nachweisen. Darüber hinaus fiel beim Vergleich von Speichel mit Urin auf, dass kein statistisch signifikanter Unterschied in der Detektionsrate von CCB ( $p=0,063$ ) und BB ( $p=1,000$ ) zwischen den beiden Medien zu finden war.

Die Detektionsrate von Medikamenten im Speichel wurde nicht durch eine Komedikation mit Auswirkung auf den Speichelfluss beeinflusst. Es bestand kein Unterschied in den Nachweisraten im Speichel bei Patienten mit oder ohne Begleitmedikation, die möglicherweise einen verringerten Speichelfluss bewirkt, wie zum Beispiel Domperidon ( $p=0,651$ ), oder die häufig eine Xerostomie zur Folge hat, wie beispielsweise Amiodaron ( $p=0,702$ ).

Komorbiditäten mit bekannter Auswirkung auf den Speichelfluss, wie zum Beispiel Diabetes mellitus ( $p=0,626$ ) oder chronische Niereninsuffizienz ( $p=0,059$ ), hatten keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Medikamenten im Speichel. Es bestand kein Unterschied zwischen den Medikamenten-Detektionsraten bei Patienten mit diesen Nebendiagnosen im Vergleich zu solchen ohne diesen Nebendiagnosen.

Die Interrater-Reliabilität wurde von den Urin-, Blutplasma- und Speichelproben aller 56 Patienten beurteilt. Beim Medikamentennachweis reichte Cohen's  $\kappa$  von 0,14 bis 1,00 für Urin und Blutplasma, von -0,14 bis 0,87 für Urin und Speichel und von 0,31 bis 1,00 für Blutplasma und Speichel. Fleiss'  $\kappa$  reicht beim Vergleich aller drei Medien von 0,17 bis 0,91. Tabelle 7 zeigt die Interrater-Reliabilität des Medikamentennachweises zwischen Urin-, Blutplasma- und Speichelproben.

## Ergebnisse

*Tabelle 7: Interrater-Reliabilität des Medikamentennachweises zwischen Urin-, Blutplasma- und Speichelproben*

Antihypertensive Medikation	Anzahl der Verschrei- bungen	Urin und Blutplasma		Urin und Speichel		Blutplasma und Speichel		Fleiss' $\kappa$
		% Überein- stimmung	$\kappa$ (95% CI)	% Überein- stimmung	$\kappa$ (95% CI)	% Überein- stimmung	$\kappa$ (95% CI)	
ACE-Hemmer	18	84	0,55 (0,31; 0,79)	70	*	86	*	0,20 (0,05; 0,35)
ARB	38	73	0,50 (0,19; 0,31)	50	-0,14 (0,03; 0,26)	77	0,38 (0,15; 0,61)	0,27 (0,12; 0,42)
CCB	33	88	0,74 (0,57; 0,91)	91	0,82 (0,67; 0,97)	86	0,69 (0,49; 0,89)	0,75 (0,60; 0,90)
Thiazide	30	88	0,71 (0,52; 0,90)	80	0,53 (0,31; 0,75)	93	0,79 (0,59; 0,98)	0,67 (0,52; 0,82)
Schleifendiuretika	17	95	0,86 (0,71; 1,01)	80	0,39 (0,14; 0,65)	86	0,49 (0,21; 0,77)	0,59 (0,44; 0,75)
Triamteren	1	100	1,00 (1,00; 1,00)	98	*	98	*	0,49 (0,34; 0,65)
BB	48	96	0,91 (0,79; 1,03)	95	0,87 (0,72; 1,01)	98	0,96 (0,87; 1,04)	0,91 (0,76; 1,06)
MRA	15	82	0,14 (-0,11; 0,38)	82	0,14 (-0,11; 0,38)	100	1,00 (1,00; 1,00)	0,17 (0,02; 0,32)
Alpha1-Blocker	3	98	0,66 (0,04; 1,28)	98	*	96	*	0,32 (0,17; 0,47)
Alpha2-Agonist	14	82	0,14 (-0,11; 0,38)	89	0,57 (0,28; 0,87)	93	0,31 (-0,16; 0,79)	0,35 (0,19; 0,50)

\* Berechnung von Cohen's  $\kappa$  nicht möglich, da das Medikament im Speichel nicht detektiert wurde; 95% CI = 95% Konfidenzintervall.

## 5 Diskussion

Die zur direkten Adhärenzmessung verwendete LC-HRMS/MS hatte die höchste Detektionsrate von Medikamenten/Metaboliten im Urin. Die zweit- bzw. dritthöchste Detektionsrate war im Blutplasma bzw. Speichel zu finden. Antihypertensiva, die eine Säuregruppe enthalten, waren im Speichel nur schlecht nachzuweisen, gut wiederum solche ohne Säuregruppe. Beispiele für Substanzklassen mit Säuregruppe sind ACE-Hemmer und ARB, Wirkstoffklassen ohne Säuregruppe sind CCB und BB. Eine Begleitmedikation oder eine Komorbidität mit einer möglichen Auswirkung auf den Speichelfluss, zeigte keinen negativen Effekt auf die Nachweisbarkeit von Medikamenten im Speichel. In dieser Studie waren 59% (66% nach Korrektur für SPC) aller untersuchten Patienten adhärent, sie nahmen alle Bluthochdruckmedikamente gemäß ihres Medikamentenplans ein. Insgesamt 29% (23% nach Korrektur für SPC) waren teilweise adhärent und 13% (11% nach Korrektur für SPC) nicht-adhärent, sie nahmen ein bzw. mindestens zwei ihrer Medikamente nicht. Verglichen mit nicht-adhären oder teilweise adhären Patienten, bestand bei adhären Patienten zum einen der Medikamentenplan aus weniger antihypertensiven Medikamenten und zum anderen hatten sie täglich eine geringere Anzahl an Einzeldosen einzunehmen. Darüber hinaus war bei adhären Patienten ein signifikant niedrigerer systolischer und diastolischer Blutdruck in der 24h-Langzeitblutdruckmessung zu dokumentieren. Es bestand zwischen den drei Patientengruppen (adhärent vs. teilweise adhärent vs. nicht-adhärent) kein relevanter Unterschied hinsichtlich der Therapie mit unterschiedlichen antihypertensiven Wirkstoffklassen (ausgenommen Alpha2-Agonisten, MRA und Alpha1-Blocker).

In der vorliegenden Studie war mangelnde Adhärenz gegenüber einer medikamentösen antihypertensiven Therapie ein häufiges Problem. Die Rate an nicht- oder nur teilweise adhären Patienten war hoch (ca. 41%; 34% nach Korrektur für SPC). Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, die eine LC-HRMS/MS des Urins oder des Blutplasmas zur Adhärenzmessung nutzten und vergleichbare Adhärenzraten berichteten [2,35,73]. Gerade bei chronischen, oft asymptomatischen Erkrankungen mit der Notwendigkeit einer täglichen Medikamenteneinnahme, ist Nicht-Adhärenz gegenüber dem Therapieregime ein häufiges Problem [17,23]. Nach Erstdiagnose der arteriellen Hypertonie und Initiierung einer medikamentösen Therapie startet ungefähr ein Drittel aller Patienten nie mit der Einnahme der verschriebenen antihypertensiven Medikation [23]. Von den Patienten, die zwar mit der Einnahme der antihypertensiven Pharmakotherapie beginnen, werden 50% innerhalb eines Jahres nicht-adhären [77]. Für Nicht-Adhärenz gibt es viele Gründe, wie zum Beispiel eine mangelnde Aufklärung des Patienten über die Therapie oder die Erkrankung, eine schlechte Arzt-Patienten-Beziehung bzw. unzureichende Kommunikation zwischen Arzt und Patient, das Auftreten von Medikamentennebenwirkungen, ein komplexer Medikamentenplan, welcher dem Patienten

## Diskussion

Schwierigkeiten in der Umsetzung bereitet, das Anfallen von Zuzahlungskosten für Medikamente, fehlendes Verständnis des Patienten für die Notwendigkeit einer Therapie, eine hohe Anzahl an täglich einzunehmenden Tabletten oder eine asymptomatische Erkrankung [22,33,56,74]. Problematisch dabei ist, dass Nicht-Adhärenz gegenüber einer antihypertensiven Therapie das kardiovaskuläre Risiko erhöht [23,33]. Deshalb sollte diese erkannt werden, um Maßnahmen zu ergreifen, die die Adhärenz verbessern können [6,14,23,33,56]. Auch die aktuellen Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie/Europäischen Gesellschaft für Hypertonie empfehlen Maßnahmen zur Förderung von adhärentem Verhalten [82]. Geraten wird hier zu einem einfachen Therapieschema mit der Verschreibung von SPC, um die Tablettenlast zu reduzieren [82], denn es konnte gezeigt werden, dass der Gebrauch von SPC mit einer besseren Adhärenz assoziiert ist [28,82]. Des Weiteren wird der Gebrauch von Geräten, die den Patienten an eine bevorstehende Medikamenteneinnahme erinnern (z.B. Apps für das Smartphone), empfohlen [82]. Eine Schulung des Patienten, die Tabletteneinnahme mit Dingen des täglichen Lebens, wie beispielsweise dem Zähneputzen, zu verbinden (als Erinnerungshilfe), kann gerade bei älteren Patienten ohne technische Ausstattung sinnvoll sein [82]. Außerdem zeigte sich, dass die Durchführung einer direkte Adhärenzmessung an sich, eine verbesserte Blutdruckkontrolle zur Folge hatte [8,28,30]. All diese Punkte untermauern die Wichtigkeit der Adhärenzmessung bei Patienten mit Hypertonie.

Eine große Meta-Analyse zeigte, dass die verordnete antihypertensive Substanzklasse einen Einfluss auf das jeweilige Adhärenzverhalten haben kann [38]. Das heißt, dass Unterschiede in der Adhärenz gegenüber den verschiedenen Medikamentenklassen zu finden waren [38]. Dabei waren Diuretika und BB mit niedrigen Adhärenzraten assoziiert, wohingegen ACE-Hemmer und ARB mit einer höheren Adhärenz assoziiert waren [38]. Ein möglicher Grund könnte das unterschiedliche Nebenwirkungsprofil der einzelnen Substanzklassen sein [38]. Beispielsweise kann die Einnahme von Diuretika mit Harndrang, erektiler Dysfunktion, Müdigkeit und Muskelkrämpfe einhergehen, wohingegen ARB das niedrigste Nebenwirkungsprofil zeigen [38,82]. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie nicht repliziert werden. Die Adhärenz war unabhängig von den verordneten Substanzklassen, welche zur Behandlung des Bluthochdrucks zum Einsatz kamen. Als möglicher Grund für das Fehlen signifikanter Unterschiede wäre die relativ geringere Fallzahl im Vergleich zur großen Metaanalyse mit über 900.000 Patienten denkbar [38]. Denn Untersuchungen mit großen Patientenpopulationen erbringen aufgrund der hohen Teststärke bzw. Power eher signifikante Ergebnisse, im Vergleich zu Studien mit kleineren Fallzahlen. Ferner gilt es zu beachten, dass die untersuchten Patienten in einer Spezialambulanz für Hochdruckerkrankungen vorstellig waren, sodass ein Selektionsbias nicht auszuschließen ist.

Falls ein Patient mit einem leitliniengerechten, medikamentösen Therapieplan den Zielblutdruck nicht erreicht, sollte an Nicht-Adhärenz gedacht werden, da dies ein häufiger Grund für eine unzureichende

## Diskussion

Blutdruckkontrolle ist [33,82]. Deshalb wird in den aktuellen Leitlinien darauf hingewiesen, bei einer insuffizienten Blutdruckkontrolle Nicht-Adhärenz als einer der Hauptgründe in Betracht zu ziehen [82]. Dabei ist die toxikologische Analyse mithilfe der LC-HRMS/MS von Urin und Blutplasma die genaueste Methode zur Beurteilung der Adhärenz [29,33,41,56]. Dieses Verfahren wird deshalb auch empfohlen, um die Blutdruckkontrollrate zu verbessern [8,28,82]. Dennoch kommt diese Methode, unter anderem aus Kostengründen, wegen der Notwendigkeit einer invasiven Probengewinnung und der aufwendigen Probenaufarbeitung, selten klinisch zur Anwendung [33,56]. Aus diesen Gründen wäre die Entwicklung eines einfacher anwendbaren und validen Medikamentennachweisverfahren notwendig [9,29,82]. Dieses sollte nach Möglichkeit ohne invasive Probengewinnung durchzuführen sein und wenig apparative Maßnahmen zur Aufarbeitung der Proben benötigen [9,29,82]. Aufgrund dessen wurde in dieser Studie erstmals die Durchführbarkeit einer Adhärenzmessung von antihypertensiven Medikamenten im Speichel untersucht. Das „neue“ Medium Speichel wurde mit den gängigen Analysesubstanzen Blutplasma und Urin, die normalerweise zur massenspektrometrischen Aufarbeitung genutzt werden, verglichen. Der Vorteil der Verwendung von Speichel ist vor allem die Probengewinnung und deren Stabilität/Haltbarkeit. Denn zur Entnahme von Blut wird medizinisches Personal, die entsprechende Ausrüstung sowie passende räumliche Gegebenheiten benötigt. Hinzu kommt, dass eine Blutentnahme nicht nur einen invasiven Eingriff darstellt, sondern auch oftmals von Seiten des Patienten mit einem gewissen Unbehagen einhergeht. Genauso stellt die Uringewinnung einen Eingriff in die Privatsphäre des Patienten dar. Anders ist die Situation bei der Speichelgewinnung, diese ist nicht-invasiv, benötigt kein medizinisches Fachpersonal zur Abnahme und die Probenentnahme bewirkt ein geringeres (bis gar kein) Unbehagen beim Patienten. Denn gerade das Unbehagen bzw. die Angst vor einem Eingriff, wie zum Beispiel einer Blutentnahme, könnte wiederum einen negativen Einfluss auf die Adhärenz des Patienten haben [41] und dazu führen, dass ein Termin nicht wahrgenommen wird.

Ein weiterer Vorteil für die Verwendung von Speichel als Medium ist, dass dieser im Vergleich zu Blutplasma oder Urin nicht zwangsläufig in einer Arztpraxis oder Klinik entnommen werden muss. Es ist denkbar, dass der Patient die Probe zuhause eigenhändig gewinnt (in einem „out of office setting“) und diese seinem behandelten Arzt zukommen lässt. Ein unmittelbares Einfrieren bzw. Bearbeiten der Probe (zentrifugieren oder Aufbereitung) ist im Gegensatz zur Verwendung von Urin oder Blutplasma nicht erforderlich. Das Proberöhrchen mit dem Speichel und der enthaltenen Pufferlösung kann bis zu zwei Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden, wobei die Nachweisbarkeit der Medikamente erhalten bleibt (Quelle: Herstellerangaben Immunoanalysis Quantisal).

Die meisten Medikamente diffundieren passiv in den Speichel und werden nicht aktiv sezerniert [41]. Dabei hängt die Speichel/Blutplasma-Ratio der Wirkstoffe unter anderem von dem Konzentrationsgradienten des freien (ungebundenen) Anteils des Wirkstoffs im Blut, dem pH-Wert von

## Diskussion

sowohl Blut und Speichel, der Proteinbindung sowie der Säurekonstante (pKs) ab [34,48]. Zu beachten ist, dass Medikamente mit hoher Proteinbindung und saure Pharmaka eine geringe Konzentration im Speichel aufweisen [15,18]. Das Gleichgewicht Speichel-Blutplasma liegt also auf Seiten des Blutes [15,18]. Weitere Einflussfaktoren auf die Speichelkonzentration von Medikamenten sind die Molekülgröße und der Grad an Lipophilie/Hydrophilie [15,18]. So haben zum Beispiel Diazepam oder andere Benzodiazepine eine geringe Konzentrationen im Speichel aufgrund der hohen Proteinbindung und ihres schwach sauren Charakters [18]. Ähnlich verhält es sich mit den leicht aziden ACE-Hemmern, ARB und Thiaziddiuretika, die auch in dieser Studie nur geringe Detektionsraten im Speichel und Hohe im Blutplasma oder Urin hatten. Dagegen konnten sowohl für CCB als auch für BB vergleichbare Detektionsraten im Speichel und Urin ( $p=0,063$  bzw.  $p=1,000$ ) bzw. im Speichel und Blutplasma ( $p=0,727$  bzw.  $p=1,000$ ) gezeigt werden. Die hier verwendete LC-HRMS/MS konnte die meisten Antihypertensiva im Urin nachweisen. Weniger Wirkstoffe waren in absteigender Reihenfolge im Blutplasma und im Speichel zu finden. Dies legt nahe, dass der Urin in den meisten Fällen das Medium der Wahl zur Adhärenzmessung ist.

