

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER – SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Proteinbindungscharakter
und Pharmakokinetik von Ertapenem
bei Intensivpatienten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Uwe Liebchen

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN I
PROF. DR. MED. MARTINA MÜLLER – SCHILLING
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Proteinbindungscharakter
und Pharmakokinetik von Ertapenem
bei Intensivpatienten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Uwe Liebchen

2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

Prof. Dr. Bernd Salzberger

Prof. Dr. Frieder Kees

07.04.2017

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	PHARMAKOKINETISCHE BESONDERHEITEN DER ANTIBIOTIKATHERAPIE BEI INTENSIVPATIENTEN.....	7
1.2	PK/PD UND DIE RELEVANZ FÜR DIE THERAPIE VON ERTAPENEM	11
1.3	ERTAPENEM	13
1.3.1	<i>Chemische Struktur und Struktur-Wirkungsbeziehung</i>	13
1.3.2	<i>Pharmakodynamik und Anwendungsbereiche</i>	14
1.3.3	<i>Pharmakokinetik bei gesunden Probanden</i>	15
1.4	STUDIENLAGE: PHARMAKOKINETIK VON ERTAPENEM BEI INTENSIVPATIENTEN	16
2	HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	18
3	MATERIALIEN UND METHODEN	19
3.1	ALLGEMEINE LABORGERÄTE	19
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	20
3.3	REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	20
3.4	ARZNEIMITTEL	21
3.5	HPLC-ANALYSE	21
3.5.1	<i>Bestimmung der totalen Konzentration von Ertapenem</i>	22
3.5.2	<i>Bestimmung der freien Konzentration von Ertapenem</i>	25
3.5.3	<i>Bindung von Ertapenem an Plasmaproteine und Albumin</i>	27
3.6	BESTIMMUNG KLINISCH-CHEMISCHER PARAMETER	29
3.7	UNTERSUCHUNGEN AN PATIENTEN.....	29
3.7.1	<i>Studiendesign</i>	29
3.7.2	<i>Patientenselektion</i>	30
3.7.3	<i>Medikation</i>	31
3.7.4	<i>Datensammlung und -management</i>	31
3.7.5	<i>Entnahme, Handhabung und Lagerung der Blutproben</i>	33
3.7.6	<i>Pharmakokinetische Berechnungen</i>	33

3.7.7	<i>Statistische Auswertung</i>	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	KENNDATEN DER HPLC-METHODE	35
4.1.1	<i>Selektivität</i>	35
4.1.2	<i>Präzision und Richtigkeit</i>	36
4.1.3	<i>Patienten</i>	37
4.1.4	<i>Plasmakonzentrationen von Ertapenem</i>	39
4.1.5	<i>Pharmakokinetische Auswertung</i>	39
4.2	BINDUNG VON ERTAPENEM AN ALBUMIN	42
4.2.1	<i>Bindung an Probandenplasma</i>	43
4.2.2	<i>Bindung an Patientenplasma</i>	44
4.2.3	<i>Vergleich der Proteinbindung</i>	45
5	DISKUSSION	47
5.1	HPLC-METHODE	47
5.2	ULTRAFILTRATION ALS METHODE DER WAHL ZUR MESSUNG FREIER PLASMAKONZENTRATIONEN	47
5.3	PROTEINBINDUNG VON ERTAPENEM	49
5.4	PHARMAKOKINETISCHE PARAMETER VON ERTAPENEM BEI INTENSIVPATIENTEN	51
5.5	BEURTEILUNG DER PK/PD-INDICES VON ERTAPENEM	54
5.6	EINSCHRÄNKUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT	55
6	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	57
7	LITERATUR	58
8	ANHANG	68
8.1	CASE-REPORT FORM (CRF)	68
8.2	LEBENS LAUF	75
8.3	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	76
8.4	PUBLIZIERTE ORIGINALARBEIT	77
9	DANKSAGUNG	81
10	ERKLÄRUNG	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SI-Einheiten und das Periodensystem der Elemente wurden als bekannt vorausgesetzt und werden nicht näher erläutert.

Abkürzung	Erläuterung
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Alb	Albumin
AmpC	Serin-Beta-Laktamase
Anm.	Anmerkung
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
ARC	Augmented renal clearance
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
C	Konzentration
C ₀	Konzentration zum Zeitpunkt "0"
C _{12h}	Konzentration 12 h nach Infusion
C _{24h}	Konzentration 24 h nach Infusion
CL	Clearance
CL _{int}	Intrinsische Clearance
C _{max}	Spitzenspiegel
C _{min}	Talspiegel
CRF	Case Report Form, Prüfbogen
CRP	C-reaktives Protein
CV	Coefficient of variation, Variationskoeffizient
CV _{inter}	Inter-Assay-Variation
CV _{intra}	Intra-Assay-Variation
CVVH	Kontinuierliche venovenöse Hämofiltration
CysC	Cystatin C
D	Dosis
DALI	Defining antibiotic levels in intensive care unit patients

eCL _{CG}	Glomeruläre Filtrationsrate berechnet nach Cockroft-Gault anhand von Kreatinin
eCL _{Hoek}	Glomeruläre Filtrationsrate berechnet nach Hoek anhand von Cystatin C
ERT	Ertapenem
ERT _{frei}	Freies Ertapenem
ERT _{total}	Totales Ertapenem
ESBL	Extended spectrum beta lactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
f	Wert für freie Konzentration
Fa.	Firma
FDA	US Food and Drug Administration
f_u	Ungebundener Anteil im Plasma
f_{uT}	Ungebundener Anteil im Gewebe
g	Erdbeschleunigung
GFR	Glomeruläre filtrationsrate
HAP	Hospital-acquired pneumonia
HD	Hämodialyse
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSA	Humanes Serum Albumin
I/R	Intermediär-resistent Grenzwert
ID	Identifikationsnummer
IMP-1	Metallo-beta-laktamase
IPP	Isotonischer Phosphatpuffer
i.v.	Intravenös
KA	Kontrolle A
KB	Kontrolle B
k_d	Dissoziationskonstante
k_e	Eliminationskonstante
Konz.	Konzentration
Krea	Serumkreatinin
LC/MSMS	Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie

Lit.	Literatur
LP	Leerplasma
LPS	Lipopolysaccharide
M	Männlich
Max.	Maximum
Med.	Median
MG	Molekulargewicht
MHK	Minimale Hemmkonzentration
Min.	Minimum
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MW	Mittelwert
n.d.	Not done (nicht durchgeführt)
NF- κ B	Transkriptionsfaktor: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'
NW	Nominalwert
OprD	Outer membrane porin D
PAE	Postantibiotischer Effekt
PBP	Penicillin bindende Proteine
PCT	Procalcitonin
PD	Pharmakodynamik
PK	Pharmakokinetik
Q	Blutfluss
QSIInf	Studie zur Qualitätssicherung antiinfektiver Therapie auf Intensivstationen
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Bestimmtheitsmaß
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
sa1GP	Alpha-1 saures Glykoprotein
SAPS	Simplified acute physiology score
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOFA	Sequential organ failure assessment

SR	Standardreferenz
SSSI	Skin and skin structure infections
Std	Standard
$T_{>MHK}$	Zeit der Konzentration im Plasma über der MHK
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TDM	Therapeutic drug monitoring
Temp.	Temperatur
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
UV	Ultraviolett
VAP	Ventilator-associated pneumonia
V_d	Fiktives Verteilungsvolumen
V_p	Verteilungsvolumen im Plasma
V_{ss}	Fiktives Verteilungsvolumen im Gleichgewichtszustand
V_T	Verteilungsvolumen im Gewebe
VV	Vorverdünnung
W	Weiblich

1 Einleitung

Die Prävalenz von schweren Infektionen ist auf Intensivstationen auch heute noch hoch. Insbesondere die Sepsis und der septische Schock sind Syndrome mit einer hohen Mortalität [1,2]. In einer Studie an 3877 Intensivpatienten in Deutschland aus dem Jahr 2007 betrug die Sterberate einer schweren Sepsis insgesamt 55,2 %, in der Untergruppe des septischen Schocks sogar 62,7 % [2]. Die wichtigste Säule der Behandlung von schweren bakteriellen Infektionen ist eine wirksame Antibiotikatherapie, wie Kumar 2006 für den septischen Schock zeigen konnte: die Mortalität des septischen Schocks steigt mit jeder Stunde, die ohne die Initiierung einer wirksamen Antibiotikatherapie verstreicht, um ca. 7 % an [3]. Zu einer wirksamen Antibiotikatherapie gehören die Auswahl der richtigen Substanz und die korrekte Dosierung. Eine wichtige Rolle in der frühen und zielgerichteten Behandlung schwerer Infektionen auf Intensivstationen spielen die Carbapeneme [4]. In dieser Arbeit soll auf die Pharmakokinetik von Ertapenem, einem Carbapenem, das seit 2002 unter dem Handelsnamen Invanz® auf dem europäischen Markt zugelassen ist, eingegangen werden.

1.1 Pharmakokinetische Besonderheiten der Antibiotikatherapie bei Intensivpatienten

Die Dosis eines Antibiotikums wird hauptsächlich von Studien an gesunden Probanden abgeleitet. Intensivpatienten unterscheiden sich allerdings in vielerlei Hinsicht von gesunden Probanden, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass Intensivpatienten die gleichen Plasmakonzentrationen erreichen wie gesunde Probanden. Beispielsweise leiden sie unter Organausfällen, malignen Vorerkrankungen, Verbrennungen oder schweren Traumata. Hinzu kommt das Arsenal anderer Medikamente mit möglichen Medikamenteninteraktionen [5]. Abb. 1 zeigt die pathophysiologischen Besonderheiten bei Intensivpatienten und deren Einfluss auf pharmakokinetische Parameter. Alles in allem sind pharmakokinetische Veränderungen bei Intensivpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden eher die Regel als die Ausnahme. Sie resultieren in einer erhöhten Variabilität der Plasmaspiegel mit der Gefahr zu niedriger bzw. zu hoher Plasmaspiegel und eines hiermit assoziierten Therapieversagens oder toxischer Nebenwirkungen [5–7]. Ein starres Konzept („1 x 1g Fantastocillin täglich“ [8]) gefährdet die Wirksamkeit der Antibiotikatherapie.

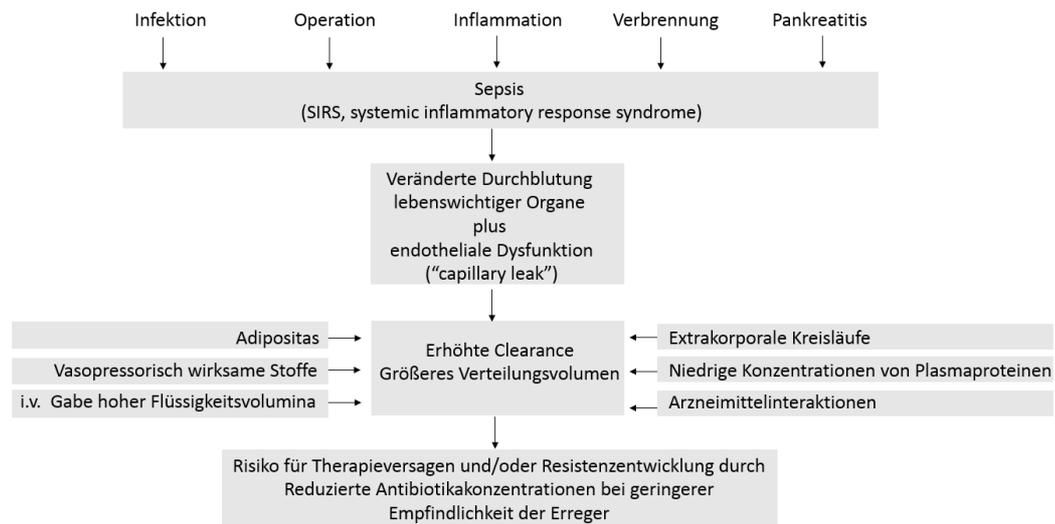


Abb. 1: Pathophysiologische Besonderheiten und pharmakokinetische Folgen bei Intensivpatienten (nach [9]).