Bezüglich der klinischen Anwendung von Adhärenzmessung im Speichel, gilt folgendes zu berücksichtigen. Da die empfohlenen Kombinationspräparate (SPC), die bei Therapieeinleitung bei den meisten Patienten zur Anwendung kommen [82], einen RAS-Inhibitor (ACE-Hemmer oder ARB) in Verbindung mit einem CCB oder einem Diuretikum enthalten, könnte der Nachweis einer Substanz ausreichen, um eine vollständige Adhärenz aller Substanzen der SPC anzunehmen. Gängige Kombinationspartner mit einem RAS-Inhibitor in Deutschland sind Amlodipin oder Hydrochlorothiazid (HCT) [65–67,82,83]. Aufgrund des Rote-Hand-Briefs vom Oktober 2018 zu HCT [5], welcher vor einem vermehrten Auftreten von Basaliomen oder Spinaliomen unter Therapie mit HCT warnt, ist der Absatz von HCT nachweislich zurückgegangen [45]. Eine Analyse legt nahe, dass nach der Veröffentlichung des Rote-Hand-Briefes im Oktober 2018 die Absätze aller Thiazid-Diuretika (inklusive HCT) kontinuierlich abnahm [45]. Im zweiten Halbjahr 2019 sank der monatliche Absatz der Thiazid-Diuretika um 347.200 Packungen, während sich der Absatz aller anderen Wirkstoffklassen um insgesamt 766.200 Packungen erhöhte [45]. Der größte Teil betraf ACE-Hemmer/ARB und CCB[45]. Insgesamt wurden somit 418.900 Packungen mehr abgesetzt[45]. Ob aufgrund der verringerten Verschreibungsrate des Diuretikums eine andere Substanzklasse öfters verordnet wurde, bleibt letztlich ungewiss [45], wäre aber denkbar. Bei einer Zunahme der Verordnung von CCB als Kombinationspartner mit guter Detektionsrate im Speichel, wäre der Nachweis dieser Leitsubstanz hilfreich, um die Adhärenz zu bestimmen.

Bei der Interpretation von toxikologischen Befunden zur Adhärenzmessung gilt es zu berücksichtigen, dass eine alleinige Untersuchung des Urins nicht sinnvoll ist, da so eine Überschätzung der Adhärenz durch falsch-positive Ergebnisse denkbar wäre. Bis keine Medikamentenrückstände im Urin mehr zu

## Diskussion

finden sind, vergehen mindestens vier Halbwertszeiten [29], sodass die Auswaschphasen, bis die meisten Antihypertensiva im Urin nicht mehr nachzuweisen sind, meist mehr als 24 Stunden dauern [29]. Das bedeutet, dass der fehlende Nachweis eines Antihypertensivums im Urin eine Nicht-Adhärenz bestätigt, die mindestens schon eine solche Zeit besteht, die vier Halbwertszeiten des Medikaments entspricht [29]. Dies soll am Beispiel von Amlodipin verdeutlicht werden: die Halbwertszeit beträgt 35-70 Stunden, vier Halbwertszeiten ergeben also 140-280 Stunden [29]. Ein fehlender Nachweis von Amlodipin im Urin legt ein nicht adhärentes Verhalten seit mindestens 5,8 Tagen nahe. Die letzte Einnahme von Amlodipin liegt also  $\geq 5,8$  Tage vor der Urinprobengewinnung [29]. Umgekehrt heißt es aber nicht, dass das Vorhandensein von Amlodipin im Urin eine kürzlich zurückliegende Medikamenteneinnahme bedeuten muss. Die letzte Medikamenteneinnahme könnte beispielsweise 4 Tage zurück liegen, wobei Amlodipin weiterhin im Urin zu finden wäre.

Der Großteil des Speichels wird von den drei paarigen Hauptspeicheldrüsen, Glandula parotis, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis unter Einfluss des sympathischen und des parasympathischen Nervensystems sezerniert [1]. Einen geringeren Teil tragen die ca. 450-750 im Zahnfleisch liegenden, akzessorischen, kleinen Speicheldrüsen zur Speichelproduktion bei [1]. Dabei beinhaltet der Speichel im Mundraum vor allem Wasser, Epithelzellen, Leukozyten, Enzyme und Elektrolyte [1]. Eine größere Speichelflussrate bewirkt höhere Bikarbonatkonzentrationen und somit einen höheren pH [1,34,54]. Der pH-Wert des Speichels hängt dabei stark von physiologischen Gegebenheiten ab und schwankt zwischen 6,0-8,0 [1,34,54]. Unter Ruhebedingungen liegt der Speichel-pH bei ca. 7,0 [1]. Etwa 500-1500 ml (im Vergleich zum Blutplasma) hypotoner Speichel werden täglich produziert [1]. Sowohl die Menge als auch die Elektrolytkonzentration und die Zusammensetzung sind nicht konstant, sondern unterliegen zum einen dem autonomen Nervensystem und dem zirkadianen Rhythmus und zum anderen diversen Einflussfaktoren, die den Speichelfluss fördern/hemmen können [1]. Fördernde Stimuli sind unter anderem Geschmacks- und Geruchsreize, mechanische Stimulation über Kauen, Schmerzen, Schwangerschaftshormone, aggressive Emotionen sowie sympathomimetische und parasympathomimetische Medikamente [1]. Hemmende Einflüsse haben dagegen zum Beispiel Stress, antiadrenerge und anticholinerge Medikamente [1].

Sollen Inhaltsstoffe (auch Medikamente) im Speichel bestimmt werden, muss beachtet werden, dass das Ergebnis von vielen Faktoren abhängen kann: der Kooperation des Patienten, der Ernährung, dem psychischen Status (Ärger, Angst, Hunger), der Einnahme von Medikamenten (Antidepressiva), der Art der Probengewinnung, ob bei der Probengewinnung eine Speichelflussstimulation verwendet wurde, der Tageszeit und dem Vorliegen von Komorbiditäten (Mukoviszidose, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz) [1,18,37,51]. Deshalb müssen bei der Abnahme der Speichelprobe alle oben genannten Faktoren mit Einfluss auf den Speichelfluss berücksichtigt werden. Am besten sollte die Speichelprobengewinnung unter standardisierten Bedingungen ablaufen (gleiche Tageszeit, in Ruhe).

## Diskussion

Es sollte geprüft werden, ob Erkrankungen oder Medikamente mit Einfluss auf die Speichelsekretion auch eine (negative) Auswirkung auf die Nachweisbarkeit von Pharmaka im Speichel haben. In dieser Studie gab es keine Unterschiede bei dem Nachweis von Medikamenten bei Patienten mit oder ohne Diabetes mellitus ( $p=0,626$ ) oder chronischer Niereninsuffizienz ( $p=0,059$ ). Auch das Vorhandensein einer Komedikation mit bekanntem Einfluss auf den Speichelfluss wie Domperidon oder Amiodaron hatte keine negative Auswirkung auf die Nachweisraten der antihypertensiven Medikamente ( $p>0,651$ ).

Bei der Speichelprobengewinnung kann die Anwendung von Speichelfluss erhöhenden Techniken auch einen Einfluss auf die Konzentration des untersuchten Medikaments haben [18]. Beispielsweise wurde untersucht, ob die Anwendung einer Speichelfluss fördernden Säuregabe vor der Probenentnahme einen Einfluss auf die Codeinkonzentration im Speichel hat [15]. Es stellte sich hierbei heraus, dass die Speichelkonzentration von Codein bei der Patientengruppe ohne eine solche Stimulation 3,6-mal höher war, als die der Gruppe mit der Stimulation [15]. Zum Ausschluss solcher Störfaktoren, wurde in dieser Studie bei der Abnahme der Speichelprobe auf solche Stimuli verzichtet.

Die Datenlage, wie lange Medikamente im Speichel nachzuweisen sind, ist momentan noch limitiert. Missbräuchlich eingesetzte Drogen sind im Speichel nur deutlich kürzer nachzuweisen als im Urin [76]. Somit bleibt Urin wahrscheinlich weiterhin Untersuchungsmedium der Wahl zur Durchführung qualitativer Analysen, wie zum Beispiel dem Screenen nach Nicht-Adhärenz. Um aber die aktuelle/kürzlich zurückliegende Medikamenteneinnahme zu überprüfen, sollte zusätzlich eine LC-HRMS/MS eines weiteren Mediums (Plasma oder Speichel) erfolgen. Obwohl die vorliegende Studie darauf ausgelegt war, die Durchführbarkeit qualitativer Analysen von antihypertensiven Medikamenten zu überprüfen, deuten kürzlich veröffentlichte Daten daraufhin, dass Speichel auch für quantitative Analysen verwendet werden könnte [10,49]. Zum Beispiel nahmen 12 gesunde Probanden eine einmalige Dosis Tramadol (oral) ein [49]. Über einen Zeitraum von 48 h wurde ihnen wiederholt Speichel entnommen [49]. Es zeigte sich, dass nicht nur ein qualitativer Nachweis im Speichel möglich war, sondern auch eine Konzentrationsbestimmung sowohl des Wirkstoffs Tramadol, als auch des Metaboliten O-Desmethyltramadol womit die Erstellung von Konzentrations-Zeit-Diagrammen der Substanz möglich ist [49].

### 5.1 Limitationen

Primäres Ziel dieser Querschnittstudie war die Beurteilung der Durchführbarkeit einer direkten Adhärenzmessung von antihypertensiven Medikamenten im Speichel mittels LC-HRMS/MS. Dieses Medium hat einige Vorteile gegenüber den gängigen Medien der Massenspektrometrie (Blutplasma, Urin): nicht invasive Gewinnung von Speichel, Probengewinnung ohne medizinisches Personal, „out of

## Diskussion

office“ Abnahme der Probe, kein Eingriff in die Privatsphäre bzw. kein Unbehagen bei Abnahme der Probe. Allerdings gibt es auch Nachteile: die Konzentration von Wirkstoffen im Speichel ist abhängig von diversen Einflussfaktoren. Die meisten Medikamente diffundieren passiv in den Speichel. Das Speichel/Blutplasma-Verhältnis der Wirkstoffe hängt dabei nicht nur vom Konzentrationsgradienten ab, sondern auch vom pH des Speichels. Dieser wiederum kann unter anderem durch eine Komedikation, Komorbiditäten und das autonome Nervensystem beeinflusst werden. Eine ungünstige Konstellation dieser Einflussfaktoren könnte den Nachweis der Wirkstoffe beeinflussen.

In dieser Machbarkeitsstudie (Feasibility Studie) war die Fallzahl an untersuchten Patienten relativ gering und gründete nicht auf einer vorherigen Trennschärfe-Kalkulation. Folglich sollten die Ergebnisse als hypothesengenerierend angesehen werden. Eine Bestätigung der gewonnenen Erkenntnisse mithilfe weiterer Studien mit größeren Fallzahlen ist notwendig. Da es sich um die erste Studie handelt, bei der Antihypertensiva im Speichel bestimmt wurden, stellt diese Untersuchung einen wichtigen ersten Schritt dar.

Eine Adhärenzmessung an lediglich einer Visite spiegelt den komplexen und dynamischen Prozess der medikamentösen Adhärenz nur unvollständig wider. Das Verhalten wie und ob der Patient seine Medikamente wie verordnet einnimmt, also die Adhärenz bezogen auf die Einhaltung eines Medikamentenplans, beinhaltet drei Hauptkomponenten: die Initiierung des neu verschriebenen Medikaments, die mehr oder weniger konforme Einhaltung des Medikamentenplans und die Unterbrechung der Einnahme [78]. Mit einer einzigen Messung kann dieser Prozess nicht vollständig erfasst werden.

Die Probenentnahme fand zwischen November 2017 und März 2018 statt und somit vor der Publikation der 2018 Leitlinie zur Behandlung der arteriellen Hypertonie [82]. Daher wurden die Patienten in dem Zeitraum der Messungen noch gemäß den Empfehlungen der Leitlinie aus 2013 behandelt, die keine SPC als Initialtherapie für die meisten Patienten vorsah [47]. Deshalb war die Verschreibungsrate an SPC relativ gering (36%). Zum jetzigen Zeitpunkt sind sicherlich mehr Patienten auf Zwei- oder Dreifachkombinationen in Form einer SPC eingestellt. Der häufig enthaltende CCB könnte als Leitsubstanz dienen und mittels der LC-HRMS/MS des Speichels nachgewiesen werden und in der Konsequenz des Nachweises, wäre von einer vollständigen Adhärenz aller Substanzen der SPC auszugehen.

Das Studienprotokoll sah keine direkte Überwachung der Medikamenteneinnahme durch eine unabhängige Person vor (engl. directly observed drug intake). Es ist daher ungewiss, ob die Patienten ihre Medikamente am Tag der Messung eingenommen hatten, obwohl sie hierzu im Vorfeld angehalten wurden. Deshalb wurden Blut und Urin als Referenzsubstanzen zusätzlich untersucht. Doch wie bereits

## Diskussion

erläutert, ist vor allem Urin anfällig für falsch-positive Ergebnisse zur Beurteilung der aktuellen Medikamenteneinnahme. Eine zweite Messreihe mit Überwachung der Medikamenteneinnahme und resultierender 100%-iger Adhärenzrate wäre somit zweckmäßig, um sich auf die Detektionsraten in den unterschiedlichen Medien zu konzentrieren.

## 5.2 Fazit

Abschließend sollen nochmal die wichtigsten Ergebnisse der Adhärenzmessung zusammengefasst werden:

- Ungefähr ein Drittel aller untersuchten Patienten war nicht (ausreichend) adhärenzbezogen auf die Einhaltung eines medikamentösen Therapieplans, was die Notwendigkeit der Adhärenzmessung unterstreicht.
- Eine höhere Anzahl an antihypertensiven Medikamenten und eine höhere Anzahl an täglichen Einzeldosen, also eine höhere „Tablettenlast“, war dabei assoziiert mit dem Auftreten von nicht-adhärentem Verhalten.
- Nicht-Adhärenz war wiederum verbunden mit einem signifikant höheren systolischen und diastolischen 24h-Langzeitblutdruck. Adhärenz ging mit einer besseren Blutdruckkontrolle einher.
- Die Adhärenz war in dieser Studie weitgehend unabhängig von der verordneten Medikamentenklasse.

## Diskussion

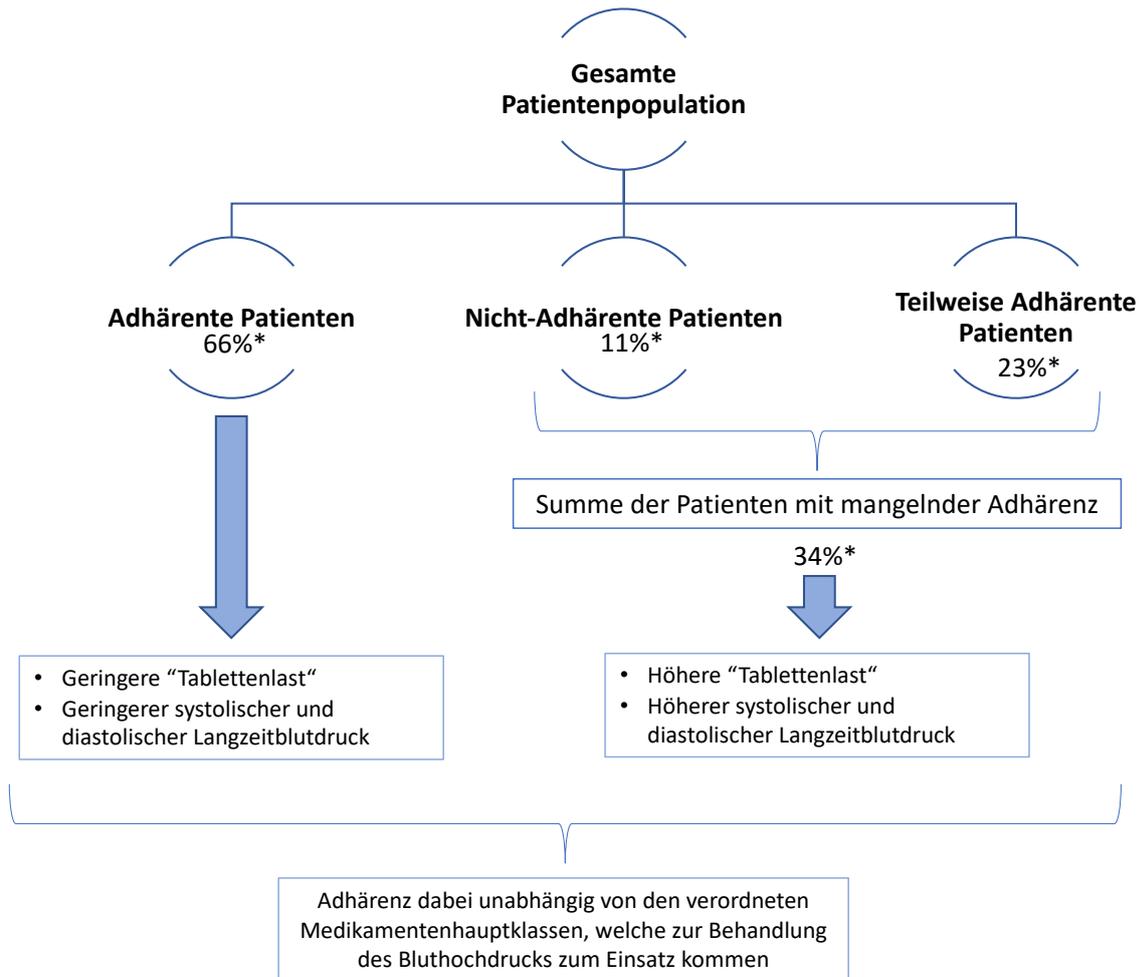


Abbildung 9: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Adhärenzmessung; \*Adhärenzraten korrigiert für SPC.

Die wichtigsten Ergebnisse der Analysen waren dabei:

- Dies ist die erste Studie, die untersucht, ob antihypertensive Medikamente im Speichel nachgewiesen werden können. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis einiger Bluthochdruckmedikamente oder deren Metaboliten im Speichel möglich ist, obgleich die meisten Medikamente im Urin detektiert wurden.
- Nicht saure Antihypertensiva (zum Beispiel CCB oder BB) waren gut im Speichel zu detektieren. Die Detektionsraten dieser Medikamente waren in den unterschiedlichen Medien (Urin, Blut, Speichel) vergleichbar.
- Saure antihypertensive Medikamente (zum Beispiel ACE-Hemmer, ARB, Thiaziddiuretika) ließen sich schlechter im Speichel nachweisen verglichen mit Urin oder Blut.
- Das Vorhandensein einer Komorbidität oder die Einnahme einer Komedikation mit Einfluss auf den Speichelfluss wirkten sich nicht nachteilig auf die Nachweisraten der Medikamente im Speichel aus.

## Diskussion

Abbildung 10 (links) stellt in Trapezform die unterschiedliche Häufigkeit an detektierten Medikamenten in den verschiedenen Medien dar (Zahlen in Klammer = Anzahl der detektierten Substanzen in den jeweiligen Medien). Die rechte Seite von Abbildung 10 zeigt nochmal knapp die einzelnen Vor- und Nachteile des Speichels als Untersuchungsmaterial für die Massenspektrometrie.

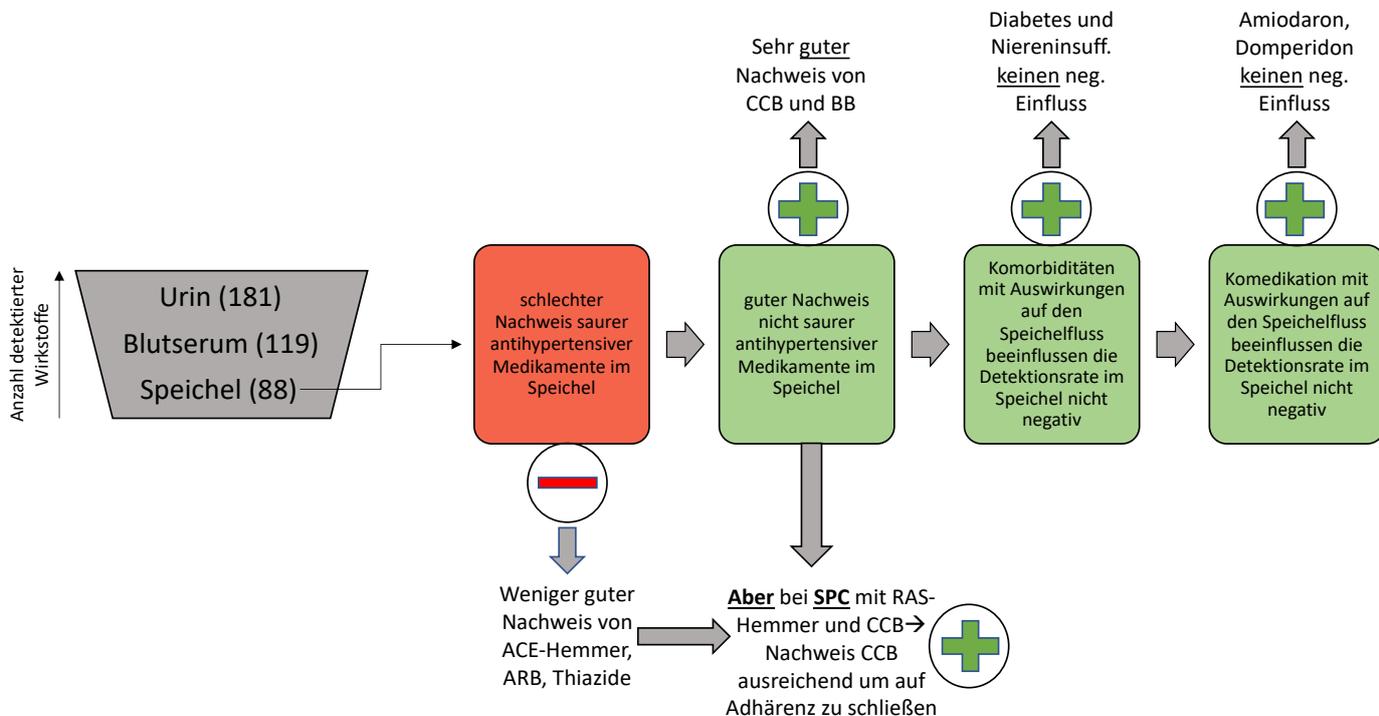


Abbildung 10: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Analysen (Zahlen in Klammern= Anzahl der detektierten Medikamente im jeweiligen Medium)

### 5.3 Perspektive

Eine Überprüfung der medikamentösen Adhärenz bei Bluthochdruckpatienten kann sinnvoll sein, da eine Verbesserung der Adhärenz die Verschreibung nicht notwendiger weiterer Medikamente reduzieren kann [35]. Bei einem insuffizient eingestellten Bluthochdruck sollte gemäß den aktuellen Leitlinien die Therapie intensiviert werden (Umstellung auf anderes Präparat/weiteres Medikament hinzuzufügen) [35,82]. Im Falle mangelnder Adhärenz wäre dies nicht erfolgversprechend, denn eine höhere „Tablettenlast“ ist mit reduzierter Adhärenz assoziiert [33,73]. Zielführender wäre in diesem Fall die Anwendung von Adhärenz-verbessernden Maßnahmen [56]. Somit relativieren sich auch die Kosten für eine LC-HRMS/MS, denn diese entsprechen ungefähr den Kosten von ein oder zwei weiteren Medikamenten über einen Zeitraum von sechs bis zwölf Wochen [35].

Bei nachgewiesener Nicht-Adhärenz sollten Maßnahmen angewendet werden, welche die Adhärenz verbessern können [56]. Eine verbesserte Adhärenz kann zu einer Senkung der kardiovaskulären

## Diskussion

Morbidität und Mortalität beitragen [14,33]. Des Weiteren zeigte sich, dass bei scheinbar therapieresistenten Bluthochdruckpatienten die Durchführung einer direkte Adhärenzmessung, eine verbesserte Blutdruckkontrolle zur Folge hatte [8,28,30]. Dabei wird die LC-HRMS/MS des Urins und des Blutplasmas als exakteste Methode zur Adhärenzmessung angesehen. Unter anderem aus Kostengründen und wegen der aufwendigen Probengewinnung und -verarbeitung hat diese noch nicht den Einzug in den klinischen Alltag gefunden [29,33,56]. Es besteht daher Bedarf zur Entwicklung einer einfach anwendbaren, kostengünstigen und zuverlässigen Möglichkeit der direkten Adhärenzmessung [4,9]. Eine solche wurde bislang noch nicht etabliert [4,9,56]. Von Vorteil wäre, wenn diese Methode keine invasiv gewonnenen Materialien zur Analyse benötigen würde. Da diese Studie zeigte, dass durchaus einige Antihypertensiva zuverlässig mit einer Massenspektrometrie des Speichels nachzuweisen sind, sollte dieser Ansatz als nicht-invasive Möglichkeit der direkten Adhärenzmessung, die auch außerhalb von Gesundheitseinrichtungen durchgeführt werden kann, in weiteren Studien untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aps JKM, Martens LC (2005) Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 150:119–131
2. Azizi M, Pereira H, Hamdidouche I, Gosse P, Monge M, Bobrie G, Delsart P, Mounier-Véhier C, Courand P-Y, Lantelme P, Denolle T, Dourmap-Collas C, Girerd X, Michel Halimi J, Zannad F, Ormezzano O, Vaïsse B, Herpin D, Ribstein J, Chamontin B, Mourad J-J, Ferrari E, Plouin P-F, Jullien V, Sapoval M, Chatellier G, Amar L, Lorthioir A, Pagny J-Y, Claisse G, Midulla M, Dauphin R, Fauvel JP, Rouvière O, Cremer A, Grenier N, Lebras Y, Trillaud H, Heautot JF, Larralde A, Paillard F, Cluzel P, Rosenbaum D, Alison D, Claudon M, Popovic B, Rossignol P, Baguet JP, Thony F, Bartoli JM, Drouineau J, Sosner P, Tasu JP, Velasco S, Vernhet-Kovacsik H, Bouhanick B, Rousseau H, Le Jeune S, Lopez-Sublet M, Bellmann L, Esnault V, Baguet JP, Vernhet-Kovacsik H, Durand-Zaleski I, Beregi (chair) JP, Lièvre M, Persu A (2016) Adherence to Antihypertensive Treatment and the Blood Pressure–Lowering Effects of Renal Denervation in the Renal Denervation for Hypertension (DENERHTN) Trial. *Circulation* 134:847–857
3. Banegas JR, Ruilope LM, de la Sierra A, Vinyoles E, Gorostidi M, de la Cruz JJ, Ruiz-Hurtado G, Segura J, Rodríguez-Artalejo F, Williams B (2018) Relationship between Clinic and Ambulatory Blood-Pressure Measurements and Mortality. *N Engl J Med* 378:1509–1520
4. Berra E, Azizi M, Capron A, Høieggen A, Rabbia F, Kjeldsen SE, Staessen JA, Wallemacq P, Persu A (2016) Evaluation of Adherence Should Become an Integral Part of Assessment of Patients With Apparently Treatment-Resistant Hypertension. *Hypertension* 68:297–306
5. BfArM Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2018) Rote-Hand-Brief zu Hydrochlorothiazid (HCT): Risiko von nichtmelanozytärem Hautkrebs [Basalzellkarzinom (Basaliom); Plattenepithelkarzinom der Haut (Spinaliom)]. 1–6
6. Böhm M, Schumacher H, Laufs U, Sleight P, Schmieder R, Unger T, Teo K, Yusuf S (2013) Effects of nonpersistence with medication on outcomes in high-risk patients with cardiovascular disease. *Am Heart J* 166:306-314.e7
7. Bramley TJ, Nightengale BS, Frech-Tamas F, Gerbino PP (2006) Relationship of Blood Pressure Control to Adherence With Antihypertensive Monotherapy in 13 Managed Care Organizations. *J Manag Care Pharm* 12:239–245
8. Brinker S, Pandey A, Ayers C, Price A, Raheja P, Arbique D, Das SR, Halm EA, Kaplan NM, Vongpatanasin W (2014) Therapeutic Drug Monitoring Facilitates Blood Pressure Control in Resistant Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 63:834–835
9. Burnier M (2014) Managing ‘resistance.’ *Curr Opin Nephrol Hypertens* 23:439–443
10. Caspar AT, Meyer MR, Maurer HH (2019) Blood plasma level determination using an automated LC-MS n screening system and electronically stored calibrations exemplified for 22 drugs and two active metabolites often requested in emergency toxicology. *Drug Test Anal*

## Literaturverzeichnis

- 11:102–111
11. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, Bahonar A, Chifamba J, Dagenais G, Diaz R, Kazmi K, Lanan F, Wei L, Lopez-Jaramillo P, Fanghong L, Ismail NH, Puoane T, Rosengren A, Szuba A, Temizhan A, Wielgosz A, Yusuf R, Yusufali A, McKee M, Liu L, Mony P, Yusuf S (2013) Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA - J Am Med Assoc* 310:959–968
  12. Cornelissen VA, Smart NA (2013) Exercise Training for Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Am Heart Assoc* 2:1–9
  13. Corrao G, Parodi A, Zambon A, Heiman F, Filippi A, Cricelli C, Merlino L, Mancia G (2010) Reduced discontinuation of antihypertensive treatment by two-drug combination as first step. Evidence from daily life practice. *J Hypertens* 28:1584–1590
  14. Corrao G, Parodi A, Nicotra F, Zambon A, Merlino L, Cesana G, Mancia G (2011) Better compliance to antihypertensive medications reduces cardiovascular risk. *J Hypertens* 29:610–618
  15. Crouch DJ (2005) Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int* 150:165–173
  16. Cushman WC, Cutler JA, Hanna E, Bingham SF, Follmann D, Harford T, Dubbert P, Allender PS, Dufour M, Collins JF, Walsh SM, Kirk GF, Burg M, Felicetta J V., Hamilton BP, Katz LA, Perry HM, Willenbring ML, Lakshman R, Hamburger RJ (1998) Prevention and treatment of hypertension study (PATHS): Effects of an alcohol treatment program on blood pressure. *Arch Intern Med* 158:1197–1207
  17. De Geest S, Sabaté E (2003) Adherence to Long-Term Therapies: Evidence for Action. *Eur J Cardiovasc Nurs* 2:323–323
  18. Drummer OH (2006) Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev* 27:147–59
  19. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas M-I, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí J V., Martínez JA, Martínez-González MA (2013) Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J Med* 368:1279–1290
  20. Ettehad D, Emdin CA, Kiran A, Anderson SG, Callender T, Emberson J, Chalmers J, Rodgers A, Rahimi K (2016) Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)* 387:957–967
  21. Ewen S, Meyer MR, Cremers B, Laufs U, Helfer AG, Linz D, Kindermann I, Ukena C, Burnier M, Wagenpfeil S, Maurer HH, Böhm M, Mahfoud F (2015) Blood pressure reductions following catheter-based renal denervation are not related to improvements in adherence to antihypertensive drugs measured by urine/plasma toxicological analysis. *Clin Res Cardiol* 104:1097–1105

## Literaturverzeichnis

22. Ferdinand KC, Senatore FF, Clayton-Jeter H, Cryer DR, Lewin JC, Nasser SA, Fiuzat M, Califf RM (2017) Improving Medication Adherence in Cardiometabolic Disease. *J Am Coll Cardiol* 69:437–451
23. Fischer MA, Stedman MR, Lii J, Vogeli C, Shrank WH, Brookhart MA, Weissman JS (2010) Primary Medication Non-Adherence: Analysis of 195,930 Electronic Prescriptions. *J Gen Intern Med* 25:284–290
24. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, Sampson UKA, Williams LJ, Mensah GA, Criqui MH (2013) Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 382:1329–1340
25. Fröhlich H, Torres L, Täger T, Schellberg D, Corletto A, Kazmi S, Goode K, Grundtvig M, Hole T, Katus HA, Cleland JGF, Atar D, Clark AL, Agewall S, Frankenstein L (2017) Bisoprolol compared with carvedilol and metoprolol succinate in the treatment of patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 106:711–721
26. Gaborieau V, Delarche N, Gosse P (2008) Ambulatory blood pressure monitoring versus self-measurement of blood pressure at home: correlation with target organ damage. *J Hypertens* 26:1919–1927
27. Group MS (1999) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in-Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353:2001–2007
28. Gupta AK, Arshad S, Poulter NR (2010) Compliance, Safety, and Effectiveness of Fixed-Dose Combinations of Antihypertensive Agents. *Hypertension* 55:399–407
29. Gupta P, Patel P, Horne R, Buchanan H, Williams B, Tomaszewski M (2016) How to Screen for Non-Adherence to Antihypertensive Therapy. *Curr Hypertens Rep* 18:89
30. Gupta P, Patel P, Štrauch B, Lai FY, Akbarov A, Gulsin GS, Beech A, Marešová V, Topham PS, Stanley A, Thurston H, Smith PR, Horne R, Widimský J, Keavney B, Heagerty A, Samani NJ, Williams B, Tomaszewski M (2017) Biochemical Screening for Nonadherence Is Associated With Blood Pressure Reduction and Improvement in Adherence. *Hypertension* 70:1042–1048
31. Harjasouliha A, Raiji V, Garcia Gonzalez JM (2017) Review of hypertensive retinopathy. *Disease-a-Month* 63:63–69
32. He FJ, MacGregor GA (2000) EFFECT OF LONGER-TERM MODEST SALT REDUCTION ON BLOOD PRESSURE. A META-ANALYSIS. IMPLICATIONS FOR PUBLIC HEALTH. *J Hypertens* 18:S91–S92
33. Ho PM, Bryson CL, Rumsfeld JS (2009) Medication Adherence. *Circulation* 119:3028–3035
34. Hold KM, de Boer D, Zuidema J, Maes RAAPD (1999) Saliva as an Analytical Tool in Toxicology. *Int J Drug Test* 1–36
35. Jung O, Gechter JL, Wunder C, Paulke A, Bartel C, Geiger H, Toennes SW (2013) Resistant