"Ein Antibiotikum muss so dosiert werden, dass am Ort der Infektion hinreichend hohe Konzentrationen hinreichend lange erreicht werden" [10]. Die *Empfindlichkeit der Erreger* (ausgedrückt als Minimale Hemmkonzentration, MHK) und die Pharmakokinetik des Antibiotikums sind also für den therapeutischen Erfolg bestimmend. Verteilung (*Verteilungsvolumen*) im Körper und Ausscheidung (*Clearance*) charakterisieren die Pharmakokinetik eines Antibiotikums und sind gemeinsam für die Halbwertszeit und den Konzentrations-Zeit-Verlauf intravenös verabreichter Antibiotika entscheidend. Die Halbwertszeit ist direkt proportional dem Verteilungsvolumen und indirekt proportional der Clearance ($t_{1/2} = \ln 2 \times V_d / CL$). Da nur der freie, nicht-proteingebundene Anteil eines Antibiotikums pharmakologisch wirksam ist, ist auch die Höhe der *Proteinbindung* für die Wirksamkeit und damit den Erfolg der antimikrobiellen Therapie relevant [11–13]. Alle angesprochenen Aspekte weisen Besonderheiten bei Intensivpatienten auf, die in der Folge erläutert werden sollen.

Erhöhtes Verteilungsvolumen

Lipophile Substanzen haben durch ihre bessere Membrangängigkeit in der Regel ein höheres Verteilungsvolumen als hydrophile. Letztere tendieren eher zu niedrigeren Verteilungsvolumen und bleiben zu einem bedeutenden Anteil im Gefäßsystem [14]. Bei Intensivpatienten kommt es im Rahmen einer Sepsis (durch Endotoxinausschüttung) zu einer unspezifischen Ausschüttung körpereigener Mediatoren (TNF-alpha, NF- κ B, Interleukine, NO), die eine generalisierte

Entzündungsreaktion (SIRS) zur Folge haben. Diese führt zu Vasodilatation, Endothelschäden durch Apoptose und einer kapillären Durchlässigkeit („capillary leak syndrome“) [15]. Es folgt eine Volumenverschiebung vom Gefäßsystem ins Interstitium mit konsekutivem intravasalen Volumenmangel und Blutdruckabfall, dem i.d.R. mit einer ausgedehnten Therapie mit Kristalloiden (und Kolloiden) begegnet wird. Hinzu kommt, dass das Ausmaß der Proteinbindung von Antibiotika das Verteilungsvolumen beeinflusst. Das „capillary leak syndrome“, die massive Volumetherapie und die verminderte Proteinbindung zusammen führen bei hydrophilen Pharmaka wie Beta-Laktamen zu einem erhöhten Verteilungsvolumen [14]. Die Folge eines (isoliert) erhöhten Verteilungsvolumens ist eine längere Halbwertszeit, niedrigere Spitzenspiegel und höhere Talspiegel.

Veränderte Clearance

Die meisten Beta-Laktame (auch Ertapenem) werden wie andere hydrophile Medikamente v.a. renal eliminiert. Da die schwere Krankheitssituation bei Intensivpatienten in vielen Fällen eine Abweichung von der normalen Nierenfunktion nach sich zieht, ist der Einfluss der Nierenfunktion auf die Clearance von hydrophilen Substanzen größer als auf die von lipophilen Substanzen [16]. Die Clearance kann bei Intensivpatienten sowohl erhöht, als auch vermindert sein.

Verminderte Clearance: Nicht selten kommt es im Verlauf eines Intensivaufenthaltes zu einem akuten Nierenversagen, für das neben vorbestehenden Nierenerkrankungen am häufigsten eine Sepsis die Ursache ist [17]. In diesem Fall entgiftet die Niere nicht ausreichend und es kommt zu einer Kumulation renal eliminiertes Antibiotika und anderer harnpflichtiger Substanzen. In der Regel wird hierauf mit einer Nierenersatztherapie reagiert (CVVH, HD). Wie diese Ersatzverfahren die Plasmakonzentrationen verändern, hängt von diversen Faktoren wie z.B. Molekulargewicht, Proteinbindung, Hydrophilie des Antibiotikums und Eigenschaften des Ersatzverfahrens wie Filtergröße oder Flussrate ab. Eine Vorhersage scheint schwierig zu sein und die Variabilität der Spiegel hoch [5]. In einer multizentrischen Studie an 24 Intensivpatienten zeigte sich, dass im Fall von akutem Nierenversagen und Nierenersatztherapie die Zielkonzentrationen in ca. 25 % der Fälle verfehlt wurden [18].

Gesteigerte renale Clearance: Das Gegenteil ist als Folge einer inflammatorischen Reaktion zu beobachten. Es kommt während einer hyperdynamen Kreislaufsituation zu einer vermehrten Durchblutung der Nieren, was zu einer erhöhten Ausscheidung körpereigener sowie körperfremder Stoffe führt. Dieser Zustand tritt gehäuft bei Patienten mit traumatischen

Hirnverletzungen, Meningitis, postoperativen Patienten, Verbrennungsoptionen, VAP-Patienten und Schwangeren auf. Jüngere Patienten scheinen insgesamt häufiger betroffen zu sein als ältere. Insgesamt wird von einer Prävalenz dieses als „augmented renal Clearance“ (ARC) bezeichneten Zustandes von 30 - 85 % berichtet. Es zeigte sich eine Korrelation für eine gesteigerte renale Clearance von $> 130 \text{ ml/min} / 1,73 \text{ m}^2$ und subtherapeutische Plasmaspiegel [5].

Veränderte Proteinbindung

Die meisten Beta-Laktame binden nur in geringem Maße an Proteine [19]. Sofern sie hocheiweißgebunden sind, wie z.B. Ertapenem oder Ceftriaxon, binden sie aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften (eher sauer) vor allem an Albumin [20]. Aus diesem Grund ist die Albuminkonzentration einer der wichtigsten Faktoren für das Ausmaß der Proteinbindung. Bei Intensivpatienten ist sie jedoch häufig vermindert [21], was für einige Antibiotika in einer geringeren Plasmaeiweißbindung resultiert. Zahlreiche weitere Faktoren haben einen Einfluss auf das Ausmaß der Proteinbindung (Abb. 2 [20]).

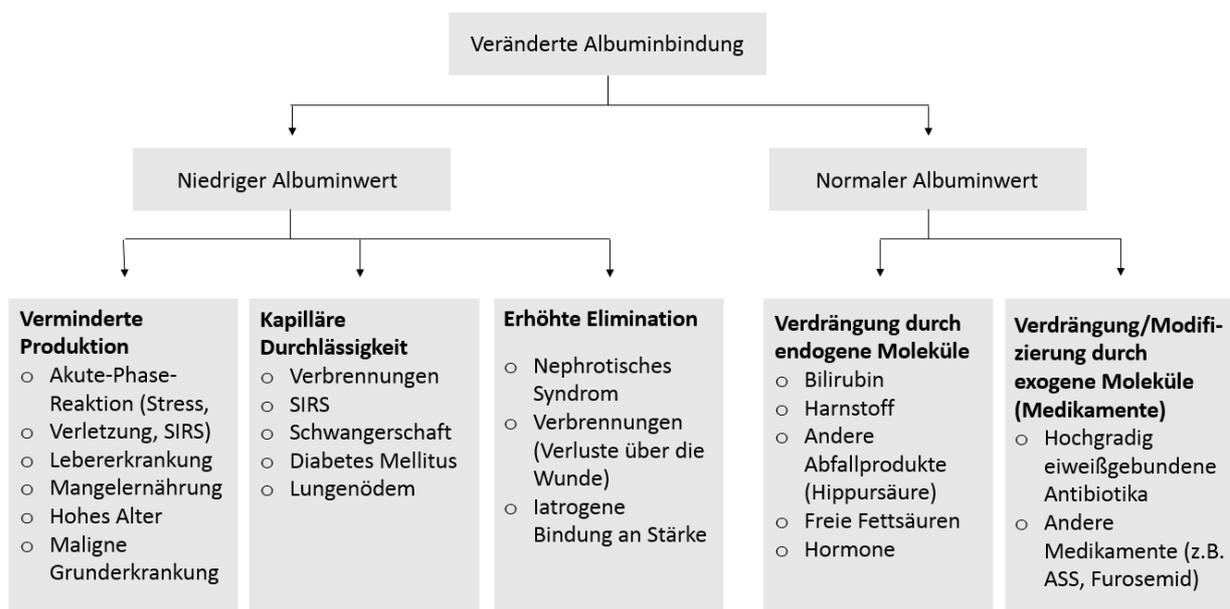


Abb. 2: Faktoren, die für veränderte Bindungseigenschaften von Medikamenten an Albumin verantwortlich sind (nach [20]).

Unempfindliche Erreger

Die Empfindlichkeit eines Erregers lässt sich am einfachsten durch die MHK (Minimale Hemmkonzentration) ausdrücken. Sie bezeichnet die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der die *in vitro* Vermehrung von Mikroorganismen mit bloßem Auge (Trübung) nicht

wahrgenommen werden kann [22]. Da die MHK der entscheidende Grenzwert eines Bakteriums für die Bewertung des Plasmaspiegels ist, lohnt es sich diese zu beachten. Optimal wäre es im Falle einer Infektion stets den Erreger mit dessen MHK zu identifizieren, um eine Vorstellung von der Wirksamkeit des Antibiotikums zu bekommen. Im Zeitalter multiresistenter Erreger ist es zwar nicht nur auf Intensivstationen notwendig, Patienten mit bakteriellen Infektionen individualisiert und gezielt zu therapieren, dort kommt es jedoch zu einem vermehrten Auftreten von resistenten Erregern mit höheren MHKs als auf Normalstationen [8,23]. Es gibt Stimmen, die als Folge hierauf (generell) höhere Dosierungen auf Intensivstationen fordern, um der Situation gerecht zu werden und den therapeutischen Erfolg nicht zu gefährden [5].

1.2 PK/PD und die Relevanz für die Therapie von Ertapenem

Isoliert betrachtet liefert die Pharmakokinetik keine Aussage über den klinischen Erfolg. Nur die Verbindung zwischen der Pharmakokinetik und der zugehörigen Effektivität (Pharmakodynamik) eines Antibiotikums kann hier hilfreich sein. Diese Effektivität wird bei Antibiotika meistens *in vitro* durch die MHK oder time-kill-curves beschrieben. In Abb. 3 sieht man, dass es Antibiotika gibt, bei denen die Abtötung proportional zur Konzentration ist und solche, bei denen ab einer Konzentration von 4-5 x MHK keine höhere Abtötungsrate erfolgt. Erstere nennt man konzentrationsabhängige Antibiotika und man definiert als relevanten PK/PD-Index C_{max}/MHK , also das Verhältnis des Spitzenspiegels zur MHK. Letztere bezeichnet man als zeitabhängige Antibiotika mit $T >_{MHK}$ als relevantem Index, d.h. die Zeit während der die Konzentration oberhalb der MHK liegt, gilt als entscheidend. Diese Indices bilden die Grundlage der modernen, rationalen Antibiotikatherapie, die Resistenzbildung vermeiden und Erreger zielsicher abtöten soll.

Dieser Ansatz ist eigentlich schon sehr lange bekannt, auch wenn er in der Zwischenzeit nicht immer respektiert wurde. Bereits im Jahr 1950 gelang es Eagle et al. den zeitabhängigen Effekt von Penicillin zu zeigen. Nicht die Maximaldosis, sondern die Dauer, welche die Konzentration des Antibiotikums über einem bestimmten Grenzwert (MHK) liegt, ist für den therapeutischen Erfolg entscheidend. Im gleichen Atemzug wurde von derselben Forschungsgruppe die kontinuierliche Infusion von Penicillin empfohlen [24,25]. In der modernen Literatur wird die Theorie von Eagle et al. bestätigt [26–28].