## Literaturverzeichnis

- hypertension? Assessment of adherence by toxicological urine analysis. *J Hypertens* 31:766–774
36. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365:217–223
  37. Kho H-S, Lee S-W, Chung S-C, Kim Y-K (1999) Oral manifestations and salivary flow rate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 88:316–319
  38. Kronish IM, Woodward M, Sergie Z, Ogedegbe G, Falzon L, Mann DM (2011) Meta-Analysis: Impact of Drug Class on Adherence to Antihypertensives. *Circulation* 123:1611–1621
  39. Landis JR, Koch GG (1977) The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33:159
  40. Lauder L, Ewen S, Kunz M, Richter LHJ, Jacobs CM, Kindermann I, Böhm M, Meyer MR, Mahfoud F (2020) Adherence to Antihypertensive Drugs Assessed by Hyphenated High-Resolution Mass Spectrometry Analysis of Oral Fluids. *J Am Heart Assoc*
  41. Lauder L, Ewen S, Kunz M, Richter LHJ, Jacobs CM, Kindermann I, Böhm M, Meyer MR, Mahfoud F (2020) Adherence to Antihypertensive Drugs Assessed by Hyphenated High-Resolution Mass Spectrometry Analysis of Oral Fluids. *J Am Heart Assoc*
  42. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H (2006) Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 27:2588–2605
  43. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360:1903–1913
  44. Lv J, Ehteshami P, Sarnak MJ, Tighiouart H, Jun M, Ninomiya T, Foote C, Rodgers A, Zhang H, Wang H, Strippoli GFM, Perkovic V (2013) Effects of intensive blood pressure lowering on the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Can Med Assoc J* 185:949–957
  45. Mahfoud F, Kieble M, Enners S, Werning J, Laufs U, Millenaar D, Böhm M, Kintscher U SM (2020) „Dear Doctor“ warning letter (Rote-Hand-Brief) on hydrochlorothiazide and its impact on antihypertensive prescription. *Dtsch Arztebl Int*
  46. Mahfoud F, Schmieder RE, Azizi M, Pathak A, Sievert H, Tsioufis C, Zeller T, Bertog S, Blankestijn PJ, Böhm M, Burnier M, Chatellier G, Durand Zaleski I, Ewen S, Grassi G, Joner M, Kjeldsen SE, Lobo MD, Lotan C, Lüscher TF, Parati G, Rossignol P, Ruilope L, Sharif F, van Leeuwen E, Volpe M, Windecker S, Witkowski A, Wijns W (2017) Proceedings from the 2nd European Clinical Consensus Conference for device-based therapies for hypertension: state of the art and considerations for the future. *Eur Heart J* 38:3272–3281
  47. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE,

## Literaturverzeichnis

- Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F, Redon J, Dominiczak A, Narkiewicz K, Nilsson PM, Burnier M, Viigimaa M, Ambrosioni E, Caulfield M, Coca A, Olsen MH, Schmieder RE, Tsioufis C, van de Borne P, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Clement DL, Coca A, Gillebert TC, Tendera M, Rosei EA, Ambrosioni E, Anker SD, Bauersachs J, Hitij JB, Caulfield M, De Buyzere M, De Geest S, Derumeaux GA, Erdine S, Farsang C, Funck-Brentano C, Gerc V, Germano G, Gielen S, Haller H, Hoes AW, Jordan J, Kahan T, Komajda M, Lovic D, Mahrholdt H, Olsen MH, Ostergren J, Parati G, Perk J, Polonia J, Popescu BA, Reiner Z, Rydén L, Sirenko Y, Stanton A, Struijker-Boudier H, Tsioufis C, van de Borne P, Vlachopoulos C, Volpe M, Wood DA (2013) 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 34:2159–2219
48. Martin SB, Wan SH, Karam JH (1974) Pharmacokinetics of tolbutamide: Prediction by concentration in saliva. *Clin Pharmacol Ther* 16:1052–1058
49. Meyer MR, Rosenberg S, Stenberg M, Beck O (2015) First report on the pharmacokinetics of tramadol and O-desmethyltramadol in exhaled breath compared to plasma and oral fluid after a single oral dose. *Biochem Pharmacol* 98:502–510
50. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, Chen J, He J (2016) Global disparities of hypertension prevalence and control. *Circulation* 134:441–450
51. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T (2001) Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 92:281–291
52. Murray CJL, Lopez AD (2013) Measuring the Global Burden of Disease. *N Engl J Med* 369:448–457
53. Neter JE, Stam BE, Kok FJ, Grobbee DE, Geleijnse JM (2003) Influence of Weight Reduction on Blood Pressure. *Hypertension* 42:878–884
54. O’Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah A, Cheever ML (1999) Correlation of Saliva Codeine Concentrations with Plasma Concentrations after Oral Codeine Administration. *J Anal Toxicol* 23:452–459
55. O’Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah AA (2000) The Effects of Collection Methods On Oral Fluid Codeine Concentrations. *J Anal Toxicol* 24:536–542
56. Osterberg L, Blaschke T (2005) Adherence to Medication. *N Engl J Med* 353:487–497
57. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH (1996) The Effect of Carvedilol on Morbidity and Mortality in Patients with Chronic Heart Failure. *N Engl J Med* 334:1349–1355
58. Parati G, Stergiou G, O’Brien E, Asmar R, Beilin L, Biló G, Clement D, de la Sierra A, de Leeuw

## Literaturverzeichnis

- P, Dolan E, Fagard R, Graves J, Head GA, Imai Y, Kario K, Lurbe E, Mallion J-M, Mancia G, Mengden T, Myers M, Ogedegbe G, Ohkubo T, Omboni S, Palatini P, Redon J, Ruilope LM, Shennan A, Staessen JA, VanMontfrans G, Verdecchia P, Waeber B, Wang J, Zanchetti A, Zhang Y (2014) European Society of Hypertension practice guidelines for ambulatory blood pressure monitoring. *J Hypertens* 32:1359–1366
59. Patel P, Gupta PKC, White CMJ, Stanley AG, Williams B, Tomaszewski M (2016) Screening for non-adherence to antihypertensive treatment as a part of the diagnostic pathway to renal denervation. *J Hum Hypertens* 30:368–373
60. Reboldi G, Angeli F, Cavallini C, Gentile G, Mancia G, Verdecchia P (2008) Comparison between angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on the risk of myocardial infarction, stroke and death: a meta-analysis. *J Hypertens* 26:1282–1289
61. Richter LHJ, Jacobs CM, Mahfoud F, Kindermann I, Böhm M, Meyer MR (2019) Development and application of a LC-HRMS/MS method for analyzing antihypertensive drugs in oral fluid for monitoring drug adherence. *Anal Chim Acta* 1070:69–79
62. Rimoldi SF, Scherrer U, Messerli FH (2014) Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *Eur Heart J* 35:1245–1254
63. Schinzari F, Tesaro M, Veneziani A, Mores N, Di Daniele N, Cardillo C (1999) The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 353:9–13
64. Schmieder RE, Ott C, Schmid A, Friedrich S, Kistner I, Ditting T, Veelken R, Uder M, Toennes SW (2016) Adherence to Antihypertensive Medication in Treatment-Resistant Hypertension Undergoing Renal Denervation. *J Am Heart Assoc* 5:1–11
65. Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D KJ (Hrsg. . (2018) *Arzneiverordnungs-Report 2018*. Berlin: Springer
66. Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D KJ (Hrsg. ). (2017) *Arzneiverordnungs-Report 2017*. Berlin: Springer
67. Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D KJ (Hrsg. ). (2019) *Arzneiverordnungs-Report 2019*. Berlin: Springer
68. Sutton-Tyrrell K, Alcorn HG, Wolfson SK, Kelsey SF, Kuller LH (1993) Predictors of carotid stenosis in older adults with and without isolated systolic hypertension. *Stroke* 24:355–361
69. Thakkar H V., Pope A, Anpalahan M (2020) Masked Hypertension: A Systematic Review. *Hear Lung Circ* 29:102–111
70. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2016) Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension. *J Hypertens* 34:613–622
71. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2017) Effects of blood-pressure-lowering treatment on outcome incidence. 12. Effects in individuals with high-normal and normal blood pressure. *J Hypertens* 35:2150–2160
72. Thomopoulos C, Parati G, Zanchetti A (2017) Effects of blood-pressure-lowering treatment on

## Literaturverzeichnis

- outcome incidence in hypertension. *J Hypertens* 35:922–944
73. Tomaszewski M, White C, Patel P, Masca N, Damani R, Hepworth J, Samani NJ, Gupta P, Madira W, Stanley A, Williams B (2014) High rates of non-adherence to antihypertensive treatment revealed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HP LC-MS/MS) urine analysis. *Heart* 100:855–861
  74. Valgimigli M, Garcia-Garcia HM, Vrijens B, Vranckx P, McFadden EP, Costa F, Pieper K, Vock DM, Zhang M, Van Es G-A, Tricoci P, Baber U, Steg G, Montalescot G, Angiolillo DJ, Serruys PW, Farb A, Windecker S, Kastrati A, Colombo A, Feres F, Jüni P, Stone GW, Bhatt DL, Mehran R, Tijssen JGP (2019) Standardized classification and framework for reporting, interpreting, and analysing medication non-adherence in cardiovascular clinical trials: a consensus report from the Non-adherence Academic Research Consortium (NARC). *Eur Heart J* 40:2070–2085
  75. Vermeer SE, Longstreth WT, Koudstaal PJ (2007) Silent brain infarcts: a systematic review. *Lancet Neurol* 6:611–619
  76. Verstraete AG (2004) Detection Times of Drugs of Abuse in Blood, Urine, and Oral Fluid. *Ther Drug Monit* 26:200–205
  77. Vrijens B, Vincze G, Kristanto P, Urquhart J, Burnier M (2008) Adherence to prescribed antihypertensive drug treatments: longitudinal study of electronically compiled dosing histories. *BMJ* 336:1114–1117
  78. Vrijens B, De Geest S, Hughes DA, Przemyslaw K, Demonceau J, Ruppar T, Dobbels F, Fargher E, Morrison V, Lewek P, Matyjaszczyk M, Mshelia C, Clyne W, Aronson JK, Urquhart J (2012) A new taxonomy for describing and defining adherence to medications. *Br J Clin Pharmacol* 73:691–705
  79. Wald DS, Law M, Morris JK, Bestwick JP, Wald NJ (2009) Combination Therapy Versus Monotherapy in Reducing Blood Pressure: Meta-analysis on 11,000 Participants from 42 Trials. *Am J Med* 122:290–300
  80. Whelton PK, Appel LJ, Espeland MA, Applegate WB, Ettinger, Jr WH, Kostis JB, Kumanyika S, Lacy CR, Johnson KC, Folmar S, Cutler JA, for the TONE Collaborative Research Group (1998) Sodium Reduction and Weight Loss in the Treatment of Hypertension in Older Persons. *JAMA* 279:839
  81. Williams B, MacDonald TM, Morant S, Webb DJ, Sever P, McInnes G, Ford I, Cruickshank JK, Caulfield MJ, Salsbury J, Mackenzie I, Padmanabhan S, Brown MJ (2015) Spironolactone versus placebo, bisoprolol, and doxazosin to determine the optimal treatment for drug-resistant hypertension (PATHWAY-2): a randomised, double-blind, crossover trial. *Lancet* 386:2059–2068
  82. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F,

## Literaturverzeichnis

- Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I, De Backer G, Heagerty AM, Agewall S, Bochud M, Borghi C, Boutouyrie P, Brguljan J, Bueno H, Caiani EG, Carlberg B, Chapman N, Cífková R, Cleland JGF, Collet J-P, Coman IM, de Leeuw PW, Delgado V, Dendale P, Diener H-C, Dorobantu M, Fagard R, Farsang C, Ferrini M, Graham IM, Grassi G, Haller H, Hobbs FDR, Jelakovic B, Jennings C, Katus HA, Kroon AA, Leclercq C, Lovic D, Lurbe E, Manolis AJ, McDonagh TA, Messerli F, Muiesan ML, Nixdorff U, Olsen MH, Parati G, Perk J, Piepoli MF, Polonia J, Ponikowski P, Richter DJ, Rimoldi SF, Roffi M, Sattar N, Seferovic PM, Simpson IA, Sousa-Uva M, Stanton A V, van de Borne P, Vardas P, Volpe M, Wassmann S, Windecker S, Zamorano JL, Windecker S, Aboyans V, Agewall S, Barbato E, Bueno H, Coca A, Collet J-P, Coman IM, Dean V, Delgado V, Fitzsimons D, Gaemperli O, Hindricks G, Iung B, Jüni P, Katus HA, Knuuti J, Lancellotti P, Leclercq C, McDonagh TA, Piepoli MF, Ponikowski P, Richter DJ, Roffi M, Shlyakhto E, Simpson IA, Sousa-Uva M, Zamorano JL, Tsioufis C, Lurbe E, Kreutz R, Bochud M, Rosei EA, Jelakovic B, Azizi M, Januszewics A, Kahan T, Polonia J, van de Borne P, Williams B, Borghi C, Mancia G, Parati G, Clement DL, Coca A, Manolis A, Lovic D, Benkhedda S, Zelveian P, Siostrzonek P, Najafov R, Pavlova O, De Pauw M, Dizdarevic-Hudic L, Raev D, Karpettas N, Linhart A, Olsen MH, Shaker AF, Viigimaa M, Metsärinne K, Vavlukis M, Halimi J-M, Pagava Z, Schunkert H, Thomopoulos C, Páll D, Andersen K, Shechter M, Mercurio G, Bajraktari G, Romanova T, Trušinskis K, Saade GA, Sakalyte G, Noppe S, DeMarco DC, Caraus A, Wittekoek J, Aksnes TA, Jankowski P, Polonia J, Vinereanu D, Baranova EI, Foscoli M, Dikic AD, Filipova S, Fras Z, Bertomeu-Martínez V, Carlberg B, Burkard T, Sdiri W, Aydogdu S, Sirenko Y, Brady A, Weber T, Lazareva I, Backer T De, Sokolovic S, Jelakovic B, Widimsky J, Viigimaa M, Pörsti I, Denolle T, Krämer BK, Stergiou GS, Parati G, Trušinskis K, Miglinas M, Gerds E, Tykarski A, de Carvalho Rodrigues M, Dorobantu M, Chazova I, Lovic D, Filipova S, Brguljan J, Segura J, Gottsäter A, Pechère-Bertschi A, Erdine S, Sirenko Y, Brady A (2018) 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 39:3021–3104
83. Wissenschaftliches Institut der AOK (2019) GKV-Arzneimittelindex im Wissenschaftlichen Institut der AOK (WIdO): Anatomisch-therapeutisch-chemische-Klassifikation mit Tagesdosen. Amtliche Fassung des ATC-Index mit DDD-Angaben für Deutschland im Jahre 2019.
84. Yang W-Y, Melgarejo JD, Thijs L, Zhang Z-Y, Boggia J, Wei F-F, Hansen TW, Asayama K, Ohkubo T, Jeppesen J, Dolan E, Stolarz-Skrzypek K, Malyutina S, Casiglia E, Lind L, Filipovský J, Maestre GE, Li Y, Wang J-G, Imai Y, Kawecka-Jaszcz K, Sandoya E, Narkiewicz K, O'Brien E, Verhamme P, Staessen JA (2019) Association of Office and Ambulatory Blood Pressure With Mortality and Cardiovascular Outcomes. *JAMA* 322:409
85. Zeeck A, Grond S, Zeeck SC (2017) *Chemie für Mediziner*. 9. edition. Elsevier
86. Zhou B, Bentham J, Di Cesare M, Bixby H, Danaei G, Cowan MJ, Paciorek CJ, Singh G, Hajifathalian K, Bennett JE, Taddei C, Bilano V, Carrillo-Larco RM, Djalalinia S, Khatibzadeh

## Literaturverzeichnis

S, Lugero C, Peykari N, Zhang WZ, Lu Y, Stevens GA, Riley LM, Bovet P, Elliott P, Gu D, Ikeda N, Jackson RT, Joffres M, Kengne AP, Laatikainen T, Lam TH, Laxmaiah A, Liu J, Miranda JJ, Mondo CK, Neuhauser HK, Sundström J, Smeeth L, Soric M, Woodward M, Ezzati M, Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Rahim HA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Adams R, Aekplakorn W, Afsana K, Aguilar-Salinas CA, Agyemang C, Ahmadvand A, Ahrens W, Al Raddadi R, Al Woyatan R, Ali MM, Alkerwi A, Aly E, Amouyel P, Amuzu A, Andersen LB, Anderssen SA, Ängquist L, Anjana RM, Ansong D, Aounallah-Skhiri H, Araújo J, Ariansen I, Aris T, Arlappa N, Aryal K, Arveiler D, Assah FK, Assunção MCF, Avdicová M, Azevedo A, Azizi F, Babu B V., Bahijri S, Balakrishna N, Bandosz P, Banegas JR, Barbagallo CM, Barceló A, Barkat A, Barros AJD, Barros M V., Bata I, Batieha AM, Baur LA, Beaglehole R, Romdhane H Ben, Benet M, Benson LS, Bernabe-Ortiz A, Bernotiene G, Bettiol H, Bhagyalaxmi A, Bharadwaj S, Bhargava SK, Bi Y, Bikbov M, Bjerregaard P, Bjertness E, Björkelund C, Blokstra A, Bo S, Bobak M, Boeing H, Boggia JG, Boissonnet CP, Bongard V, Braeckman L, Brajkovich I, Branca F, Breckenkamp J, Brenner H, Brewster LM, Bruno G, Bueno-de-Mesquita HB, Bugge A, Burns C, Bursztyń M, de León AC, Cacciottolo J, Cameron C, Can G, Cândido APC, Capuano V, Cardoso VC, Carlsson AC, Carvalho MJ, Casanueva FF, Casas J-P, Caserta CA, Chamukuttan S, Chan AW, Chan Q, Chaturvedi HK, Chaturvedi N, Chen C-J, Chen F, Chen H, Chen S, Chen Z, Cheng C-Y, Dekkaki IC, Chetrit A, Chioloro A, Chiou S-T, Chirita-Emandi A, Cho B, Cho Y, Chudek J, Cifkova R, Claessens F, Clays E, Concin H, Cooper C, Cooper R, Coppinger TC, Costanzo S, Cottel D, Cowell C, Craig CL, Crujeiras AB, Cruz JJ, D'Arrigo G, D'Orsi E, Dallongeville J, Damasceno A, Dankner R, Dantoft TM, Dauchet L, De Backer G, De Bacquer D, de Gaetano G, De Henauw S, De Smedt D, Deepa M, Dehghan A, Delisle H, Deschamps V, Dhana K, Di Castelnuovo AF, Dias-da-Costa JS, Diaz A, Dickerson TT, Do HTP, Dobson AJ, Donfrancesco C, Donoso SP, Döring A, Doua K, Drygas W, Dulskiene V, Džakula A, Dzerve V, Dziankowska-Zaborszczyk E, Eggertsen R, Ekelund U, El Ati J, Ellert U, Elliott P, Elosua R, Erasmus RT, Erem C, Eriksen L, de la Peña JE, Evans A, Faeh D, Fall CH, Farzadfar F, Felix-Redondo FJ, Ferguson TS, Fernández-Bergés D, Ferrante D, Ferrari M, Ferreccio C, Ferrieres J, Finn JD, Fischer K, Föger B, Foo LH, Forslund A-S, Forsner M, Fortmann SP, Fouad HM, Francis DK, Franco M do C, Franco OH, Frontera G, Fuchs FD, Fuchs SC, Fujita Y, Furusawa T, Gaciong Z, Gareta D, Garnett SP, Gaspoz J-M, Gasull M, Gates L, Gavrila D, Geleijnse JM, Ghasemian A, Ghimire A, Giampaoli S, Gianfagna F, Giovannelli J, Goldsmith RA, Gonçalves H, Gross MG, Rivas JPG, Gottrand F, Graff-Iversen S, Grafnetter D, Grajda A, Gregor RD, Grodzicki T, Grøntved A, Gruden G, Grujic V, Gu D, Guan OP, Gudnason V, Guerrero R, Guessous I, Guimaraes AL, Gulliford MC, Gunnlaugsdottir J, Gunter M, Gupta PC, Gureje O, Gurzkowska B, Gutierrez L, Gutzwiller F, Hadaegh F, Halkjær J, Hambleton IR, Hardy R, Harikumar R, Hata J, Hayes AJ, He J, Hendriks ME, Henriques A, Cadena LH, Herrala S, Heshmat R, Hihtaniemi IT, Ho SY, Ho SC, Hobbs M, Hofman A, Dinc GH, Hormiga CM, Horta

## Literaturverzeichnis

BL, Houti L, Howitt C, Htay TT, Htet AS, Hu Y, Huerta JM, Husseini AS, Huybrechts I, Hwalla N, Iacoviello L, Iannone AG, Ibrahim MM, Ikram MA, Irazola VE, Islam M, Ivkovic V, Iwasaki M, Jackson RT, Jacobs JM, Jafar T, Jamrozik K, Janszky I, Jasienska G, Jelakovic B, Jiang CQ, Joffres M, Johansson M, Jonas JB, Jørgensen T, Joshi P, Juolevi A, Jurak G, Jureša V, Kaaks R, Kafatos A, Kalter-Leibovici O, Kamaruddin NA, Kasaeian A, Katz J, Kauhanen J, Kaur P, Kavousi M, Kazakbaeva G, Keil U, Boker LK, Keinänen-Kiukaanniemi S, Kelishadi R, Kemper HCG, Kengne AP, Kersting M, Key T, Khader YS, Khalili D, Khang Y-H, Khaw K-T, Kiechl S, Killewo J, Kim J, Klumbiene J, Kolle E, Kolsteren P, Korrovits P, Koskinen S, Kouda K, Koziel S, Kristensen PL, Krokstad S, Kromhout D, Kruger HS, Kubinova R, Kuciene R, Kuh D, Kujala UM, Kula K, Kulaga Z, Kumar RK, Kurjata P, Kusuma YS, Kuulasmaa K, Kyobutungi C, Laatikainen T, Lachat C, Lam TH, Landrove O, Lanska V, Lappas G, Larijani B, Laugsand LE, Laxmaiah A, Bao KLN, Le TD, Leclercq C, Lee J, Lee J, Lehtimäki T, Lekhraj R, León-Muñoz LM, Levitt NS, Li Y, Lilly CL, Lim W-Y, Lima-Costa MF, Lin H-H, Lin X, Linneberg A, Lissner L, Litwin M, Lorbeer R, Lotufo PA, Lozano JE, Luksiene D, Lundqvist A, Lunet N, Lytsy P, Ma G, Ma J, Machado-Coelho GLL, Machi S, Maggi S, Magliano DJ, Majer M, Makdisse M, Malekzadeh R, Malhotra R, Rao KM, Malyutina S, Manios Y, Mann JI, Manzato E, Margozzini P, Marques-Vidal P, Marrugat J, Martorell R, Mathiesen EB, Matijasevich A, Matsha TE, Mbanya JCN, Posso AJMD, McFarlane SR, McGarvey ST, McLachlan S, McLean RM, McNulty BA, Khir ASM, Mediene-Benchechor S, Medzioniene J, Meirhaeghe A, Meisinger C, Menezes AMB, Menon GR, Meshram II, Metspalu A, Mi J, Mikkil K, Miller JC, Miquel JF, Mišigoj-Durakovic M, Mohamed MK, Mohammad K, Mohammadifard N, Mohan V, Yusoff MFM, Møller NC, Molnár D, Momenan A, Mondo CK, Monyeki KDK, Moreira LB, Morejon A, Moreno LA, Morgan K, Moschonis G, Mossakowska M, Mostafa A, Mota J, Motlagh ME, Motta J, Muiesan ML, Müller-Nurasyid M, Murphy N, Mursu J, Musil V, Nagel G, Naidu BM, Nakamura H, Námešná J, Nang EEK, Nangia VB, Narake S, Navarrete-Muñoz EM, Ndiaye NC, Neal WA, Nenko I, Nervi F, Nguyen ND, Nguyen QN, Nieto-Martínez RE, Niiranen TJ, Ning G, Ninomiya T, Nishtar S, Noale M, Noboa OA, Noorbala AA, Noorbala T, Noto D, Al Nsour M, O'Reilly D, Oh K, Olinto MTA, Oliveira IO, Omar MA, Onat A, Ordunez P, Osmond C, Ostojic SM, Otero JA, Overvad K, Owusu-Dabo E, Paccaud FM, Padez C, Pahomova E, Pajak A, Palli D, Palmieri L, Panda-Jonas S, Panza F, Papandreou D, Parnell WR, Parsaeian M, Pecin I, Pednekar MS, Peer N, Peeters PH, Peixoto SV, Pelletier C, Peltonen M, Pereira AC, Pérez RM, Peters A, Petkeviciene J, Pham ST, Pigeot I, Pikhart H, Pilav A, Pilotto L, Pitakaka F, Plans-Rubió P, Polakowska M, Polašek O, Porta M, Portegies MLP, Pourshams A, Pradeepa R, Prashant M, Price JF, Puii M, Punab M, Qasrawi RF, Qorbani M, Radic I, Radisauskas R, Rahman M, Raitakari O, Raj M, Rao SR, Ramachandran A, Ramos E, Rampal S, Reina DAR, Rasmussen F, Redon J, Reganit PFM, Ribeiro R, Riboli E, Rigo F, de Wit TFR, Ritti-Dias RM, Robinson SM, Robitaille C, Rodríguez-Artalejo F, Rodríguez-Perez del Cristo M, Rodríguez-

## Literaturverzeichnis

Villamizar LA, Rojas-Martinez R, Rosengren A, Rubinstein A, Rui O, Ruiz-Betancourt BS, Horimoto ARVR, Rutkowski M, Sabanayagam C, Sachdev HS, Saidi O, Sakarya S, Salanave B, Salazar Martinez E, Salmerón D, Salomaa V, Salonen JT, Salvetti M, Sánchez-Abanto J, Sans S, Santos D, Santos IS, dos Santos RN, Santos R, Saramies JL, Sardinha LB, Margolis GS, Sarrafzadegan N, Saum K-U, Savva SC, Scazufca M, Schargrodsky H, Schneider IJ, Schultsz C, Schutte AE, Sen A, Senbanjo IO, Sepanlou SG, Sharma SK, Shaw JE, Shibuya K, Shin DW, Shin Y, Siantar R, Sibai AM, Silva DAS, Simon M, Simons J, Simons LA, Sjöström M, Skovbjerg S, Slowikowska-Hilczer J, Slusarczyk P, Smeeth L, Smith MC, Snijder MB, So H-K, Sobngwi E, Söderberg S, Solfrizzi V, Sonestedt E, Song Y, Sørensen TIA, Jérôme CS, Soumare A, Staessen JA, Starc G, Stathopoulou MG, Stavreski B, Steene-Johannessen J, Stehle P, Stein AD, Stergiou GS, Stessman J, Stieber J, Stöckl D, Stocks T, Stokwiszewski J, Stronks K, Strufaldi MW, Sun C-A, Sundström J, Sung Y-T, Suriyawongpaisal P, Sy RG, Tai ES, Tammesoo M-L, Tamosiunas A, Tang L, Tang X, Tanser F, Tao Y, Tarawneh MR, Tarqui-Mamani CB, Taylor A, Theobald H, Thijs L, Thuesen BH, Tjonneland A, Tolonen HK, Tolstrup JS, Topbas M, Topór-Madry R, Tormo MJ, Torrent M, Traissac P, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Trinh OTH, Trivedi A, Tshepo L, Tulloch-Reid MK, Tuomainen T-P, Tuomilehto J, Turley ML, Tynelius P, Tzourio C, Ueda P, Ugel E, Ulmer H, Uusitalo HMT, Valdivia G, Valvi D, van der Schouw YT, Van Herck K, van Rossem L, van Valkengoed IGM, Vanderschueren D, Vanuzzo D, Vatten L, Vega T, Velasquez-Melendez G, Veronesi G, Verschuren WMM, Verstraeten R, Victora CG, Viet L, Viikari-Juntura E, Vineis P, Vioque J, Virtanen JK, Visvikis-Siest S, Viswanathan B, Vollenweider P, Voutilainen S, Vrdoljak A, Vrijheid M, Wade AN, Wagner A, Walton J, Mohamud WNW, Wang M-D, Wang Q, Wang YX, Wannamethee SG, Wareham N, Wederkopp N, Weerasekera D, Whincup PH, Widhalm K, Widyahening IS, Wiecek A, Wijga AH, Wilks RJ, Willeit J, Willeit P, Williams EA, Wilsgaard T, Wojtyniak B, Wong TY, Wong-McClure RA, Woo J, Woodward M, Wu AG, Wu FC, Wu SL, Xu H, Yan W, Yang X, Ye X, Yiallourous PK, Yoshihara A, Younger-Coleman NO, Yusoff AF, Yusoff MFM, Zambon S, Zdrojewski T, Zeng Y, Zhao D, Zhao W, Zheng Y, Zhu D, Zimmermann E, Zuñiga Cisneros J (2017) Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet* 389:37–55

### 7 Danksagung

Gerne möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Promotionsarbeit tatkräftig und hilfsbereit zur Seite standen. Die Arbeit mit den Patienten in der Bluthochdruckambulanz, die Ausarbeitung der Daten und die Verfassung dieser Dissertation waren eine willkommene und angenehme Abwechslung zum Alltag des Medizinstudiums. Nie, oder sagen wir fast nie, musste ich mich zum Weiterarbeiten zwingen bzw. ging ich mit Unlust an die Arbeit heran. Und dies nicht nur dank des Willens zur Fertigstellung der Arbeit, vielmehr auch wegen dem Interesse den Umgang mit der wissenschaftlichen Arbeit zu erlernen und der Freude an dieser. Außerdem bot sich mir auf diesem Weg ein intensiverer Einblick in das Krankheitsbild der arteriellen Hypertonie, welchen ich, im Hinblick auf meine Anstellung als HiWi in der Studienambulanz und mit Blick auf die Zeit im Anschluss des Studiums, sehr begrüße. Rundum möchte ich festhalten, dass mir diese wissenschaftliche Arbeit nicht nur sehr viel Freude bereitete, sondern dass ich über diese Arbeit hinaus (unter anderem) weiter im wissenschaftlichen Bereich tätig bleiben möchte.

Bedanken möchte ich mich hiermit bei dem gesamten Team der Klinik für Innere Medizin III des UKS und allen Mitarbeitern der Studienambulanz. Hilfe, Rat und Unterstützung erfuhr ich von den oben genannten Personen und darüber hinaus wurde ich innerhalb kürzester Zeit als Mitglied in das Team integriert. Zusätzlich bedanke ich mich ganz herzlich bei der Arbeitsgruppe aus der experimentellen und klinischen Toxikologie und Prof. Dr. Markus Meyer für die herausragende analytische Arbeit und die freundliche, kollegiale und zielführende Kooperation. Auch Prof. Meyer stand mir im Falle von Fragen zu den komplexen Analyseverfahren mit Rat zur Seite. Meinen Dank möchte ich auch meinem Vater Dr. Franz-Rudolf Kunz aussprechen, der als Chemiker die kleinen bestehenden Wissenslücken bezüglich analytischer Auftrennungsverfahren füllen konnte und der mich als Vater unterstützt. Ein großes Anliegen ist es mir, zwei Personen gesondert hervorzuheben und ihnen meinen Dank in jeglicher Form auszudrücken. Bei diesen beiden Personen handelt es sich um meine Großeltern Edith Schug und Achim Neunzling, die mir nicht nur als Berater, Unterstützer und Vertrauenspersonen immer zur Seite stehen, sondern ohne die mein Studium in dieser Form nie möglich wäre.

Zuletzt gebührt besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Felix Mahfoud und meinem Betreuer Dr. Lucas Lauder. Beide leiteten mich geduldig Schritt für Schritt an und lehrten mich alle Grundlagen, die man zum wissenschaftlichen Arbeiten benötigt. Außerdem wurde mir auf jede Frage in kürzester Zeit eine Antwort geboten und ich genoss höchste Unterstützung bei allen Anliegen. Unter anderem dadurch wurde mein bereits bestehendes Interesse an der Kardiologie gestärkt und die Entscheidung, welche Fachrichtung ich nach Abschluss des Studiums einschlagen werde, wurde in die „kardiologische“ Richtung gelenkt. Ich schaue mit Freude einer zukünftigen Zusammenarbeit entgegen.