Ähnlich verhält es sich auch mit der Wirksamkeit anderer Beta-Laktam Antibiotika (Cephalosporinen, Carbapenemen) sowie einiger Makrolide und Clindamycin [29]. Auch hier besteht nur eine sehr geringe Korrelation zwischen Effektivität und dem Spitzenspiegel des

Antibiotikums. Sobald eine ca. 4-fache Konzentration der MHK erreicht ist, führt eine weitere Steigerung der Konzentration nicht zu einer erhöhten Rate der Abtötung der Bakterien [29]. Der Grund hierfür liegt im Wirkmechanismus der Beta-Laktame begründet: der Vorgang der Acylierung der PBP, der letztlich zu einer Lyse des Bakteriums führt, ist bereits bei niedrigen Konzentrationen gesättigt. Eine weitere Konzentrationserhöhung kann somit nicht mehr zu einem stärkeren Effekt führen, da bereits eine vollständige Acylierung vorliegt [30]. Anschaulich wird dies an time-kill-curves, wie es exemplarisch für Beta-Laktame in Abb. 3 für Ticarcillin zu sehen ist. Der relevante PK-PD-Index für diese Antibiotikagruppe, zu der auch Ertapenem gehört, ist also die Zeit, während der das Antibiotikum die MHK überschreitet: $T_{>MHK}$. Die Zielvorgaben für $T_{>MHK}$ variieren zwischen den Beta-Laktamen etwas. So wird für Cephalosporine 60-70% gefordert, für Penicilline 50% und für Carbapeneme 40 % [31]. Diese Unterschiede liegen wohl in der zwischen den Substanzgruppen variierenden Geschwindigkeit des Acylierungsprozesses, sowie dem verschieden (jedoch bei allen geringfügig) ausgeprägten postantibiotischen (PAE) und dem Sub-MHK-Effekt begründet [30].

Ganz anders verhält es sich mit Aminoglykosiden und Fluorochinolonen, die über einen großen Bereich eine konzentrationsabhängige Kill-Rate zeigen [32]. Die Zeit über der MHK ist hier weniger relevant, da all diese Substanzen durch ihren Wirkmechanismus in der Proteinbiosynthese einen guten PAE besitzen. Das bedeutet, dass der Konzentrationsspiegel nach einem möglichst hohen Spitzenspiegel auch längere Zeit unter die MHK fallen darf, relevant für das Erreichen des Effektes ist der Spitzenspiegel. In Abb. 3 ist an Tobramycin und Ciprofloxacin zu sehen, dass der Effekt über einen großen Konzentrationsbereich zunimmt. Die mit der Wirkung korrelierenden PK-PD Indices sind folglich C_{max}/MHK und AUC/MHK [30].

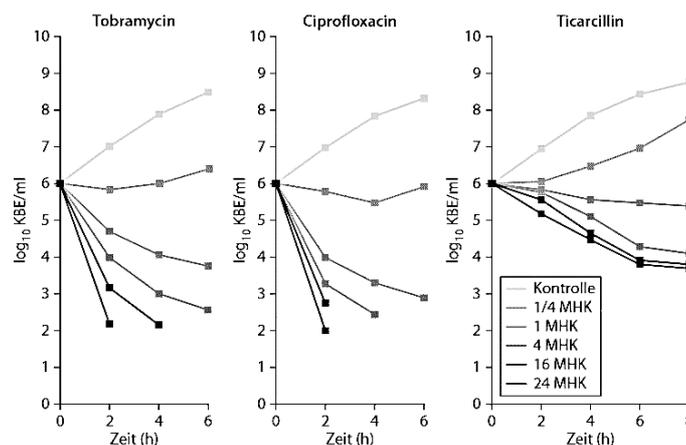


Abb. 3: "Time-kill-curves" für *Pseudomonas aeruginosa*. KBE koloniebildende Einheiten, MHK minimale Hemmkonzentration [8] (Beck 2014 aus Craig 1990).

Schon lange ist jedoch bekannt, dass nur die freie Konzentration eines Antibiotikums wirksam ist. Es ist also zwingend notwendig freie Konzentrationen bei der Betrachtung von PK/PD-Indices zu betrachten und die PK/PD-Indices entsprechend anzupassen [33]:

$T_{>MHK} \rightarrow fT_{>MHK}$ v.a. für Beta-Laktame

C_{max} bzw. $AUC/MHK \rightarrow fC_{max}$ bzw. $fAUC/MHK$ v.a. für Aminoglykoside und Fluorochinolone

1.3 Ertapenem

Ertapenem ist ein Beta-Laktam und gehört zur Klasse der Carbapeneme (Abb. 4). Von manchen Autoren wird es aufgrund seiner fehlenden Aktivität gegenüber Nicht-Fermentern als Carbapenem der Gruppe 1 bezeichnet [34].

1.3.1 Chemische Struktur und Struktur-Wirkungsbeziehung

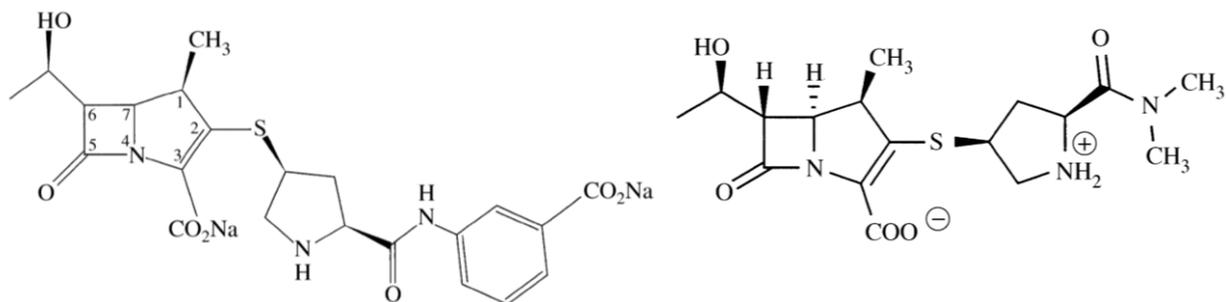


Abb. 4: Chemische Strukturen von Ertapenem (links) und Meropenem (rechts) [34,35]

Ertapenem trägt im Zentrum einen Beta-Laktam-Ring. Es ist strukturell eng mit Meropenem verwandt, trägt jedoch zusätzlich eine Benzoesäuregruppe, die die Lipophilität erhöht und möglicherweise für die hohe Plasmaeiweißbindung von Ertapenem verantwortlich ist [36].

Wie Meropenem und im Unterschied zu Imipenem, liegt an Position 1 eine Methylgruppe vor. Diese schützt vor der Metabolisierung durch die Dehydropeptidase I und ist der Grund, es nicht mit einem Dehydropeptidase I-Hemmstoff (Cilastatin) kombinieren zu müssen [36].

Im Unterschied zu Cephalosporinen und Penicillinen tragen Carbapeneme die Hydroxyethylgruppe in Juxtaposition zur Carbonylgruppe (Position 6) im Beta-Laktam-Ring. Dies führt zu einer Stabilität gegenüber Beta-Laktamasen. Hierdurch lässt sich die gute Aktivität von Carbapenemen gegen ESBL-Bildner und AmpC-Bildner erklären, da durch eine schnelle Acylierung der Beta-Laktamasen deren enzymatische Fähigkeiten deutlich verlangsamt werden [36].

1.3.2 Pharmakodynamik und Anwendungsbereiche

Ertapenem ist ein Breit-Spektrum-Antibiotikum mit guter Aktivität gegen grampositive, gramnegative und anaerobe Bakterien.

Es bindet hochaffin vor allem an PBP 2, aber auch an PBP 1a, 1b und 3. Hierdurch verhindert es die Synthese der Zellwand der Bakterien und verursacht den Tod der Bakterien. Die Bindung an PBP 2 wird als Vorteil von Carbapenemen gegenüber Cephalosporinen betrachtet, da sie einer Filamentierung der Bakterien und einer resultierenden LPS-Freisetzung durch gram-negative Bakterien entgegenwirkt [37].

Resistenzen

Ertapenem weist keine Aktivität gegen MRSA und Enterokokken, sowie eine verminderte Aktivität gegenüber Penicillin-resistenten Streptokokken auf. Dies liegt an einer geringen Affinität an die jeweiligen PBP.

Gegen intrazelluläre Erreger ist Ertapenem wie alle Beta-Laktame nicht wirksam.

Weiterhin wirkt Ertapenem nur sehr schwach gegen Non-Fermenter wie *Pseudomonas aeruginosa*. Der Grund hierfür ist nicht abschließend geklärt. Es wurde vermutet, dass die (durch die Benzoessäuregruppe) vermehrte negative Ladung im Vergleich zu Imipenem und Meropenem zu einer verminderten Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* führt, da letztere das für Kationen durchgängige OprD-Porin zum Eindringen nutzen [38], wobei in der Literatur auch Gegenstimmen zu dieser Theorie bekannt sind [39]. Non-Fermenter gelten als resistent gegenüber Ertapenem [35].

ESBL-bildende Bakterien, häufig Enterobakterien, bilden Resistenzen gegenüber Cephalosporinen und Penicillinen aus. Sie erhöhen die MHK für Ertapenem zwar diskret, dennoch bleibt eine gute Aktivität vorhanden [40]. Insgesamt ist Ertapenem, verglichen mit anderen Beta-Laktamen, stabil gegenüber diesem Resistenzmechanismus [38]. Eine Kombination der Beta-Laktamasen mit einem verstärkten Efflux oder einer geringeren Penetrationsrate führt jedoch in Ausnahmefällen zu Resistenzen [41].

Erworbene Carbapenemasen, wie z.B. IMP-1 und andere Beta-Metallo-Laktamasen, sind selten. Treten sie dennoch auf, insbesondere kombiniert mit einer veränderten Penetrationsmöglichkeit für Carbapeneme, verursachen sie eine Resistenz [40,42].

Indikationen

Das breite Wirkspektrum, welches Enterobakterien und Anaerobier einschließt, jedoch eine Lücke für Pseudomonaden hat, prädestiniert Ertapenem für komplizierte, ambulant erworbene (Misch-)Infektionen. Die Pseudomonaden-Lücke hat den Vorteil, dass der Selektionsdruck auf diese Spezies im Vergleich zu Meropenem oder Imipenem geringer ausfällt. Man erhofft sich somit eine seltener auftretende Resistenz gegenüber Carbapenemen. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2012 zeigte sich folgende Erkenntnis: Seit der Einführung von Ertapenem nahm die Resistenz von Pseudomonaden gegenüber Meropenem und Imipenem an einigen Krankenhäusern ab. Dies wurde vor allem auf den vermehrten Einsatz von Ertapenem anstatt Pseudomonas-wirksamer Carbapeneme zurückgeführt [43].

Somit ist es zur Behandlung folgender Infektionen, wenn diese durch sicher oder wahrscheinlich Ertapenem-empfindliche Bakterien verursacht sind und eine parenterale Therapie erfordern, zugelassen (Phase III Studien in Klammern):

- Intraabdominelle Infektionen [44,45]
- Ambulant erworbene Pneumonie [46,47]
- Akute gynäkologische Infektionen [48]
- Infektionen der Haut und Weichteile beim diabetischen Fuß [49]
- Infektionen der ableitenden Harnwege [50,51]

Diese Infektionen zählen zu den am häufigsten eine Sepsis verursachenden Infektionen in Deutschland [2].

1.3.3 Pharmakokinetik bei gesunden Probanden

Ertapenem hat eine hohe Proteinbindung von 92 - 95 % und eine lange Halbwertszeit von etwa 4 h [41]. Dies hat zur Folge, dass durch eine einmal tägliche, meist über 30 Minuten, zugeführte Infusion von 1 g bei Probanden ausreichende Plasmaspiegel erreicht werden können. Die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter für gesunde Probanden sind in Tab. 1 zusammengefasst. Ertapenem wird zu ca. 80 % mit dem Urin ausgeschieden, je etwa zur Hälfte unverändert und als geöffneter Beta-Laktam-Ring. Alle weiteren Metaboliten sind quantitativ nicht bedeutungsvoll. Weitere 10 % werden mit den Fäzes ausgeschieden, was eine biliäre oder intestinale Sekretion zeigt [52]. Wie bei anderen renal ausgeschiedenen Pharmaka auch, nimmt

die Clearance bei eingeschränkter Nierenfunktion ab. In Europa wird ab einer $CL_{Krea} < 30 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ von einer Ertapenem-Infusion gänzlich abgeraten [41].

Tab. 1: Pharmakokinetische Parameter von Ertapenem 1 g i.v. bei gesunden Probanden (nach [41]). Abk.: C_{max} Spitzenspiegel, CL Clearance, V_{ss} Verteilungsvolumen im steady state, $t_{1/2}$ Halbwertszeit, AUC Area under the curve

Parameter	Wert \pm SD
C_{max} (mg/l)	154,9 \pm 22,0
CL (l/h)	1,77 \pm 0,2
V_{ss} (l)	8,2 \pm 1,5
$t_{1/2}$ (h)	3,8
AUC (mg*h/l)	572,1 \pm 68,6

1.4 Studienlage: Pharmakokinetik von Ertapenem bei Intensivpatienten

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die Studienlage der Pharmakokinetik von Ertapenem bei Intensivpatienten gegeben werden (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Pharmakokinetik von Ertapenem bei Intensivpatienten nach intravenöser Infusion von 1 g über 30 min. Abk.: C_{max} Spitzenspiegel, CL Clearance, V_{ss} Verteilungsvolumen im steady state, $t_{1/2}$ Halbwertszeit, AUC Area under the curve, *Lit.* Literatur, n Probandenanzahl, *VAP* ventilator-associated pneumonia, *IAI* intraabdominelle Infektion, *SSSI* Skin and skin structure infections

Fokus	n	C_{max} mg/l	AUC mg*h/l	V_d L	CL l/h	$t_{1/2}$ h	Lit.
VAP	17	90,5 \pm 26,1	418 \pm 172	14,8 \pm 3,8	2,60 \pm 1,42	4,2 \pm 1,3	[53]
Schwere Sepsis	8	94,1 \pm 79,0	318 \pm 275	59,4 \pm 85,7	12,0 \pm 18,4	5,7 \pm 4,9	[54]
VAP und IAI	7	114 \pm 39	413 \pm 151	15 \pm 7	2,8 \pm 0,9	4,6 \pm 0,5	[55]
VAP und SSSI	6	115 \pm 28	-	16,1 \pm 4,5	3,8 \pm 1,6	3,9 \pm 1,2	[56]
Verbrennung	8	-	795 \pm 215	9,7 \pm 1,4	22,2 \pm 5,6	5,3 \pm 1,7	[57]

Die Variabilität der Werte für Clearance und Verteilungsvolumen war hoch. Das Verteilungsvolumen von 9,7 bis 59,4 l war durchweg gesteigert, verglichen mit dem Wert gesunder Probanden (8,2 l). Zeitgleich war jedoch auch die Clearance z.T. drastisch erhöht mit 2,6 bis 22,2 l/h verglichen mit gesunden Probanden (1,7 l/h). Dies resultierte in einer relativ stabilen durchschnittlichen Halbwertszeit von 3,9 bis 5,33 h, ähnlich der bei gesunden Probanden

(3,8 h). Innerhalb der Studien bestanden jedoch größere interindividuelle Abweichungen für die Halbwertszeit, was an der Standardabweichung von 4,9 bei Brink 2009 deutlich wurde [54].

C_{\max} fiel mit 90,5 bis 115 mg/l niedriger als bei gesunden Probanden (154,9 mg/l) aus, ebenso die AUC mit 317,7 bis 418,5 mg*h/l (572,1 mg*h/l bei gesunden Probanden). Lediglich die Studie von Dailly bildete hier eine Ausnahme und zeigte mit 794,9 mg*h/l erhöhte Werte für die AUC [57].

2 Hypothese und Zielsetzung

Zwei Studien an Intensivpatienten haben gezeigt, dass mit der Standarddosierung von 1 g Ertapenem einmal täglich die auf Basis der Fachinformation berechneten freien Konzentrationen im Serum nur für 25-30% des Dosierungszeitraumes über den definierten Grenzwerten lagen [53,54]. Daraus wurde auf eine ungenügende Dosierung von Ertapenem bei Intensivpatienten geschlossen. *In vitro*-Untersuchungen zur Proteinbindung mit Hilfe der Ultrafiltration haben jedoch gezeigt, dass die in der Fachinformation angegebenen Daten zur Proteinbindung von Ertapenem bei Intensivpatienten in Frage zu stellen sind [58].

Folgende Ziele wurden in dieser Arbeit verfolgt:

- Es sollten freie und totale Konzentrationen von Ertapenem in Plasma von Intensivpatienten bestimmt werden.
- Die Pharmakokinetik von Ertapenem bei Intensivpatienten sollte beschrieben werden. Hierbei sollte insbesondere der Aspekt der Proteinbindung betrachtet werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Allgemeine Laborgeräte

Aluminiumkühlblock HxBxT 30x250x100 mm mit 4x10 Bohrungen von HxD 28x12 mm, Mechanische Werkstatt, Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

Brand-Dispensette (0,1-0,5 ml, 1-5 ml, 10-50 ml, 20-100 ml), Fa. Brand, 97877 Wertheim

Centrifuge & Vortex, Fa. NeoLab Migge, 69123 Heidelberg

Eppendorf-Multipette, Fa. Eppendorf, 22339 Hamburg

Finnpipette T41640 4500 (5-50 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl), Fa. Thermo Fisher Scientific, 38116 Braunschweig

Heizblock Heatblock III, Fa. VWR, 64295 Darmstadt

Magnetrührer Combimag RCT, Fa. IKA, 7813 Staufen i. Breisgau

pH-Meter pH 526 und pH 720, Fa. WTW, 82362 Weilheim

Rainin Pipet-Lite XLS (20-200 µl, 100-1000 µl), Fa. Mettler-Toledo, 35396 Gießen

REAX 2 Mischer (Überkopfschüttler), Fa. Heidolph, 91126 Schwabach

REAX 2000 Mixer (Vortex), Fa. Heidolph, 91126 Schwabach

Stepmate Repeater (Multipette), Fa. Scilogex, 1275 Cromwell Avenue, C-6, Rocky Hill, CT 06067

StepMate Repeater Pipettor, Fa. Scilogex, 1275 Cromwell Avenue, C-6 Rocky Hill, CT 06067

Sunrise Absorbance Reader für Mikrotiterplatten, Fa. Tecan Austria, 5082 Grödig

Vakuum Pumpe ME 1C, Fa. Vacuubrand, 97877 Wertheim

Vakuum-Filtrationsgerät 1000 ml, Millipore, 65760 Eschborn

Waage Sartorius 1712, 30/160g, d=0.01/0.1 mg, Fa. Sartorius AG, 37075 Göttingen

Waage Sartorius BP 211D, 80/210g, d=0.01/0.1 mg, Fa. Sartorius AG, 37075 Göttingen

Waage Sartorius Extended, 3200g, d=0.01g, Fa. Sartorius AG, 37075 Göttingen

Wasseraufbereitungsanlage arium® basic, Fa. Sartorius Stedim, 37075 Göttingen

Zentrifuge Eppendorf 5417 R, Rotor F45-30-11, Fa. Eppendorf, 22339 Hamburg

Zentrifuge Heraeus Multifuge 1L-R mit Windkesselrotor 75002005, Fa. Kendro Laboratory Products, 37520 Osterode, jetzt Thermo Electron LED GmbH, 63505 Langenselbold

Zentrifuge Hettich Mikro 22, Trommelrotor 1161, Fa. Hettich, 78532 Tuttlingen

Zentrifuge Sorvall Super T21, Rotor SL-50T, Thermo Fisher Scientific, 63303 Dreieich

3.2 Verbrauchsmaterialien

Blutgas-Monovette® 2 ml, Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Conical Glass Insert (250µl, total volume 340µl), 31 x 6mm, Fa. BGB, 79618 Rheinfelden

Membranfilter TE 36, PTFE 0,45 µm Ø 47 mm, Fa. Schleicher & Schüll (jetzt GE Healthcare/Whatman), 37586 Dassel

Mikro-Schraubröhren 2 ml mit Verschluss, PP, Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Multipette ritips® 0,05 ml, Fa. Ritter GmbH, 86830 Schwabmünchen

Nanosep Omega 10K/30K: modifiziertes Polyethersulfon auf Polyethylen, Fa. VWR International, 64295 Darmstadt

Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl), Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Präzisions Dispenser tips (1,25 ml, 2,5 ml), Fa. Brand, 97877 Wertheim

Reagiergefäße mit anhängendem Deckel (1,5 ml, 2,2 ml), Fa. Sarstedt, 51588 Nümbrecht

Röhre 4 ml, 75 x 12 mm, Rundboden, PP, Fa. Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht

Röhre, Spitzboden (12 ml, 95 x 16 mm, 15 ml, 120 x 17 mm, 50 ml, 114 x 28 mm), Fa. Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht

Short Thread Screw Caps ND9 with Septa Silicone Rubber/PTFE, Fa. BGB, 79618 Rheinfelden

Short Thread Vial 32 x 11.6mm, 1.5ml (clear), wide opening, Fa. BGB, 79618 Rheinfelden

Verschlussstopfen für Probenröhren 4 und 12 ml, Fa. Kabe Labortechnik GmbH, 51588 Nümbrecht

3.3 Reagenzien und Chemikalien

1-Octanesulfonic acid sodium salt,, Fa. Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen

Acetonitril LiChrosolv, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Albumin from human serum, lyophilized powder, essentially fatty acid free, Fa. Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen

Dichlormethan zur Analyse, Fa. VWR, 64295 Darmstadt

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

L(+)-Ascorbinsäure zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Methanol LiChrosolv, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Natriumchlorid zur Analyse, Fa. VWR, 64295 Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Natriumhydroxid Plätzchen, Fa. VWR, 64295 Darmstadt

Natronlauge 1 N zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Ortho-Phosphorsäure 85 % zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Salzsäure 1 N zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Titriplex III zur Analyse, Fa. Merck, 64293 Darmstadt

Wasser gereinigt über Wasseraufbereitungsanlage Arium, Fa. Sartorius Stedim, 37075 Göttingen

3.4 Arzneimittel

Ertapenem Invanz® 1 g (ChB: 2053960, verw. 03/2014). Eine Durchstechflasche enthält 1,221 g Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, entsprechend 1,046 g Ertapenem-Natrium, entsprechend 1,00 g Ertapenem freie Säure (MG 475,516 g/mol) als weißes bis weiß-gebrochenes Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung. Als weitere Bestandteile sind Natriumhydrogencarbonat (E 500) sowie Natriumhydroxid (E 524) zur pH-Einstellung auf 7,5 enthalten [41], Fa. InfectoPharm, Heppenheim.

3.5 HPLC-Analyse

Ertapenem wurde auf zwei verschiedenen HPLC-Apparaturen quantifiziert, wobei alle nicht gesondert bezeichneten Geräte aus der Prominence Serie der Fa. Shimadzu, 47269 Duisburg stammen:

- **System A:** Degasser DGU-20A3, Pumpe LC 20AT, Autosampler SIL-20AC HT, Säulenofen CTO-10AS VT, UV-Detektor SPD-20A, Steuergerät CBM-20A, Auswertsystem LC-Solution.
- **System B:** Degasser DG-4000 (Fa. Recipe Chemicals, 80992 München), Pumpe LC 20AT, Autosampler SIL-20AC HT, Säulenofen ERC 125 (Fa. ERC, 85521 Riemerling), UV-Detektor SPD-10 AV, Steuergerät CBM-20A, Auswertsystem LC-Solution.

Ausgehend von einer publizierten HPLC-Methode wurde mit folgendem chromatographischen System gearbeitet [59]:

Als Standardsäule wurde die „reversed-phase“ Säule XBridge BEH 2.6 μm C18 50x3mm (Fa. Waters, 65760 Eschborn) benutzt, der als Vorsäule eine Nucleoshell 2.7 μm RP 18, 4x3 mm (Fa. Machery and Nagel GmbH & Co. KG, 52355 Düren) vorgeschaltet war. In Vorversuchen und als alternative Säule wurde darüber hinaus mit einer XBridge C18, 30x4.6 mm (Fa. Waters, 65760 Eschborn) gearbeitet.

Als mobile Phase (Eluent) wurde ein 100 mM ortho-Phosphorsäure-Acetonitril-Gemisch (1000:200, v/v), pH = 2,8 verwendet, das wie folgt hergestellt wurde: Zu 1 l Wasser wurden 6,80 ml 85% o-Phosphorsäure und 15-16 Plätzchen Natriumhydroxid hinzugefügt. Der pH-Wert wurde ggf. mit 10 M NaOH oder 85% H_3PO_4 auf pH = 2,6 korrigiert. Zu 800 ml Puffer wurden 160 ml Acetonitril zugegeben, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls auf pH = 2,8 nachjustiert. Der Eluent wurde im Vakuum durch einen Membranfilter (TE 36, PTFE 0,45 μm \varnothing 47 mm) filtriert zur Entgasung und um Partikel zu entfernen. Der Filter wurde vorab mit Methanol benetzt.