## 8 Publikationen

Michael Kunz, Lucas Lauder, Sebastian Ewen, Michael Böhm, Felix Mahfoud

**The Current Status of Devices for the Treatment of Resistant Hypertension**

American Journal of Hypertension 33(1): 10-18; January 2020

doi:10.1093/ajh/hpz161

Lucas Lauder, Sebastian Ewen, Michael Kunz, Lilian H. J. Richter, Cathy M. Jacobs, Ingrid Kindermann, Michael Böhm, Markus R. Meyer, Felix Mahfoud

**Adherence to Antihypertensive Drugs Assessed by Hyphenated High- Resolution Mass Spectrometry Analysis of Oral Fluids**

Journal of the American Heart Association 2020

doi: 10.1161/JAHA.119.014180

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Säulen der Bluthochdrucktherapie .....	13
Abbildung 2: Therapieschema bei unkomplizierter arterieller Hypertonie gemäß aktuellen Leitlinien .....	15
Abbildung 3: Schema- vereinfachtes Prinzip einer Massenspektrometrie zu Analysezwecken .....	20
Abbildung 4: Adhärenzraten gemäß Definition 1 (Bildabschnitt B) und Definition 2 (Bildabschnitt A).....	28
Abbildung 5: Einfluss des Therapieplans bzw. des Medikamentenplans auf das Adhärenzverhalten (A: Auswirkung der Gesamtzahl an Bluthochdruckmedikamenten auf das Adhärenzverhalten, B: Einfluss der täglichen Tablettenanzahl auf das Adhärenzverhalten); p-Werte sind für Vergleiche der Gruppen untereinander angegeben. ....	29
Abbildung 6: Adhärenzraten der verschiedenen Substanzklasse korrigiert für SPC; *Die Gesamtzahl der detektierten Medikamente beinhaltet Triamteren.....	31
Abbildung 7: Beispiel eines LC-HRMS/MS Chromatogramms.....	32
Abbildung 8: Vergleich der Detektionsraten der Bluthochdruckmedikamente; †die Anzahl der detektieren Medikamente wurde hier korrigiert für SPC. *Die Gesamtzahl der detektierten Medikamente beinhaltet Triamteren. ....	33
Abbildung 9: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Adhärenzmessung; *Adhärenzraten korrigiert für SPC. ....	44
Abbildung 10: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Analysen (Zahlen in Klammern= Anzahl der detektierten Medikamente im jeweiligen Medium) .....	45

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grenzwerte arterielle Hypertonie je nach Messmethode .....	10
Tabelle 2: Klassifikation der arteriellen Hypertonie gemäß des Praxisblutdrucks .....	10
Tabelle 3: Wichtige Informationen zu den fünf Hauptmedikamentenklassen der Bluthochdrucktherapie .....	13
Tabelle 4: Übersichtstabelle Adhärenzmessung .....	19
Tabelle 5: Eigenschaften, Komorbiditäten und Untersuchungsergebnisse der Patienten unterteilt in nicht-adhärente, teilweise adhärente und adhärente Patienten .....	27
Tabelle 6: Verordnete antihypertensive Medikamente bei nicht-adhären, teilweise adhären und adhären Patienten .....	30
Tabelle 7: Interrater-Reliabilität des Medikamentennachweises zwischen Urin-, Blutplasma- und Speichelproben .....	35

## **11 Lebenslauf**

**Michael Kunz**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.



ORIGINAL RESEARCH

# Adherence to Antihypertensive Drugs Assessed by Hyphenated High-Resolution Mass Spectrometry Analysis of Oral Fluids

Lucas Lauder, MD; Sebastian Ewen, MD; Michael Kunz; Lilian H. J. Richter, PhD; Cathy M. Jacobs; Ingrid Kindermann, MD; Michael Böhm, MD; Markus R. Meyer; Felix Mahfoud, MD

**BACKGROUND:** It is currently unknown if antihypertensive drugs can be monitored in oral fluid (OF) using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry.

**METHODS AND RESULTS:** We assessed adherence using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry in OF, plasma, and urine of 56 consecutive patients with hypertension referred to a tertiary hypertension unit. Of these patients, 59% were completely adherent (all drugs detectable in urine), whereas 29% and 13% were partially adherent (1 drug not detectable in urine) or nonadherent (>1 drug not detectable in urine), respectively. Adherent patients were on fewer antihypertensive drugs ( $P=0.001$ ), had fewer daily drug doses ( $P=0.012$ ), and had lower 24-hour ambulatory systolic ( $P=0.012$ ) and diastolic ( $P=0.009$ ) blood pressures than nonadherent or partially adherent patients. Most drugs were detected in urine compared with plasma and OF (181 versus 119 versus 88;  $P=0.001$ ). Compared with urine and plasma, detection rates of angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers, and diuretics were lower in OF. There was no difference in the frequency of detecting  $\beta$  blockers ( $P=1.0$ ) and calcium channel blockers ( $P=0.063$ ) when comparing OF with urine. There was no difference in the number of calcium channel blockers ( $P=0.727$ ),  $\beta$  blockers ( $P=1.000$ ), thiazide diuretics ( $P=0.125$ ), and  $\alpha$ -2 agonists ( $P=0.125$ ) identified between OF and plasma.

**CONCLUSIONS:** This study shows the feasibility of drug adherence testing for several antihypertensive drugs, especially those without acidic components, in OF, with a similar recovery compared with plasma. Therefore, drug adherence testing in OF should be further explored as a noninvasive approach, which can easily be performed in an “out-of-office” setting.

**Key Words:** adherence ■ arterial hypertension ■ compliance ■ liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry ■ toxicological analyses

**N**onadherence to prescribed drug treatment frequently occurs in hypertension and is associated with increased morbidity and mortality.<sup>1–5</sup> Assessing drug adherence in hypertensive patients can guide specific patient-centered interventions to improve adherence and might reduce the number of unnecessarily prescribed drugs.<sup>6–8</sup> Several indirect (pill count, patient diaries, adherence questionnaires, and prescription record reviews) and direct (drug monitoring in blood and urine and directly observed

therapy) methods to evaluate adherence have been introduced.<sup>9</sup> Toxicological analyses of urine and plasma are the most commonly used matrices for assessing drug adherence. However, the collection of both matrices bears potential disadvantages: collecting urine cannot be observed without infringing the patient’s privacy, whereas obtaining a blood sample is invasive and requires medical personnel. Furthermore, drug adherence monitoring in urine may cause false-positive results because the washout period for several

\*Correspondence to: Lucas Lauder, MD, Klinik für Innere Medizin III, Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes, Kirrberger Strasse 100, Geb. 41.1 (IMED), 66421 Homburg, Germany. E-mail: lucas.lauder@uks.eu

Supplementary Materials for this article are available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/JAHA.119.014180>

For Sources of Funding and Disclosures, see page 9.

© 2020 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

JAHA is available at: [www.ahajournals.org/journal/jaha](http://www.ahajournals.org/journal/jaha)

## CLINICAL PERSPECTIVE

### What Is New?

- This is the first study that showed the feasibility of detecting several antihypertensive drugs, especially those without acidic components, in oral fluid (OF).
- Using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry analysis, most antihypertensive medications were identified in urine, followed by plasma and OF.
- Antihypertensive drugs without acidic components had similar detection rates in plasma and OF, whereas antihypertensive drugs with acidic functions were poorly detected in OF.

### What Are the Clinical Implications?

- Although most antihypertensive drugs were detected in urine, drug adherence testing in OF, especially of substances without acidic components, is feasible and should be further explored as a noninvasive approach, which can easily be performed in an “out-of-office” setting.

## Nonstandard Abbreviations and Acronyms

<b>LC-HRMS/MS</b>	liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry
<b>OF</b>	oral fluid

antihypertensive drugs in urine lasts longer than multiple half-lives, usually exceeding 24 hours.<sup>10</sup> Therefore, there is an unmet need for an easily applicable and reliable method to evaluate drug adherence.<sup>7,9,11</sup> As drugs are in principle distributed to all body compartments, including oral fluids (OFs), the detection of drugs in OF may represent a novel approach in drug adherence testing. This study aimed at investigating liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS/MS) of urine, plasma, and OF to assess drug adherence in patients referred to an outpatient hypertension unit.

## METHODS

The data of this investigator-initiated study are available from the corresponding author on reasonable request. Between November 2017 and March 2018, 56 consecutive patients with hypertension who were referred to the outpatient hypertension unit at the Saarland University Medical Center (Homburg/Saar, Germany) were included in this study. All participating patients provided written informed consent, and local ethics

committees approved the study. Eligible patients were  $\geq 18$  years old, had hypertension, as defined by current guidelines,<sup>12</sup> and were prescribed to stable antihypertensive therapy for at least 2 weeks.

## Clinical Assessment

All patients were instructed to take their medication in the morning as prescribed. Medical history, physical examination, routine blood chemistry, and attended office blood pressures were documented for all patients. After 5 minutes of rest in a comfortable, seated position, 3 consecutive blood pressure measurements, 1 minute apart, were taken with a validated automated blood pressure monitor (Omron Health Care, Inc, Lake Forest, IL). If the first 2 readings varied by  $>10$  mm Hg, an additional measurement was performed. The last 2 blood pressure readings were averaged and recorded as the office blood pressure. Also, 24-hour ambulatory blood pressure monitoring (Mobil-O-Graph; I.E.M GmbH, Stolberg, Germany) was done where clinically indicated. Chronic kidney disease was defined as an estimated glomerular filtration rate  $<60$  mL/min per  $1.73$  m<sup>2</sup>. Chronic heart failure comprised patients with a history of chronic heart failure with and without reduced left ventricular ejection fraction.

## Sampling of OF, Plasma, and Urine

OF was sampled in the morning using the Quantisal OF collection device (Immunoanalysis Corporation, Pomona, CA). The collection device consists of a collection pad that collects 1 mL ( $\pm 10\%$ ) of OF and a transport tube containing liquid buffer. The device pad was placed under the patient's tongue until the volume adequacy indicator turned blue. Of note, no chemical stimuli, such as acidic stimulation (citric acid), were used to increase salivation, as this might influence drug concentrations.<sup>13</sup> After sampling, the collection pad was inserted in the transport tube and was shaken for 2 hours at room temperature to allow the extraction of the OF from the collection pad. Afterward, the collection pad was removed. Venous EDTA blood and spot urinary samples were drawn, blood was centrifuged, and the supernatant was separated. Then, OF, plasma, and urine samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the analysis was performed at the Department of Experimental and Clinical Toxicology at Saarland University (Homburg/Saar, Germany).

## Drug Adherence Analysis by LC-HRMS/MS

The detailed bioanalytical method of the targeted adherence monitoring method has been described previously.<sup>14</sup> In brief, samples were separated on a ThermoFisher Accucore PhenylnHexyl column

(ThermoFisher, Dreieich, Germany) with mobile phase A consisting of 2 mmol/L aqueous ammonium formate containing 0.1% formic acid (v/v, pH 3) and mobile phase B consisting of 2 mmol/L aqueous ammonium formate with acetonitrile:methanol (50:50, v/v, 1% water) containing 0.1% formic acid. Drugs and metabolites were analyzed by a ThermoFisher Scientific Dionex UltiMate 3000 (ThermoFisher) interfaced to an HTC PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) and a TF Q-Exactive system with a heated electrospray ionization-II source set to positive/negative switching. Mass spectrometry was performed using full-scan data and a subsequent data-dependent acquisition mode with an inclusion list containing masses of interest. TraceFinder 4.1 software (ThermoFisher) was used for data processing. People assessing drug adherence were blinded to patients' characteristics.

### Definition of Adherence

Despite recent efforts to establish a standardized classification of medication adherence,<sup>15</sup> the definitions used in the literature remain inconsistent.<sup>16</sup> We applied 2 commonly used classifications: In the first set of analyses, nonadherence was defined according to the absolute number of nondetectable drugs. If all prescribed drugs were detectable in urine, a patient was classified as "adherent." If 1 or at least 2 of the prescribed drugs were not detectable, the patient was considered to be "partially adherent" and "non-adherent," respectively. In the second set of analyses, provided in Tables S1 and S2, adherence was defined dichotomously on the basis of a threshold of 80%. If  $\geq 80\%$  of the prescribed drugs were detectable in urine, the patient was classified as "adherent." Otherwise, the patient was considered to be "nonadherent." For analyses of clinical characteristics, adherence to all substances of a single-pill combination was assumed, if at least one component of a single-pill combination was detectable (referred to as "adherence corrected for single-pill combinations").

### Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SD and numbers (percentages). Because of the relatively low sample size, we used the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test and the Mann-Whitney test to compare continuous variables between 2 paired and unpaired groups, respectively. The Kruskal-Wallis test was used for comparisons of continuous data between adherent, partially adherent, and nonadherent patients. If the Kruskal-Wallis test was significant, we used the Dunn-Bonferroni post hoc method for pairwise comparisons. For categorical variables, comparisons between independent groups were performed using Pearson's  $\chi^2$  or

Fisher's exact test, whereas McNemar's or Cochran's Q test was used for paired groups. For nominal variables, we used Fleiss' K to assess reliability. Interrater reliability was interpreted as initially suggested, with a K < 0 tentatively considered to be poor; 0 to 0.2, slight; 0.21 to 0.40, fair; 0.41 to 0.60, moderate; 0.61 to 0.80, substantial; and 0.81 to 1.00, almost perfect.<sup>17</sup> A 2-sided  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. All statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics, version 23.0 (IBM Corp, Armonk, NY), and graphs were created with GraphPad Prism, version 8.4.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

## RESULTS

### Patients' Characteristics

The patients' characteristics are summarized in Table 1. The patients' mean age was 60.0 $\pm$ 13.1 years, 54% were women, with a body mass index of 29.2 $\pm$ 6.8 kg/m<sup>2</sup>. Mean 24-hour ambulatory blood pressures were 133.8/81.4 $\pm$ 16.1/10.4 mm Hg, despite the prescription of 3.8 $\pm$ 1.4 antihypertensive drugs. In total, 59% of the patients were completely (all drugs detectable in urine, 66% after correcting for single-pill combinations) and 29% partially adherent (1 drug not detectable urine, 23% after correcting for single-pill combinations) to their prescribed antihypertensive medication. Adherence rates were highest when using urine as the matrix for LC-HRMS/MS (Figure 1). Adherent patients were prescribed to fewer antihypertensive drugs and daily doses (Figure 2) and had lower 24-hour ambulatory systolic and diastolic blood pressures compared with nonadherent or partially adherent patients (Table 1). Except for mineralocorticoid receptor antagonists ( $P=0.042$ ),  $\alpha$ -1 blockers ( $P=0.008$ ), and  $\alpha$ -2 agonists ( $P=0.008$ ), there was no difference in prescribed drug classes between completely adherent, partially adherent, and nonadherent patients (Table S3). Figure 3 depicts the adherence rates for each antihypertensive drug class.

### Comparison of Detection Methods

Figure 4 shows an example of an LC-MS spectrum for the same sample in urine, plasma, and OF. In total, 215 antihypertensive drugs were prescribed, of which 182 drugs (parent and/or their metabolites) were detected. Using LC-HRMS/MS analysis, most antihypertensive medications were identified in urine, followed by plasma and OF (181 versus 119 versus 88;  $P < 0.001$ ; Figure 5). For all substance classes but  $\alpha$ -1 blockers, detection rates of LC-HRMS/MS were highest in the urine. The overall detection rates of drugs with acidic functions, such as angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers, and

**Table 1. Patients' Characteristics**

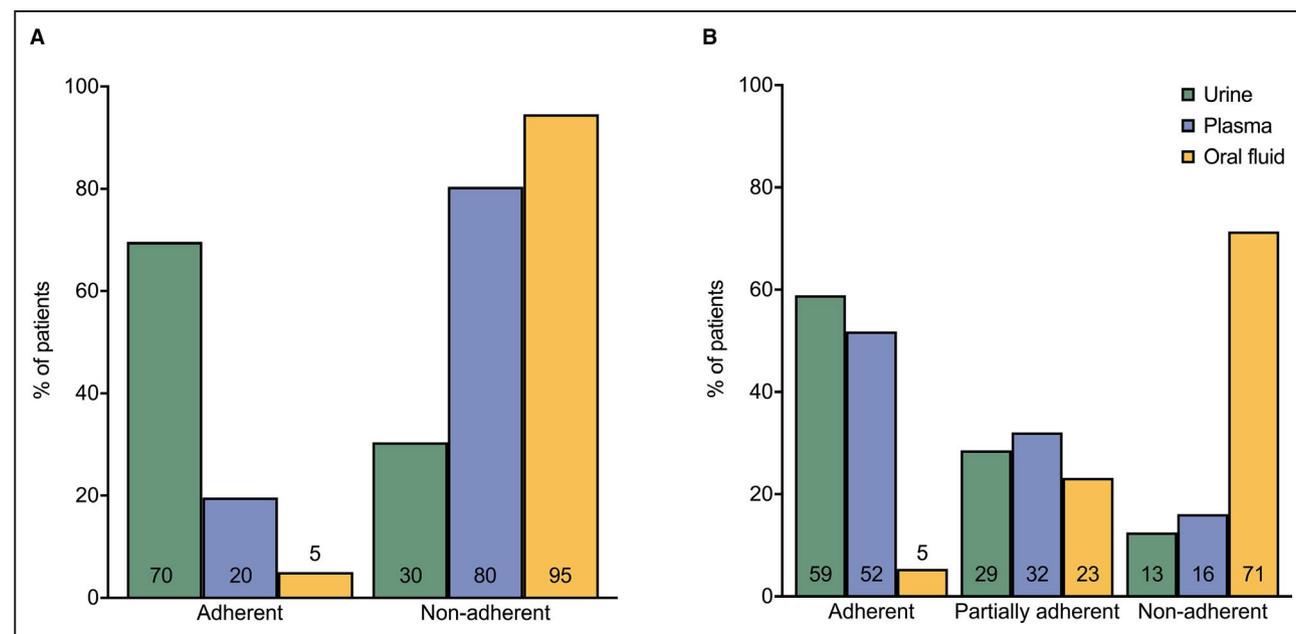
Characteristic	Nonadherent Patients		Partially Adherent Patients		Fully Adherent Patients		P Value
	Value	N	Value	N	Value	N	
Age, y	64.0±8.7	6	56.2±13.4	13	59.1±13.7	37	0.400
Women, n (%)	5 (83)	6	8 (62)	13	17 (46)	37	0.249*
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	26.1±8.2	4	30.0±6.5	11	29.3±6.9	36	0.695
Current smoker, n (%)	2 (33)	6	4 (31)	13	9 (24)	37	0.726*
Type 2 diabetes mellitus, n (%)	1 (17)	6	3 (23)	13	10 (27)	37	0.908*
Coronary artery disease, n (%)	3 (50)	6	2 (15)	13	8 (22)	37	0.242*
Chronic heart failure, n (%)	3 (50)	6	3 (23)	13	14 (38)	37	0.434*
eGFR <60 mL/min per 1.73 m <sup>2</sup> , n (%)	0 (0)	6	2 (17)	12	8 (23)	35	0.575*
Office systolic BP, mm Hg	155.5±37.3	6	143.9±24.7	12	142.3±24.7	36	0.666
Office diastolic BP, mm Hg	90.2±22.5	6	90.5±19.1	12	83.1±12.3	36	0.507
24-h Systolic BP, mm Hg	147.0±17.1	5	141.7±14.1	10	128.4±14.4	27	0.012
24-h Diastolic BP, mm Hg	81.6±9.3	5	90.0±9.3	10	77.7±9.2	27	0.009
Heart rate, bpm	80.5±15.6	6	79.6±18.3	12	78.0±11.8	35	0.950

Values are mean±SD or number (percentage). P values are given for between-group comparisons. BP indicates blood pressure; bpm, beats per minute; and eGFR, estimated glomerular filtration rate.