Die Retentionszeit betrug 2,5 Minuten bei einer Flussrate von 0,4 ml/min (XBridge C18 BEH 2.5 μm , 50x3 mm) und einer Temperatur von 40 °C. Der Druck betrug etwa 119 bar, als Injektionsvolumen wurde 1-5 μl gewählt.

Die photometrische UV-Detektion erfolgte standardmäßig bei Wellenlängen von $\lambda = 300$ nm und bei $\lambda = 260$ nm. Sowohl die Fläche als auch die Höhe des Detektorsignals wurden erfasst.

3.5.1 Bestimmung der totalen Konzentration von Ertapenem

3.5.1.1 Stammlösung

Es wurde eine Stammlösung von Ertapenem 5000 mg/l hergestellt. 122.1 mg Invanz® (InfectoPharm Arzneimittel und Consilium GmbH, 64646 Heppenheim), entsprechend 104,6 mg Ertapenem-Natrium-Salz, entsprechend 100.0 mg Ertapenem freie Säure wurden im Messkolben

ad 20 ml in Wasser gelöst und in Aliquots von 800 µl bei -70 °C eingefroren. Einmal aufgetaut wurden die Aliquots nicht erneut eingefroren.

3.5.1.2 Lösungen und Reagenzien

50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0:

690 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 6,0 titriert.

25 mM NaH_2PO_4 Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0:

345 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 6,0 titriert

10 mM NaH_2PO_4 , pH 6,0:

138 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) wurden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 6,0 titriert.

3.5.1.3 Standards und Kontrollen

Standard- und Kontrollproben wurden in Leerplasma gesunder, freiwilliger Probanden hergestellt. Das Blut wurde zuvor durch Venenpunktion mit Hilfe von Serum- oder Heparinmonovetten gewonnen und zehn Minuten bei 3000 g zentrifugiert, um das Plasma von den korpuskulären Bestandteilen abzutrennen. Das Plasma mehrerer Probanden wurde vermischt und in einen gemeinsamen Plasmapool überführt. Vorrätiges, bereits bei -70 °C eingefrorenes Plasma wurde nach dem Auftauen im Eiswasserbad oder im auf Eis gekühlten Aluminiumblock gemischt und anschließend weitere zehn Minuten bei 3000 g zentrifugiert, um evtl. nachgefälltes Fibrin abzutrennen.

Leerplasma, dotiert mit 50 mg/l Ertapenem, wurde als Standard mitgeführt. Als Kontrollen dienten Lösungen mit 100 mg/l (KA) und 10 mg/l (KB) in Plasma. Die hierfür benötigten Vorverdünnungen wurden separat aus der Ertapenem 5000 mg/l Stammlösung hergestellt und im Anschluss im Verhältnis 1:20 mit Leerplasma versetzt.

Für mehrere Assays wurden Aliquots von 230 µl (KA, KB) bzw. 350 µl (Std) abgefüllt und bei -70 °C gelagert. Bei jedem Assay wurden zur Kalibrierung alle 10-15 Proben ein Standard, mindestens aber drei Standards, sowie am Anfang und am Ende die Kontrollen in Doppelbestimmung mitanalysiert. Um Stabilitätsprobleme zu vermeiden wurden die

Stammlösung, Standards, Kontrollen und später auch die Patientenproben stets im Kühlblock oder Eiswasserbad bei ca. 4 °C gehandhabt.

Tab. 3: Verdünnungsschema zur Herstellung der Standards und Kontrollen. Abk.: *Konz.* Konzentration, *Res. Konz.* Resultierende Konzentration

Konz. (mg/l):	5000	5000	2000
Volumen (µl):	100	200	50
Wasser (µl):	400	300	450
Res. Konz. (mg/l):	1000	2000	200
1:20 mit Serum:	50	100	10
Abkürzung:	Std	KA	KB

3.5.1.4 Referenzstandard

Als Referenzstandard wurde durch Zugabe der Stammlösung Ertapenem 5000 mg/l in 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0 eine Verdünnung mit einer Konzentration von 25 mg/l hergestellt, in Ausnahmefällen von 20 mg/l. Der Referenzstandard wurde bei jedem Assay 3-4 mal injiziert und diente zur Berechnung der Wiederfindung.

Tab. 4: Verdünnungsschema zur Herstellung des Referenzstandards. Abk.: *Konz.* Konzentration, *Res. Konz.* Resultierende Konzentration

Konz. (mg/l):	5000	250	5000	1000
Volumen (µl):	50	100	100	25
Puffer (µl):	950	900	400	975
Res. Konz. (mg/l):	250	25	1000	20
Abkürzung:		SR 25		SR 20

3.5.1.5 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist in nachfolgendem Flusschema dargestellt:

1. 200 µl 25 mM NaH₂PO₄ in ein 1,5 ml Reagiergefäß vorlegen (Multipipette)
2. 100 µl Plasma zugeben ¹⁾
3. 500 µl Acetonitril zur Enteiweißung zugeben (Brand Dispensette) und 2-3 s vortexen
4. Inkubation für 15 min bei 4 °C zur Sicherstellung einer vollständigen Proteinfällung
5. Proben mischen (REAX 2000) und 2 min bei 12000 g zentrifugieren (Hettich Mikro 220R)

6. Überstand in 4 ml Röhren dekantieren, in denen 1,3 ml Dichlormethan vorliegen (Brand Dispensette)
7. 10 min mischen (REAX 2 Überkopfschüttler)
8. 10 min bei 3850 g (4500 rpm) zur Phasentrennung zentrifugieren (Heraeus Multifuge)
Anm.: An der Grenzschicht Dichlormethan/Wasser-MeCN setzt sich ein weißer Niederschlag ab. Wenn zu kurz oder bei zu geringer g-Zahl zentrifugiert wird, ist die überstehende Wasserphase trüb.
9. 75 µl der oberen, wässrigen Phase in Minivials abfüllen und 1-5 µl in die HPLC injizieren
Anm.: Beim Abpipettieren ist besondere Vorsicht geboten, dass die Pipettenspitze nicht in die Dichlormethanphase gerät; in einem solchen Fall Probe nochmals zentrifugieren.

¹⁾ 1xLeerplasma, 3xStd, 2xKA, 2xKB, je 1xPatientenproben

Injektionsprotokoll: SR - LP - Std - Kontrollen - Proben - SR - Std - Proben - SR - Std - Kontrollen

Zwar sind die Lösungen über Nacht bei Raumtemperatur stabil, die Proben wurden aber dennoch im Autosampler (6 °C) oder im Kühlschrank gelagert, weil durch die durchstochenen Septen Flüssigkeit verdunsten kann (ca. 5 % bei Raumtemperatur über Nacht bei Verwendung von Teflonblättchen).

Die Quantifizierung erfolgte in der Routine über eine Einpunktkalibrierung bei mittlerer Konzentration. Hierzu wurden bei jedem analytischen Lauf drei Standards in Plasma mit mittlerer Konzentration mitgeführt. Die Standards wurden analog obiger Beschreibung zur Bestimmung der totalen Konzentration aufgearbeitet. Zusätzlich wurden jeweils zwei Kontrollen mit hoher bzw. niedriger Konzentration mit aufgearbeitet und analysiert, um im Sinne einer Inprozesskontrolle die Präzision und Richtigkeit zu überprüfen.

3.5.2 Bestimmung der freien Konzentration von Ertapenem

Die freie Konzentration von Ertapenem im Serum wurde mit Hilfe der Ultrafiltration bestimmt [58].

3.5.2.1 Lösungen und Reagenzien

3 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,5 (Puffer): 6,85 g $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ (MG 228,23) wurden in 9 ml Wasser (15 ml skaliertes Röhrchen) gelöst, mit 85% H_3PO_4 auf pH 7,5 titriert und mit Wasser ad 10 ml aufgefüllt.

3.5.2.2 Standards und Kontrollen

Zur Kalibrierung wurden mindestens drei unabhängig aus der Stammlösung hergestellte Verdünnungen von Ertapenem mittlerer Konzentration (20 oder 25 mg/l) in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,0, verwendet. Zusätzlich wurde je eine Kontrollprobe (KA, KB) mit hoher (100 mg/l) und niedriger Konzentration (10 mg/l) in Serum oder Plasma als Inprozesskontrolle mitaufgearbeitet und analysiert.

3.5.2.3 Probenvorbereitung

Vor der Ultrafiltration musste die Zentrifuge (Eppendorf 5417R) auf die Solltemperatur von 37 °C gebracht werden. Dazu wurde die Zentrifuge mit zwei je mit 1 ml Glycerin gefüllten 2 ml fassenden Reagiergefäßen für ca. 45 min bei 37 °C/1000 g betrieben. Sobald die Temperuranzeige konstant 37 °C erreichte, wurde die Zentrifugation gestoppt und die Rotortemperatur über das Messen der Temperatur des Glycerins kontrolliert. Das Thermometer war in einem Heizblock auf 37 °C vorgewärmt worden. Alternativ wurde die Solltemperatur auch durch Zentrifugation für 10 min bei hoher g-Zahl (10000 g) und anschließend bei 1000 g eingestellt. Dabei konnten aber stärkere Temperaturschwankungen nach dem Absenken der g-Zahl beobachtet werden.

Das Plasma wurde aufgetaut und 20 min bei 3000 g/4 °C (4000 rpm bei Heraeus Megafuge) vorzentrifugiert, um evtl. gebildetes Fibrin abzutrennen.

Die weitere Probenvorbereitung ist in nachfolgendem Flusschema dargestellt:

1. 10 µl 3 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,5, an den Rand des Oberteils des Nanosep Filters pipettieren
2. 300 µl Plasma zugeben und durch mehrfaches Aufsaugen/Ausstößen mischen
3. 10 min temperieren bei 37 °C/100 g (Eppendorf 5417R)
4. 20 min zentrifugieren bei 37 °C/1000 g (Eppendorf 5417R)
5. Filtrat quantitativ in Minivials überführen und 2 µl in die HPLC injizieren
Anm.: Die Filtratmenge wurde beim Abpipettieren auf 5 µl genau abgeschätzt und sollte mindestens 60 µl betragen. In der Regel waren es 70-90 µl.

Zur Kontrolle der pH-Werte der Proben nach der Zentrifugation wurden 2-4 Überstände zusammenpipettiert und der pH-Wert gemessen.

3.5.3 Bindung von Ertapenem an Plasmaproteine und Albumin

3.5.3.1 Lösungen und Reagenzien

Albumnorm 20% (ChB. E322B666A, Octapharma, 40764 Langenfeld)

Humanalbumin (HSA): Albumin from human serum, essentially fatty acid free, lyophilized powder (A1887, Fa. Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen)

Poolplasma von sechs freiwilligen, gesunden Probanden mit einem Albumingehalt von 38,2 g/l

Isotonischer Phosphatpuffer (IPP): 7,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,90 g KH_2PO_4 , 4,11 g NaCl wurden in 500 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Es resultierte ein pH = 7,26, dieser wurde mit 10 M NaOH auf pH = 7,4 eingestellt (Herstellung nach [60])

Vorverdünnung HSA 20 %: 340 mg HSA-Pulver wurden in 1,7 ml 0.1 M IPP gelöst

Vorverdünnung HSA 3,8 %: 83,6 mg HSA-Pulver wurden in 2,2 ml IPP gelöst

3.5.3.2 Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung von Ertapenem

Die Konzentrationsabhängigkeit der Proteinbindung von Ertapenem und gleichzeitig die Linearität der freien Konzentration wurden im Serum eines gesunden Probanden bestimmt. Es wurden zwei separate Assays im Konzentrationsbereich von 1,6 - 200 mg/l durchgeführt, wobei F200, F120 und F60 nur einmal, alle anderen Konzentrationen doppelt bestimmt wurden. Die Verdünnung der Proben erfolgte in Plasma entsprechend Tab. 5.

Tab. 5: Verdünnungsschema zur Herstellung der mit Ertapenem dotierten Plasmaproben. Abk.: VV Vorverdünnung, Vol. Volumen, Konz. Konzentration, Abk. Abkürzung

VV (mg/l)	4000	4000	4000	4000	4000	3200	320	320	320
Vol.(μl)		200	60	100	50	50	100	50	50
Plasma		50	40	150	200	450	100	150	450
Konz. (mg/l)	4000	3200	2400	1600	800	320	160	80	32
1:20 mit Plasma	200	160	120	80	40	16	8	4	1,6
Abk.	F200	F160	F120	F80	F40	F16	F8	F4	F1,6

3.5.3.3 Bindung an HSA – Human serum albumin

Zuerst wurde je eine Verdünnungsreihe in IPP für Ertapenem aus einer Stammlösung mit 5000 mg/l, siehe Tab. 6, und eine Verdünnungsreihe für HSA in IPP aus einer 20 % HSA-Lösung hergestellt, siehe Tab. 7.

Tab. 6: Verdünnungsreihe von Ertapenem für die Bindung an HSA.

Abk.: C_{ERT} Konzentration Ertapenem, *Vol.* Volumen, C_{res} resultierende Konzentration, *HSA* Humanes Serum Albumin

C_{ERT} ($\mu\text{g/ml}$)	5000	5000	600	200	60
<i>Vol.</i> (μl)	120	40	100	100	100
Puffer	880	960	900	900	900
C_{res} ($\mu\text{g/ml}$)	600	200	60	20	6

Tab. 7: Verdünnungsreihe von HSA 20% für die Bindung von Ertapenem an HSA.

Abk.: C_{HSA} Konzentration Humanes Serum Albumin, *Vol.* Volumen, C_{res} resultierende Konzentration

C_{HSA} (mg/ml)	200	200	200	200	60
<i>Vol.</i> (μl)		400	270	80	80
Puffer (μl)		400	630	720	720
C_{res} (mg/ml)	200	100	60	20	6

Anschließend wurde jede der Albuminlösungen mit jeder der Ertapenem-Vorverdünnungen im Verhältnis 1:1 (150 + 150 μl) versetzt. Es resultierten folgende Konzentrationen für HSA: 0 %, 0,3 %, 1,0 %, 3,0 %, 5,0 %, 10,0 %. Die Endkonzentrationen für Ertapenem betragen: 3 mg/l, 10 mg/l, 30 mg/l, 100 mg/l, 300 mg/l. Die Proben wurden analog zur Verarbeitung der Proben für die Bindung an Alburnorm® behandelt. Der Versuch wurde auf Grund von unstimmgigen Ergebnissen für die Konzentrationen HSA 0,3 % und 1 % wiederholt.

3.5.3.4 Bindung an Plasma von Probanden

Die freie Konzentration von Ertapenem wurde in 100 % Poolplasma und anschließend in verdünntem Poolplasma mit einem Plasmagehalt von 75 %, 50 % und 25 % bestimmt. Das Plasma wurde hierzu

- 1) mit IPP entsprechend Tab. 8 verdünnt, d.h. hierbei wurden das gesamte Plasma und somit alle Proteine verdünnt.
- 2) mit 3,82 % HSA-Lösung in IPP entsprechend Tab. 8 verdünnt, um den Albumingehalt des Plasmas konstant bei 38,2 g/l zu halten, alle anderen Komponenten jedoch zu verdünnen.

Tab. 8: Verdünnung von Poolplasma mit IPP/HSA. Abk.: *IPP* Isotonischer Phosphatpuffer, *HSA* Humanes Serum Albumin

Plasma (μl)	2000	1500	1000	500
IPP/HSA (μl)	0	500	1000	1500
Serie	A (100 %)	B (75 %)	C (50 %)	D (25 %)

Anschließend wurde das verdünnte Poolplasma mit Vorverdünnungen von Ertapenem versetzt, siehe Tab. 9.

Tab. 9: Vorverdünnungen von Ertapenem und Verdünnung mit Plasma-Albumin („PL-ALB“)/ Plasma-Puffer-Lösungen („PL-Puffer“). Abk.: C_{ERT} Konzentration Ertapenem, *Vol.* Volumen, H_2O Wasser, ERT_{res} resultierende Konzentration Ertapenem

C_{ERT} ($\mu\text{g/ml}$)	5000	5000	5000	2000	600
Vol. (μl)		200	120	100	100
H_2O (μl)		300	880	900	900
ERT_{res} (mg/l)	5000	2000	600	200	360
Vol. (μl)	20	18	18	18	18
„PL-ALB“ / „PL-Puffer“ (μl)	313	342	342	342	342
ERT_{res} (mg/l)	300	100	30	10	3

Es wurden je 300 μl entsprechend der Probenvorbereitung zur Messung freier Konzentrationen ultrafiltriert und anschließend quantifiziert. Zur Wahrung eines einheitlichen pH-Wertes von etwa 7,4 wurde 3 M KHPO_4 -Puffer (pH=7,5) zugegeben. Serie A wurden 12 μl , Serie B 7 μl , Serie C 5 μl und Serie D kein Puffer zugegeben.

3.6 Bestimmung klinisch-chemischer Parameter

Die klinisch-chemischen Parameter wurden während des Routineprozesses durch das Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Berlin (Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, 13353 Berlin) bestimmt. Kreatinin, Albumin und die Gesamteiweiß-Konzentration wurden photometrisch, alpha1-saures Glykoprotein und Cystatin C wurden nephelometrisch gemessen. Die Anzahl an Leukozyten wurde im Rahmen eines Blutbildes durch Impedanzmessung, Procalcitonin durch einen Elektro-Chemilumineszenz-Immuno-Assay und CRP durch Immunturbidimetrie bestimmt. Albumin, Gesamteiweiß, Kreatinin und Cystatin C wurden ein zweites Mal in anonymer Form durch die Abteilung der klinischen Chemie des Universitätsklinikum Regensburg analysiert. Zur Einschätzung der Nierenfunktion wurde die GFR anhand der Kreatinin-Clearance nach Cockcroft-Gault und der Cystatin-C Clearance nach Hoek kalkuliert [61,62].

3.7 Untersuchungen an Patienten

3.7.1 Studiendesign

Es handelte sich um eine prospektive Beobachtungsstudie als Teil der multizentrischen pharmakokinetischen Punkt-Prävalenz-Studie „zur Qualitätssicherung antiinfektiver Therapie auf

Intensivstationen (QSIInf)“. Sie hat zum Ziel, Fälle antiinfektiver Therapie auf Intensivstationen vollständig zu dokumentieren und zu beurteilen. Vorrangig soll hierbei betrachtet werden ob ausreichende Konzentrationen der zur antiinfektiven Therapie eingesetzten Medikamente erreicht werden. Daneben gilt es erreichte PK/PD-Indices mit dem klinischen Resultat zu vergleichen und Aussagen über die Populationspharmakokinetik einzelner Substanzen treffen zu können [63]. Die zuständige Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin – Campus Benjamin Franklin (Antragsnummer: EA4/028/13) gab ihre Zustimmung zur weiteren anonymen Untersuchung routinemäßig erworbener Blutproben, z.B. Blutgasanalysen. Die Patienten oder deren gesetzlichen Vertreter stimmten der Verwendung der Blutproben und ihrer Daten mittels eines medizinischen Behandlungsvertrages zu. Vor dem Prozess der Anonymisierung der Patienten wurden demographische und klinisch-chemische Parameter dokumentiert.

3.7.2 Patientenselektion

Zur Studie waren alle Patienten zugelassen, die die Ein-/Ausschlusskriterien erfüllten. Sämtliche in die Studie einbezogenen Patienten waren während des Zeitraums von April bis Oktober 2013 für einen nicht näher definierten Zeitraum stationär auf der interdisziplinären Intensivstation (Station 44i) der Klinik für Anästhesie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin.

Die Auswahl der Patienten erfolgte über periodische Durchsicht der Belegungsliste. Die Intensivstation ist als Maximalversorger einzustufen (*tertiary care*). Der Focus der Intensivstation liegt auf der postoperativen Versorgung von großen allgemein- oder neurochirurgischen Eingriffen. Ungeachtet der Spezialisierung werden jedoch alle Arten von Krankheiten versorgt, die einer intensivmedizinischen Behandlung bedürfen.

Einschlusskriterien

- Alter \geq 18 Jahre
- stationärer Aufenthalt auf Intensivstation
- Einwilligung mittels Behandlungsvertrag
- Behandlung mit Ertapenem
- brauchbarer intravenöser/ intraarterieller Zugang

Ausschlusskriterien

- Nierenersatztherapie

- fehlende Möglichkeit eine ausreichende Anzahl an Blutproben zu erhalten (z.B. aufgrund bevorstehender Verlegung oder Tod des Patienten)
- Alter < 18 Jahre
- Schwangerschaft
- Fehlende Einwilligung

3.7.3 Medikation

Die Entscheidung zur Therapie mit Ertapenem aufgrund einer Infektion wurde vom zuständigen behandelnden Stationsarzt getroffen. Allen aufgeführten Patienten wurde Ertapenem als Kurzinfusion verabreicht, wobei angenommen wurde, dass die Infusionsdauer 30 Minuten betrug. Die Dosierung betrug 1 g einmal täglich. Beginn, Dauer und Dosis der Infusion wurden dem Patientendatenmanagementsystem entnommen und auf dem CRF (siehe unten) notiert. Nachfolgende pharmakokinetische Berechnungen beruhen auf den genannten Angaben zu Anwendung und Dosierung von Ertapenem.

3.7.4 Datensammlung und -management

Die erhobenen Daten wurden aus Patientenakten entnommen. Alle Daten wurden manuell in die Dokumentationsbögen (Case report form = CRF) übertragen. Nach Beendigung der Datenerhebung wurde eine Zusammenstellung in anonymisierter, tabellarischer und für die weitere Auswertung geeigneter strukturierter Form angefertigt. Bei jeder Übertragung von Daten wurden diese kontrollgelesen und auf Vollständigkeit und Richtigkeit überprüft. Eine Erhebung der Daten erfolgte pro Patient maximal über einen Zeitraum von 28 Tagen oder bis zu dessen Entlassung von der Intensivstation. Nach dem vollständigen Ausfüllen der CRFs wurden diese anonymisiert, d.h. das erste Blatt, das Hinweise auf die Identität der Patienten enthielt, wurde entfernt und verworfen. Danach waren die Patienten nur noch durch Nummern zu unterscheiden, eine Zurückverfolgung auf die Quelldaten war aber nicht mehr möglich. Alle Daten sollten möglichst vollständig erhoben werden. Die erhobenen Daten beinhalteten u.a.:

Demographie

- Alter
- Geschlecht
- Größe
- Gewicht

Klinische Daten

- Datum und Diagnose bei Krankenhausaufnahme
- Datum und Diagnose bei Aufnahme auf Intensivstation
- Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation
- Scores zur Beurteilung der Krankheitsschwere bei Aufnahme auf Intensivstation (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II [APACHE II], Simplified Acute Physiology Score II [SAPS II]) und am Tag der Probennahme (Sequential Organ Failure Assessment [SOFA]) [64–66]
- Klinischer Erfolg der Behandlung
- Therapielimitierung
- Retrospektive Validität der Diagnose
- Entlassungsstatus (Verlegung auf andere Station oder in anderes Krankenhaus, Entlassung nach Hause oder in eine Pflegeeinrichtung, Weiterbehandlung über den 28. Tag hinaus, Versterben)
- Fremdkörper
- Immunsuppression
- Nebenerkrankungen

Organfunktionen

- Kreatinin-Clearance nach Cockcroft-Gault [62]
- GFR berechnet nach Hoek über Cystatin C im Serum [61]
- Vorhandensein einer Nierenersatztherapie

Infektionsdaten

- Infektionsfokus
- Diagnosekriterien und Diagnosezeitpunkt der Infektion
- Infektionsschwere (Einteilung u.a. in: Infektion, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock nach [67])
- Erregernachweis
- Minimale Hemmkonzentration (MHK) gemäß des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [68]
- Behandlungserfolg der Infektion

Medikation

- Dosierung des Antibiotikums
- Beginn und Ende der Verabreichung
- antibiotische Gesamttherapiedauer (ggf. antibiotische Vortherapie)
- Leitlinien-treue der Behandlung
- Komedikation

Die vorliegende Arbeit umfasst die Auswertung pharmakokinetischer Daten. Die klinisch-mikrobiologische Auswertung übersteigt den Rahmen dieser Arbeit. Der vollständige CRF-Bogen befindet sich im Anhang.