\*Fisher's exact test. Adherence rates were corrected for single-pill combinations.

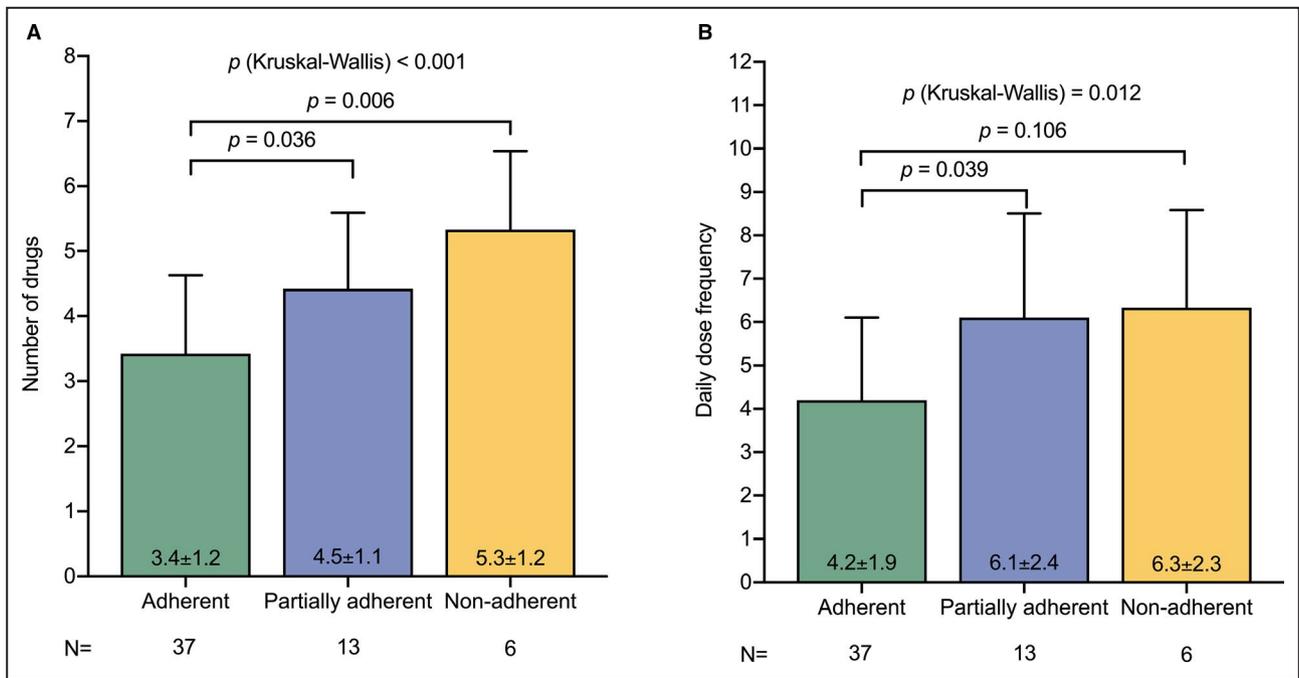
thiazides, were low in OF. However, there was no statistical difference in the frequency of detecting calcium channel blockers ( $P=0.727$ ),  $\beta$  blockers ( $P=1.000$ ), thiazides ( $P=0.125$ ), and  $\alpha$ -2 agonists ( $P=0.125$ ) between LC-HRMS/MS analyses of OF and plasma samples. Compared with urine, there was no significant

difference in the detection of calcium channel blocker ( $P=0.063$ ) and  $\beta$  blockers ( $P=1.000$ ) in OF. Of note, detection rates of drugs in OF were not different in patients with or without concomitant medication, known to possibly (eg, domperidone;  $P=0.651$ ) or commonly (eg, amiodarone;  $P=0.702$ ) cause hyposalivation.



**Figure 1. Assessment of adherence rates using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS/MS) in urine, plasma, and oral fluid.**

**A**, Patients were considered “adherent” if ≥80% of the prescribed drugs were detectable in the matrices. **B**, Patients were classified as “adherent” if all prescribed drugs were detected. If 1 or at least 2 of the prescribed drugs were not detectable, the patient was considered to be “partially adherent” and “nonadherent,” respectively.



**Figure 2. Impact of dosing regimen on adherence.**

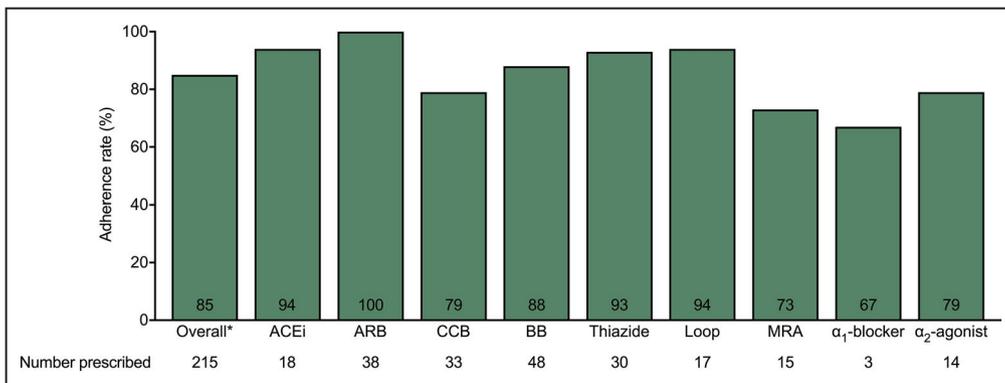
The impact of the total number of antihypertensive drugs (A) and dosing frequency (B) on adherence to antihypertensive drugs. Adherence rates were corrected for single-pill combinations. *P* values are given for between-group comparisons.

Furthermore, there were no differences in detection rates in patients with conditions known to impact salivation, such as diabetes mellitus (*P*=0.626) or chronic kidney disease (estimated glomerular filtration rate <60 mL/min per 1.73 m<sup>2</sup>; *P*=0.059). Interrater agreement was assessed for urine, plasma, and OF samples of 56 patients. For drug detection, Cohen’s  $\kappa$  ranged from 0.14 to 1.00 for urine and plasma samples, from -0.14 to 0.87 for urine and OF samples, and from 0.31 to 1.00 for plasma and OF samples (Table 2).

## DISCUSSION

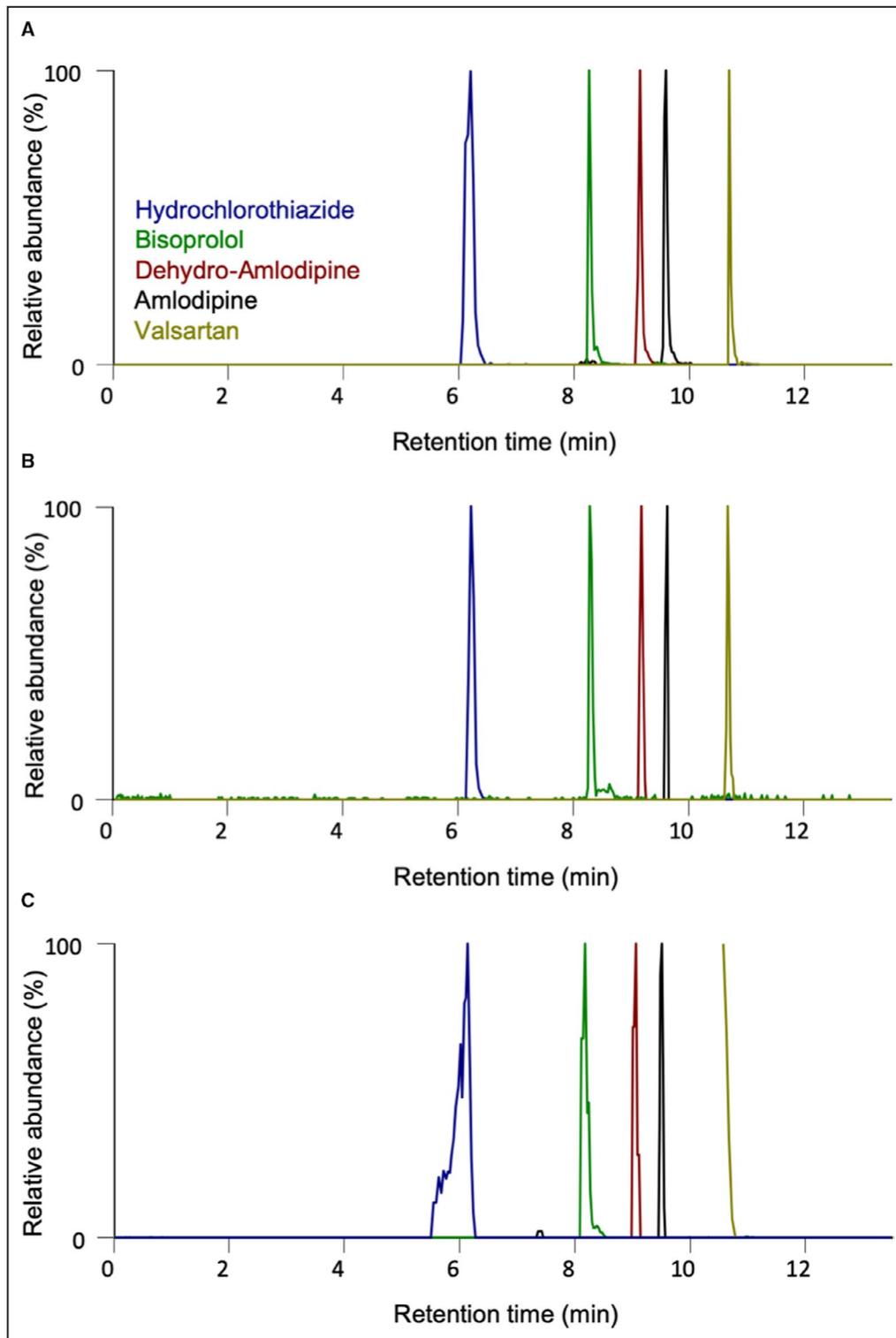
Detection rates by LC-HRMS/MS for all substance classes but  $\alpha$ -1 blockers were highest in the urine. Antihypertensive drugs without acidic components had similar detection rates in plasma and OF, whereas antihypertensive drugs with acidic functions were poorly detected in OF.

In this study, 59% of the patients were completely (66% after correcting for single-pill combinations)



**Figure 3. Adherence rates for different substance classes.**

Adherence rates were corrected for single-pill combinations. \*The overall number of drugs detected includes triamterene. As only one patient was prescribed to triamterene, potassium-sparing diuretics are not explicitly depicted in the figure. ACEi indicates angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor blocker; BB,  $\beta$  blocker; CCB, calcium channel blocker; and MRA, mineralocorticoid receptor antagonist.

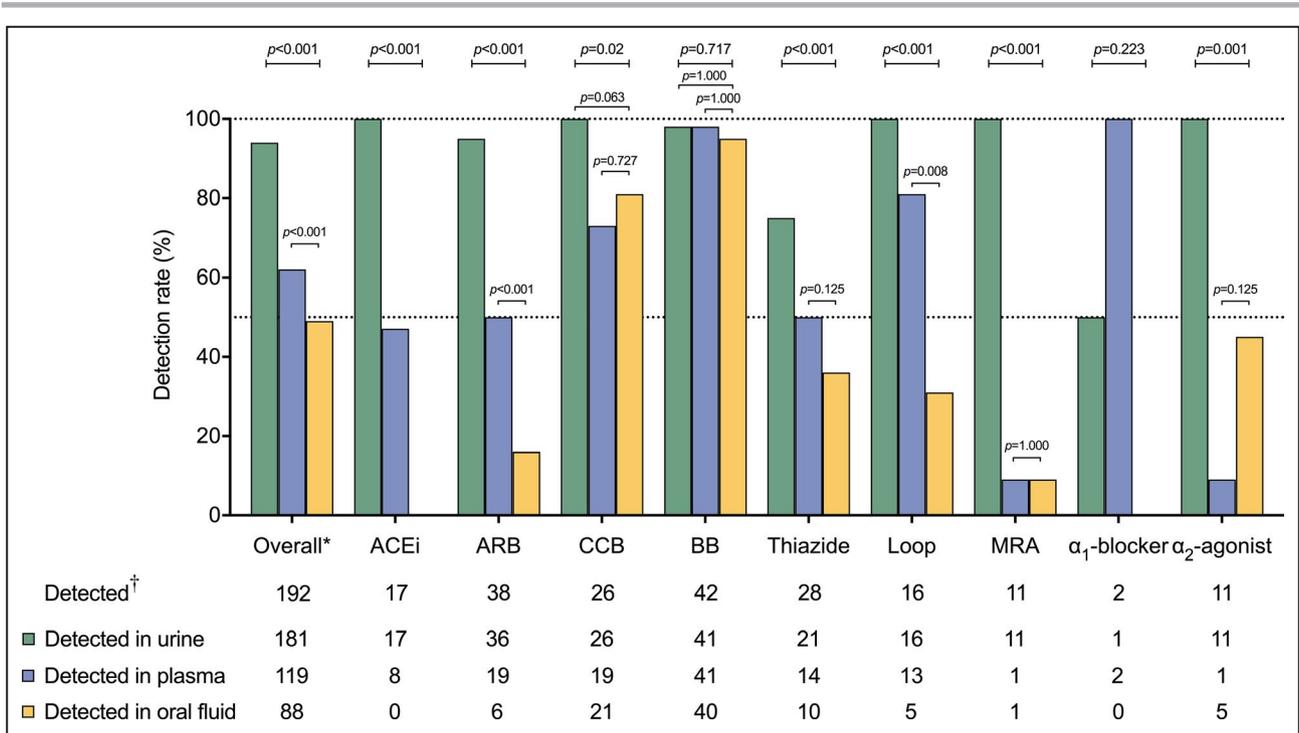


**Figure 4.** Example of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS/MS) chromatograms.

The figure shows reconstructed LC-HRMS/MS chromatograms (BCD protonated molecule; AE1E2 deprotonated molecule; E3 fragment ion) of analytes in one patient's urine (A), plasma (B), and oral fluid (C).

adherent to their prescribed antihypertensive medication, whereas 29% (23% after correcting for single-pill combinations) were partially adherent and 13% (11%

after correcting for single-pill combinations) were non-adherent. The relatively high rate of poor adherence to antihypertensive medication in this study is in line



**Figure 5. Comparison of detection rates between matrices.**

The figure depicts the detection rates of antihypertensive drugs in urine, plasma, and oral fluids. <sup>†</sup>The number of drugs detected was corrected for single-pill combinations. \*The overall number of drugs detected includes triamterene. As only one patient was prescribed to triamterene, potassium-sparing diuretics are not explicitly depicted in the figure. *P* values were calculated for the comparison between all matrices (Cochran’s Q test) and between-group comparisons of oral fluid with plasma or urine (McNemar’s test). ACEi indicates angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor blocker; BB, β blocker; CCB, calcium channel blocker; and MRA, mineralocorticoid receptor antagonist.

with previous studies using LC-HRMS/MS urine analysis.<sup>18–20</sup> In hypertension, evidence suggests that non-adherence represents an important problem in routine care. Approximately one third of the hypertensive patients do not initiate a new prescription of antihypertensive drugs,<sup>2</sup> and almost half of the patients who were prescribed an antihypertensive medication become nonadherent within 1 year.<sup>16</sup> Nonadherence to the antihypertensive medication has also been shown to be associated with increased cardiovascular risk.<sup>1–4</sup>

The 2018 European Society of Cardiology/European Society of Hypertension guidelines for the management of arterial hypertension<sup>12</sup> have put a strong emphasis on evaluating potential nonadherence as a major cause of insufficient blood pressure control and recommend drug monitoring to improve blood pressure control.<sup>12,21,22</sup> Although toxicological analyses using LC-HRMS/MS of urine and plasma are regarded as the most accurate method for the assessment of adherence, their use in clinical practice is often limited. There is an unmet need to develop an easily applicable, reliable method of drug detection, which can be implemented in the management of patients with hypertension without requiring invasive sampling and sophisticated instrumentation on site.<sup>10–12</sup> In this context, we evaluated the feasibility of adherence

monitoring of antihypertensive drugs in OF when compared with urine and plasma. In contrast to venous plasma, sampling of OF is performed noninvasively and, therefore, neither requires medical personnel nor causes discomfort, which may negatively impact patient compliance, especially in the setting of clinical studies. Unlike plasma sampling, OF collection can also easily be done in an “out-of-office” setting as the shipping and processing of OF samples does not require special capabilities.