3.7.5 Entnahme, Handhabung und Lagerung der Blutproben

Bei der Blutprobennahme wurde eine „sparse-sampling“-Strategie angewendet. Das heißt, die Gewinnung der Blutproben erfolgte aus Restblut, das im Rahmen von Blutentnahmen zur Routinediagnostik entfiel. Hauptsächlich handelte es sich dabei um arterielles Blut von Blutgasbestimmungen. Die Entnahmezeiten spiegeln diesen Umstand wieder. Soweit möglich sollten mindestens drei Blutproben aus ein oder mindestens vier Blutproben aus zwei Dosierungsintervallen von Ertapenem ausgewählt werden, die nach Möglichkeit über das Dosierungsintervall gleich verteilt sein und die folgenden Zeiträume abbilden sollten: 0.5-2 h nach Infusionsende (Spitzenkonzentrationen), 10-14 h (Mitte des Dosierungsintervalls) und 22-24 h (Talspiegel). Das Zeitintervall bis 30 min nach Ende der Infusion wurde vermieden. Bei allen Proben wurde die genaue Uhrzeit der Entnahme im CRF notiert.

Die Patientenproben wurden unmittelbar nach Entnahme zehn Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das dadurch von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes abgetrennte Plasma wurde anschließend bei -70 °C gelagert und zur weiteren Analyse auf Trockeneis zum Labor (Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg) transportiert.

3.7.6 Pharmakokinetische Berechnungen

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter wurde Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight/Certara, St Louis, MO, USA) verwendet. Für die Berechnungen von Clearance und Verteilungsvolumen erwies sich ein Ein-Kompartiment-Modell mit Invasionskinetik nullter Ordnung und einer Eliminationskinetik erster Ordnung (Wichtung $1/y^2$) als günstig.

Das Verteilungsvolumen wurde gemäß $V_d = D/C_0$ berechnet. Über eine ermittelte Eliminationskonstante k_e ($k_e = \ln(2) / t_{1/2}$) konnte man die Clearance bestimmen: $CL = V_d \times k_e$. Die AUC berechnet sich als Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve. Aus kalkulierter Clearance und Verteilungsvolumen wurde ein vollständiger zeitlicher Verlauf der Plasmakonzentrationen von Ertapenem für jeden einzelnen Patienten bis zum dritten Behandlungstag bei einmal täglicher intravenöser Infusion von 1 g Ertapenem über 30 min simuliert. Dies wurde unter der Prämisse eines Gleichgewichtes (steady-state) durchgeführt. Aus den Simulationen wurden C_{max} , C_{24h} und die Eliminationshalbwertszeit entnommen. Alle Werte wurden separat für freie und totale Konzentrationen kalkuliert.

Als PK/PD-Index der Wahl gilt für Beta-Laktame und somit auch für Ertapenem die Zeit über der minimalen Hemmkonzentration (MHK) eines Bakteriums. Da keine MHKs gemessen wurden, verwendete man Grenzwerte aus der Literatur. Als mögliche Pathogene wurden Penicillin-resistenter *S. pneumoniae* (2 mg/l) und Methicillin-sensibler *S. aureus* (0,25 mg/l) mit den in Klammern angegebenen minimalen Hemmkonzentrationen ausgewählt [35]. Als Zielkonzentration diente eine Hemmkonzentration bei der bei mindestens 90 % der getesteten Stämme kein Wachstum beobachtet werden konnte (MHK₉₀). Man berechnete ausgehend von den Simulationen die Zeit, während der die freie Konzentration von Ertapenem oberhalb der Zielwerte lag ($fT > 2$ mg/l, $fT > 0,25$ mg/l) als entscheidenden PK/PD-Index.

Die Bewertung der Proteinbindungscharakteristik von Ertapenem erfolgte mittels Michaelis-Menten-Kinetik. Die molaren Konzentrationen wurden ausgehend von Molekulargewichten von 475,516 g/mol für Ertapenem und 66,000 g/mol für Albumin berechnet.

3.7.7 Statistische Auswertung

GraphPad Prism Version 6 für MacOSX (GraphPad Software, La Jolla, CA) wurde zur Berechnung deskriptiver Statistiken und von Michaelis-Menten-Kinetiken benutzt. Mittelwerte \pm Standardabweichungen bzw. der Median mit Interquartilenabstand wurden, sofern angemessen, mitangegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Kenndaten der HPLC-Methode

Für die Bestimmung von Ertapenem in den Plasmaproben der Intensivpatienten wurde eine für Plasma (LiHeparin) und Serum gesunder Probanden validierte HPLC-Methode verwendet [69]. Die Charakteristika der Methode sind: Linearität von 0,8 - 80 mg/l nachgewiesen ($r > 0,999$), Intra- und Inter-Assay-Präzision und Richtigkeit besser als 5%.

4.1.1 Selektivität

Die HPLC-Methode zeigte sich als hinreichend selektiv, um Ertapenem im Plasma der Intensivpatienten zu analysieren. Gegenüber dem Plasma gesunder Probanden wurden in den Chromatogrammen zwar meist zusätzliche Peaks gefunden, Ertapenem eluierte aber als gut abgetrennter Peak (Abb. 5).

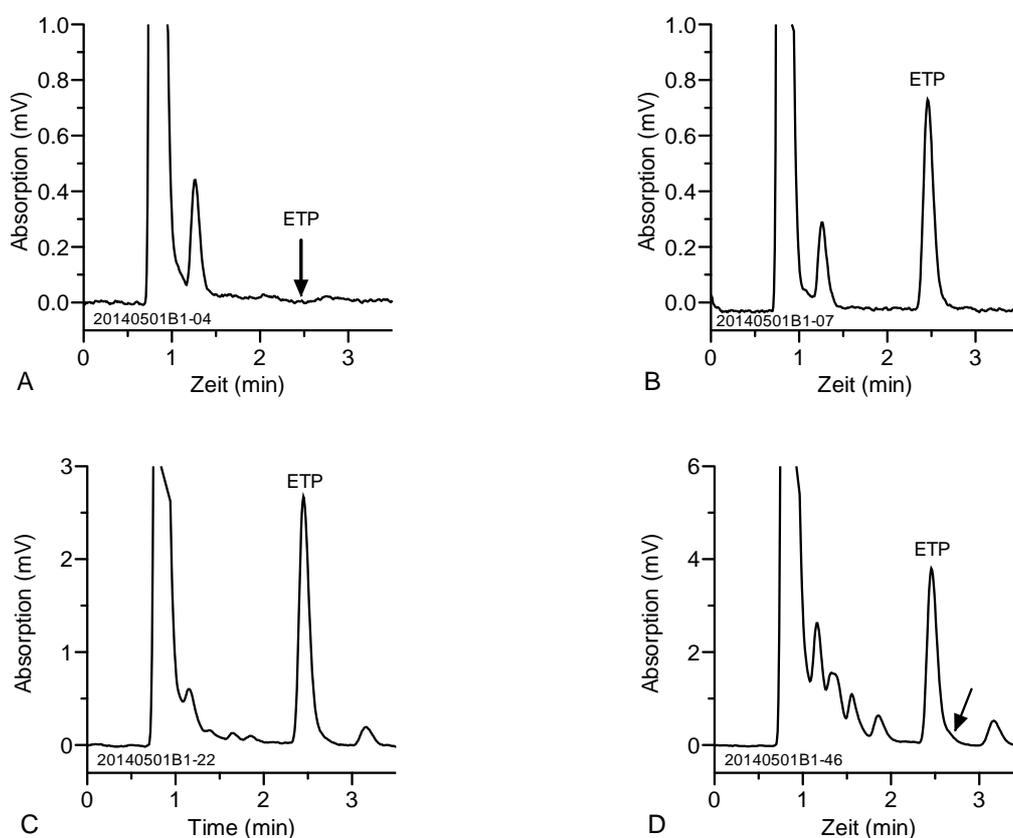


Abb. 5: Chromatogramme von (A) Leerplasma, (B) Plasma dotiert mit 7,14 mg/l Ertapenem sowie (C, D) der Plasmaprobe eines Patienten unter der Therapie mit 1 g Ertapenem 1 g einmal täglich. C, totale Konzentration 24,8 mg/l. D, freie Konzentration 10,6 mg/l. Man beachte den unterschiedlichen Maßstab der y-Achse bei A/B und C/D. Der Pfeil (bei D) deutet auf eine geringfügige Interferenz durch einen nur teilweise abgetrennten Peak hin. Chromatographisches Trennsystem: Säule: xBridge C18 BEH, 2,5 μ , 50x3 mm. Eluent: 0,1 M H_3PO_4 /Acetonitril 600:90, pH 3,11. Fluss: 0,4 ml/min. Temperatur 40 °C. Detektion bei 300 nm.

Die Auswertung der Peaks erfolgte in der Routine sowohl über die Flächen als auch über die Höhe; übereinstimmende Werte wurden als "frei von Interferenzen" gedeutet. Eine Kontrollanalyse erfolgte, wenn die Auswertung über die Fläche höhere Werte ergab im Vergleich zur Auswertung über die Höhe. So ergab die Auswertung über die Fläche der in Abb. 5 D gezeigten Plasmaprobe eine um 8% höhere Konzentration als die Auswertung über die Peakhöhe, weil hier (und in einigen anderen Fällen) der Ertapenem-Peak die Andeutung einer Schulter zeigte (Pfeil in Abb. 5 D). Die Wiederholungsanalyse dieser Probe mit einem geänderten Eluenten (50 mM Natriumphosphat, pH 6,0/Acetonitril 1000:60 (v/v)) mit auf Grund des höheren pH-Werts geänderter Selektivität zeigte eine ganz reguläre Peakform, übereinstimmende Werte bei Auswertung über die Peakflächen und Peakhöhen, und der über die Peakhöhe bestimmte Wert der ersten Analyse wurde bestätigt. Generell kann man feststellen, dass die Auswertung nach der Peakhöhenmethode bei Interferenz durch teilaufgelöste Peaks die richtigeren Werte liefert, weshalb in der Routine die Peakhöhenmethode zur Auswertung genommen wurde.

4.1.2 Präzision und Richtigkeit

Zur Qualitätssicherung wurden bei der Analyse der Patientenproben Kontrollen in Probandenplasma mitgeführt, die mit Ertapenem 100 und 10 mg/l dotiert waren. Die dabei erhaltenen Kenndaten bestätigten die Brauchbarkeit der Methode für die Analyse von Plasmaproben von Intensivpatienten. Die Intra-Assay-Präzision (MW \pm SD) betrug bei Auswertung über die Fläche/Höhe 1,8/2,7 % (100 mg/l) und 2,2/1,7 % (10 mg/l), die Inter-Assay-Präzision 3,1/2,8 % (100 mg/l) und 2,0/2,3 % (10 mg/l). Die Richtigkeit, ausgedrückt als Abweichung des Mittelwerts der gemessenen Konzentrationen von der Soll-Konzentration, war -4,5/-4,2 % (100 mg/l) und -1,4/-0,2 % (10 mg/l). Bei der Analyse der freien Konzentrationen wurden die Kontrollen nur als Einfachbestimmung mitgeführt, da die Intra-Assay-Präzision in Voruntersuchungen \leq 1 % war, d.h. in der Größenordnung des Pipettenfehlers. Die Inter-Assay-Präzision war vergleichbar den Werten bei Bestimmung der totalen Konzentration (3,1/2,8 % bei 100 mg/l, 2,0/2,3 % bei 10 mg/l). Die Richtigkeit kann nicht angegeben werden, da die Proteinbindung zwischen verschiedenen Plasmaproben variieren kann und der Sollwert deshalb nicht bekannt ist. Im Laufe der Analysen wurden zwei verschiedene Plasmapools (Albuminkonzentration 44 und 42 g/l) verwendet. Aus der geringen Streuung der Ergebnisse kann man schließen, dass die Methode zur Bestimmung der freien Konzentrationen von Ertapenem sehr präzise ist und dass geringe Änderungen in der Albuminkonzentration keine Auswirkung auf die Proteinbindung von Ertapenem haben.