Using LC-HRMS/MS analysis, most antihypertensive drugs were detected in urine, followed by plasma and OF. Most drugs appear to enter the saliva by passive diffusion. The saliva/plasma ratio of drugs depends, among others, on the concentration gradient of the free (unbound) fraction of the drug in the blood, the pH of OF and blood, the protein binding of the drug, and its acid dissociation constant.<sup>23,24</sup> For acidic and highly protein-binding drugs, the equilibrium generally favors blood.<sup>25,26</sup> Consequently, detection rates for angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor blockers, and thiazides were low in OF and high in plasma and urine. For calcium channel blockers, however, detection rates in OF were comparable to urine (*P*=0.063) and plasma (*P*=0.727). As single-pill combinations comprising

**Table 2. Interrater Reliability for Drug Detection Between Urine, Plasma, and OF Samples**

Antihypertensive Medication	No. of Prescriptions	Urine and Plasma		Urine and OF		Plasma and OF		Fleiss' K (95% CI)
		% Agreement	$\kappa$ (95% CI)	% Agreement	$\kappa$ (95% CI)	% Agreement	$\kappa$ (95% CI)	
Angiotensin-converting enzyme inhibitor	18	84	0.55 (0.31; 0.79)	70	*	86	*	0.20 (0.05; 0.35)
Angiotensin II receptor blocker	38	73	0.50 (0.19; 0.31)	50	-0.14 (0.03; 0.26)	77	0.38 (0.15; 0.61)	0.27 (0.12; 0.42)
Calcium channel blocker	33	88	0.74 (0.57; 0.91)	91	0.82 (0.67; 0.97)	86	0.69 (0.49; 0.89)	0.75 (0.60; 0.90)
Thiazide	30	88	0.71 (0.52; 0.90)	80	0.53 (0.31; 0.75)	93	0.79 (0.59; 0.98)	0.67 (0.52; 0.82)
Loop diuretic	17	95	0.86 (0.71; 1.01)	80	0.39 (0.14; 0.65)	86	0.49 (0.21; 0.77)	0.59 (0.44; 0.75)
Triamterene	1	100	1.00 (1.00; 1.00)	98	*	98	*	0.49 (0.34; 0.65)
$\beta$ Blocker	48	96	0.91 (0.79; 1.03)	95	0.87 (0.72; 1.01)	98	0.96 (0.87; 1.04)	0.91 (0.76; 1.06)
Mineralocorticoid receptor antagonist	15	82	0.14 (-0.11; 0.38)	82	0.14 (-0.11; 0.38)	100	1.00 (1.00; 1.00)	0.17 (0.02; 0.32)
$\alpha$ -1 Blocker	3	98	0.66 (0.04; 1.28)	98	*	96	*	0.32 (0.17; 0.47)
$\alpha$ -2 Agonist	14	82	0.14 (-0.11; 0.38)	89	0.57 (0.28; 0.87)	93	0.31 (-0.16; 0.79)	0.35 (0.19; 0.50)

OF indicates oral fluid.

\*Computation of Cohen's  $\kappa$  not possible, as the drug was not detected in OF.

## LIMITATIONS

This study was primarily designed to assess the feasibility of adherence monitoring of antihypertensive drugs in OF as a noninvasively accessible matrix. In this feasibility study, the sample size was relatively low and was not based on a priori power calculation. The results should be regarded as hypothesis generating and need validation in larger cohorts. As with all cross-sectional studies, measuring drug adherence at one occasion only incompletely reflects the dynamic process of a patient's drug-taking behavior, which encompasses the initiation of a newly

a renin-angiotensin system inhibitor in conjunction with a calcium channel blocker or diuretic are recommended as initial therapy in most patients, the detection of one of these substances may be sufficient enough to screen for adherence. Drug adherence monitoring in urine alone may cause false-positive results because the washout period for several antihypertensive drugs in urine lasts longer than multiple half-lives, usually >24 hours.<sup>10</sup> Less is known on the detection time of drugs in OF. However, for drugs of abuse, detection times are far shorter in OF than in urine.<sup>27</sup> Urine may still be the matrix of choice for qualitative analyses, such as adherence screening in general, but an additional LC-HRMS/MS analysis of plasma or OF should be considered to assess recent drug intake. Although the present study analyzed the feasibility of qualitative analyses of antihypertensive drugs, recent data indicate that OF can be used for quantitative analyses similarly.<sup>28,29</sup>

The OF is secreted by 3 pairs of salivary glands (parotid, submandibular, and sublingual glands), the gingival cervicular sulci, and hundreds of minor accessory salivary glands.<sup>30</sup> The sympathetic and parasympathetic nervous system regulates salivation and follows a circadian pattern.<sup>30</sup> A higher salivatory flow rate is associated with higher bicarbonate concentrations and pH.<sup>24,30,31</sup> The pH of OF highly depends on physiological conditions and can range from 6.0 to 8.0.<sup>24,30,31</sup> Under resting conditions, the pH of OFs is stabilized at  $\approx 7.0$ .<sup>30</sup> When collecting OF, several factors have to be considered, which may influence salivation. These include the patient's diet, emotional states (eg, hunger and anxiety), medications (antidepressants), and medical conditions (cystic fibrosis, diabetes mellitus, and end-stage renal disease).<sup>25,30,32,33</sup> Therefore, sampling of OF should be performed under standardized conditions (at the same daytime and during rest). However, herein, there was no difference in detection rates for patients with or without diabetes mellitus ( $P=0.626$ ), chronic kidney disease ( $P=0.059$ ), or drugs known to influence salivation ( $P>0.651$ ).

prescribed drug, the implementation of the dosing regimen, and its discontinuation.<sup>34</sup> The study protocol did not require directly observed drug intake. As most drugs enter saliva by passive diffusion, the saliva/plasma ratio does not only depend on the concentration gradient but also the pH of OF, which can be influenced by drugs, medical conditions, and the autonomic nervous system.

## CONCLUSIONS

Although more drugs were detectable in urine, this study showed the feasibility of detecting several antihypertensive drugs or their compounds in OF. Therefore, drug adherence testing in OF should further be investigated as a noninvasive approach, not requiring medical personnel, and can be directly observed without interfering with the patient's privacy.

## PERSPECTIVES

Assessing drug adherence in hypertensive patients might reduce the number of unnecessarily prescribed drugs. In patients with apparently treatment-resistant hypertension, therapeutic drug monitoring was shown to improve blood pressure control. LC-HRMS/MS of urine and plasma is regarded as the most accurate method for the assessment of adherence. However, there is an unmet need for an easily applicable, cost-effective, and reliable method to evaluate drug adherence, with no need for invasive sampling at best. Drug adherence testing in OF is feasible for several antihypertensive drugs and should further be investigated as a noninvasive approach, which can also easily be done in an "out-of-office" setting.

## ARTICLE INFORMATION

Received February 18, 2020; accepted April 15, 2020.

### Affiliations

From the Klinik für Innere Medizin III, Kardiologie, Angiologie und Internistische Intensivmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes and Saarland University (L.L., S.E., M.K., I.K., M.B., F.M.), and Department of Experimental and Clinical Toxicology, Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Center for Molecular Signaling (L.H.J.R., C.M.J., M.R.M.), Saarland University, Homburg/Saar, Germany; and Institute for Medical Engineering and Science, MIT, Cambridge, MA (F.M.).

### Sources of Funding

We acknowledge support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (German Research Foundation) and Saarland University within the funding program Open Access Publishing.

### Disclosures

Dr Ewen received scientific support and speaker honoraria from Medtronic and ReCor Medical. Dr Kindermann received speaker honoraria and consultancy fees from Astra, Fresenius, Boehringer Ingelheim, Novartis, Pfizer, Vifor, and Bayer. Dr Böhm received support from Abbott, Amgen, Astra-Zeneca, Bayer, Boehringer-Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB TRR219, S-01, M-03, M-05), Medtronic,

Novartis, ReCor Medical, Servier, and Vifor. Dr Mahfoud is supported by Deutsche Gesellschaft für Kardiologie and Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB TRR219) and has received scientific support and speaker honoraria from Bayer, Boehringer Ingelheim, Medtronic, and ReCor Medical. The remaining authors have no disclosures to report.

## Supplementary Materials

Tables S1–S3

## REFERENCES

1. Ho PM, Bryson CL, Rumsfeld JS. Medication adherence: its importance in cardiovascular outcomes. *Circulation*. 2009;119:3028–3035.
2. Fischer MA, Stedman MR, Lii J, Vogeli C, Shrank WH, Brookhart MA, Weissman JS. Primary medication non-adherence: analysis of 195,930 electronic prescriptions. *J Gen Intern Med*. 2010;25:284–290.
3. Corrao G, Parodi A, Nicotra F, Zambon A, Merlino L, Cesana G, Mancia G. Better compliance to antihypertensive medications reduces cardiovascular risk. *J Hypertens*. 2011;29:610–618.
4. Gehi AK, Ali S, Na B, Whooley MA. Self-reported medication adherence and cardiovascular events in patients with stable coronary heart disease: the heart and soul study. *Arch Intern Med*. 2007;167:1798–1803.
5. Böhm M, Lloyd SM, Ford I, Borer JS, Ewen S, Laufs U, Mahfoud F, Lopez-Sendon J, Ponikowski P, Tavazzi L, et al. Non-adherence to ivabradine and placebo and outcomes in chronic heart failure: an analysis from SHIFT. *Eur J Heart Fail*. 2016;18:672–683.
6. Patel P, Gupta PKC, White CMJ, Stanley AG, Williams B, Tomaszewski M. Screening for non-adherence to antihypertensive treatment as a part of the diagnostic pathway to renal denervation. *J Hum Hypertens*. 2016;30:368–373.
7. Berra E, Azizi M, Capron A, Høieggen A, Rabbia F, Kjeldsen SE, Staessen JA, Wallemacq P, Persu A. Evaluation of adherence should become an integral part of assessment of patients with apparently treatment-resistant hypertension. *Hypertension*. 2016;68:297–306.
8. Senst BL, Achusim LE, Genest RP, Cosentino LA, Ford CC, Little JA, Raybon SJ, Bates DW. Practical approach to determining costs and frequency of adverse drug events in a health care network. *Am J Heal Pharm*. 2001;58:1126–1132.
9. Osterberg L, Blaschke T. Drug therapy: adherence to medication. *N Engl J Med*. 2005;353:487–497.
10. Gupta P, Patel P, Horne R, Buchanan H, Williams B, Tomaszewski M. How to screen for non-adherence to antihypertensive therapy. *Curr Hypertens Rep*. 2016;18:89.
11. Burnier M. Managing "resistance": is adherence a target for treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23:439–443.
12. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, et al. 2018 ESC/ESH guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39:3021–3104.
13. O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah AA. The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations. *J Anal Toxicol*. 2000;24:536–542.
14. Richter LHJ, Jacobs CM, Mahfoud F, Kindermann I, Böhm M, Meyer MR. Development and application of a LC-HRMS/MS method for analyzing antihypertensive drugs in oral fluid for monitoring drug adherence. *Anal Chim Acta*. 2019;1070:69–79.
15. Garcia Garcia HM, Vrijens B, Vranckx P, McFadden EP, Costa F, Pieper K, Vock DM, Zhang M, Van Es G-A, et al. Standardized classification and framework for reporting, interpreting, and analysing medication non-adherence in cardiovascular clinical trials: a consensus report from the Non-adherence Academic Research Consortium (NARC). *Eur Heart J*. 2018;40:2070–2085.
16. Vrijens B, Vincze G, Kristanto P, Urquhart J, Burnier M. Adherence to prescribed antihypertensive drug treatments: longitudinal study of electronically compiled dosing histories. *BMJ*. 2008;336:1114–1117.
17. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159.
18. Jung O, Gechter JL, Wunder C, Paulke A, Bartel C, Geiger H, Toennes SW. Resistant hypertension? Assessment of adherence by toxicological urine analysis. *J Hypertens*. 2013;31:766–774.
19. Tomaszewski M, White C, Patel P, Masca N, Damani R, Hepworth J, Samani NJ, Gupta P, Madira W, Stanley A, et al. High rates of

- non-adherence to antihypertensive treatment revealed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HP LC-MS/MS) urine analysis. *Heart*. 2014;100:855–861.
20. Azizi M, Pereira H, Hamdidouche I, Gosse P, Monge M, Bobrie G, Delsart P, Mounier-Véhier C, Courand P-Y, Lantelme P, et al. Adherence to antihypertensive treatment and the blood pressure-lowering effects of renal denervation in the renal denervation for hypertension (DENERHTN) trial. *Circulation*. 2016;134:847–857.
  21. Gupta AK, Arshad S, Poulter NR. Compliance, safety, and effectiveness of fixed-dose combinations of antihypertensive agents: a meta-analysis. *Hypertension*. 2010;55:399–407.
  22. Brinker S, Pandey A, Ayers C, Price A, Raheja P, Arbique D, Das SR, Halm EA, Kaplan NM, Vongpatanasin W. Therapeutic drug monitoring facilitates blood pressure control in resistant hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:834–835.
  23. Matin SB, Wan SH, Karam JH. Pharmacokinetics of tolbutamide: prediction by concentration in saliva. *Clin Pharmacol Ther*. 1974;16:1052–1058.
  24. Hold KM, de Boer D, Zuidema J, Maes RAA. Saliva as an analytical tool in toxicology. *Int J Drug Test*. 1999;1:16–23.
  25. Drummer OH. Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev*. 2006;27:147–159.
  26. Crouch DJ. Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int*. 2005;150:165–173.
  27. Verstraete AG. Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Ther Drug Monit*. 2004;26:200–205.
  28. Meyer MR, Rosenborg S, Stenberg M, Beck O. First report on the pharmacokinetics of tramadol and O-desmethyltramadol in exhaled breath compared to plasma and oral fluid after a single oral dose. *Biochem Pharmacol*. 2015;98:502–510.
  29. Caspar AT, Meyer MR, Maurer HH. Blood plasma level determination using an automated LC-MS n screening system and electronically stored calibrations exemplified for 22 drugs and two active metabolites often requested in emergency toxicology. *Drug Test Anal*. 2018;1–10.
  30. Aps JKM, Martens LC. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005;150:119–131.
  31. O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah A, Cheever ML. Correlation of saliva codeine concentrations with plasma concentrations after oral codeine administration. *J Anal Toxicol*. 1999;23:452–459.
  32. Kho H-S, Lee S-W, Chung S-C, Kim Y-K. Oral manifestations and salivary flow rate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88:316–319.
  33. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92:281–291.
  34. Vrijens B, De Geest S, Hughes DA, Przemyslaw K, Demonceau J, Ruppert T, Dobbels F, Fargher E, Morrison V, Lewek P, et al. A new taxonomy for describing and defining adherence to medications. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;73:691–705.