Einige Plasmaproben wurden ein zweites Mal analysiert (Analyse von "incurred samples" gemäß den Richtlinien der FDA und EMA). Die dabei erhaltenen Werte betragen $99,0 \pm 3,7 \%$ ($n = 9$, Bereich 1,80-70,5 mg/l) der Werte der ersten Analyse für die totale Konzentration bzw. $105,5 \pm 4,2 \%$ ($n = 12$, Bereich 0,549 – 36,7 mg/l) für die freie Konzentration.

4.1.3 Patienten

Insgesamt wurden sechs Patienten (5 M/1 W) in die Studie aufgenommen (Tab. 10). Das Alter betrug 47 bis 85 Jahre (Median 72,5 Jahre), das Körpergewicht 55 bis 90 kg (Median 77,5 kg), die Körpergröße zwischen 160 und 185 cm (Median 175,5 cm). Der APACHE II Score bei Aufnahme lag zwischen 14 und 27 (Median 18,5). Bei keinem der Patienten traten schwerwiegende Nebenwirkungen auf, die in Zusammenhang mit der Gabe von Ertapenem gebracht werden konnten. Die Kriterien der Sepsis erfüllten fünf der sechs Patienten, von denen zwei Patienten eine schwere Sepsis und ein Patient einen septischen Schock erlitten. Als Pathogene konnten zweimal ein *Methicillin-sensibler Staphylokokkus aureus*-Stamm identifiziert werden und je einmal *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* mit ESBL und *Serratia marcescens*. Einmal blieb die Suche nach dem Erreger erfolglos. Unter einer Pneumonie (4 HAP, 1 VAP) litten fünf der sechs Patienten, ein Patient unter einem Harnwegsinfekt. Grund für die Aufnahme auf die Intensivstation waren je zweimal respiratorische Insuffizienz und Polytrauma und je einmal intrazerebrale Blutungen und hämorrhagischer Schock.

Tab. 10: Demographische und klinische Daten der sechs mit Ertapenem behandelten Intensivpatienten. Abk.: ID Identifikationsnummer, Ind. Indikation, Sex Geschlecht, APACHE II Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II- Score, respir. respiratorisch, hämor. hämorrhagisch, HAP hospital-acquired pneumonia, VAP ventilator-associated pneumonia, MSSA Methicillin sensibler *S. aureus*, M männlich, W weiblich, Gew. Gewicht, Med. Median, Min. Minimum, Max. Maximum

ID	Aufnahmegrund	Ind.	Erreger	Sex	Alter (a)	Gew. (kg)	Größe (cm)	APACHE II
1	respir. Insuffizienz	HAP	MSSA	M	68	90	183	27
2	Polytrauma	VAP	<i>K. pneumoniae</i>	M	85	70	175	16
3	Hämor. Schock	HAP	MSSA	M	77	75	175	22
4	Polytrauma	HAP	<i>S. marcescens</i>	M	66	80	185	21
5	respir. Insuffizienz	HAP	nicht bestimmt	M	78	87	176	16
6	intrazerebrale Blutung	HWI	<i>E. coli</i>	W	47	55	160	14
Med.					72,5	77,5	175,5	18,5
Min.					47	55	160	14
Max.					85	90	185	27

Einige klinisch-chemische Parameter sind Tab. 11 zu entnehmen. Da sich die Probennahme teilweise über mehr als einen Tag erstreckte und nicht immer an jedem Kinetiktag Kreatinin gemessen worden war, wurden in die Tabelle die beiden zeitlich nächstliegenden Kreatininwerte aufgenommen. Sie lagen am Tag vor der ersten Probengewinnung zwischen 0,47 und 1,21 mg/dl (Median 0,81), danach zwischen 0,41 und 1,17 mg/dl (Median 0,885 mg/dl). Zwischen den Werten vorher und nachher war kein großer Unterschied, sodass angenommen werden kann, dass sich die Nierenfunktion während der Probennahme nicht stark veränderte. Der nachträglich aus einer der Plasmaproben, die auch für die Bestimmung von Ertapenem verwendet wurden, bestimmte Wert für Cystatin C war zwischen 0,63 und 1,73 mg/l (Median 0,895 mg/l). Hieraus errechnete sich eine GFR nach Cockcroft-Gault von 46 bis 137 ml/min (Median 90 ml/min) und nach Hoek von 45 bis 118 ml/min (Median 98 ml/min). Ab einer GFR < 60 ml/min wurde von einer Nierenfunktionsstörung ausgegangen, dies traf für einen Patienten zu.

Der Albuminwert betrug 24 - 30,6 g/l (Median 25,6 g/l), die Konzentration des Gesamtproteins 53 - 60 g/l (Median 57 g/l). Beide Werte lagen somit unter den vom zuständigen Labor angegebenen unteren Referenzwerten von 35 bzw. 64 g/l. Der Wert für alpha-1-saures Glykoprotein betrug 1,3 - 2,1 g/l (Median 1,8 g/l) und lag damit durchgängig oberhalb des Referenzbereichs von 0,5 - 1,2 g/l.

Tab. 11: Labor- und Nierenfunktionsparameter der sechs mit Ertapenem behandelten Intensivpatienten. Abk.: *ID* Identifikationsnummer, *CysC* Cystatin C, *eCL_{CG}* Glomeruläre Filtrationsrate berechnet nach Cockcroft-Gault anhand von Kreatinin, *eCL_{Hoek}* Glomeruläre Filtrationsrate berechnet nach Hoek anhand von Cystatin C, *sa1GP* Alpha-1 saures Glykoprotein, *Med.* Median, *Min.* Minimum, *Max.* Maximum

ID	Kreatinin vor (mg/dl)	Kreatinin nach (mg/dl)	CysC (mg/l)	eCL _{CG} (ml/min)	eCL _{Hoek} (ml/min)	Albumin (g/l)	Protein total (g/l)	sa1GP (g/l)
1	0,76	0,74	0,8	124	118	26,6	53	2,1
2	1,21	1,10	1,73	46	45	24,0	57	1,3
3	0,83	1,02	0,93	72	90	30,6		2,0
4	0,79	0,75	0,86	107	105	24,8	60	1,8
5	1,18	1,17	1,2	65	74	26,4	59	1,8
6	0,47	0,41	0,63	137	111	24,7	56	1,8
Med.	0,81	0,885	0,895	90	98	25,6	57	1,8
Min.	0,47	0,41	0,63	46	45	24,0	53	1,3
Max.	1,21	1,17	1,73	137	118	30,6	60	2,1

4.1.4 Plasmakonzentrationen von Ertapenem

Von jedem Patienten waren zwischen vier und sechs Proben innerhalb eines oder zweier Dosierungsintervalle vorhanden. Insgesamt wurden 29 Proben analysiert. In einer Probe wurden sehr niedrige Konzentrationen bestimmt. Es konnte nachträglich jedoch herausgefunden werden, dass bei diesem Patienten (Patient 3) eine Dosis unabsichtlich ausgelassen wurde; die fehlerhafte Probe wurde 37 Stunden nach der letzten Ertapenem-Infusion gewonnen. Die freien Konzentrationen konnten in dieser Probe nicht bestimmt werden. Die bestimmten Plasmakonzentrationen von Ertapenem sind in Abb. 6 dargestellt.

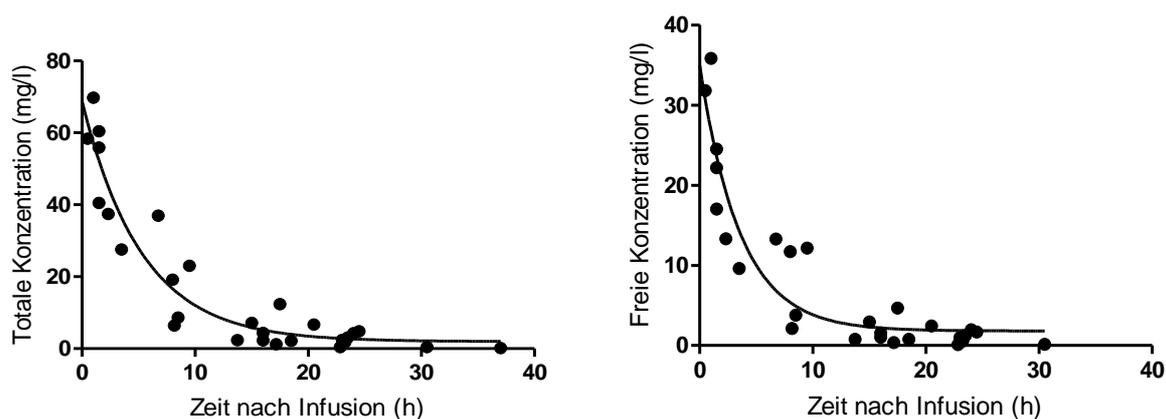


Abb. 6: Gemessene totale (links) und freie (rechts) Konzentrationen von Ertapenem im Plasma von sechs Intensivpatienten nach intravenöser Kurzinfusion von 1 g Ertapenem (4-6 Plasmaproben pro Patient).

4.1.5 Pharmakokinetische Auswertung

Der Konzentrations-Zeit-Verlauf der Plasmakonzentrationen von Ertapenem konnte adäquat in einem Ein-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Die berechneten pharmakokinetischen Parameter im steady-state sind in Tab. 12 dargestellt.

Die Clearance für die totale bzw. freie Konzentration betrug 1,69 - 6,67 l/h (Median 2,56 l/h), bzw. 3,85 - 15,1 l/h (Median 5,61 l/h). Das Verteilungsvolumen lag bei 14,8 - 36,2 l (Median 19,2 l) bzw. 30,4 - 71,0 l (Median 47,5 l). Es zeigte sich also ein deutlich erhöhtes Verteilungsvolumen bei gleichzeitig erhöhter Clearance für die freien Konzentrationen verglichen mit den totalen Konzentrationen.

Die Halbwertszeit des totalen Ertapenems lag bei 4,7 h, die AUC_{ss} über 24 h bei 405 mg*h/l, C_{max} bei 53,1 mg/l und die Konzentration am Ende des Dosierungsintervalls C_{24h} bei 1,90 mg/l. Die Halbwertszeit des freien Ertapenems betrug 4,4 h und war somit sehr ähnlich der Halbwertszeit der totalen Konzentration; die AUC_{ss} über 24 h war 179 mg*h/l, C_{max} 23,7 mg/l. Die Plasmaspiegel

am Ende des Dosierungsintervalls C_{24h} beliefen sich auf 0,71 mg/l. Im Mittel lag Ertapenem zu 37,8 % ungebunden vor, in Einzelproben wurden freie Konzentrationen von bis zu 60 % gemessen.

Besonders bei Patient Nr. 6 fallen die deutlich erhöhte Clearance, kurze Halbwertszeit und niedrige Konzentrationen auf.

Tab. 12: Pharmakokinetische Parameter im Gleichgewicht (steady state) von totalem (A) und freiem (B) Ertapenem der sechs Intensivpatienten. Abk.: *ID* Identifikationsnummer, *n* Probenanzahl, *CL* Clearance, V_{ss} Verteilungsvolumen, $t_{1/2}$ Halbwertszeit, AUC_{24h} Area under the curve, C_{max} Spitzenspiegel, C_{24h} Konzentration nach 24 h, f_u ungebundene Fraktion, $fT_{>2\text{ mg/l}}$ Anteil der Zeit innerhalb eines Dosierungsintervalls, während der die freie Konzentration oberhalb von 2 mg/l liegt; $fT_{>0,25\text{ mg/l}}$ Anteil der Zeit innerhalb eines Dosierungsintervalls, während der die freie Konzentration oberhalb von 0,25 mg/l liegt.

(A) Totales Ertapenem

ID	n	CL l/h	V_{ss} l	$t_{1/2}$ h	AUC_{24h} mg*h/l	C_{max} mg/l	C_{24h} mg/l
1	5	2,09	14,8	4,91	479	67,6	2,45
2	4	2,06	18,7	6,28	485	56,0	4,19
3	5	3,02	19,7	4,51	331	50,2	1,35
4	4	3,90	22,4	3,98	256	43,4	0,73
5	6	1,69	15,9	6,52	591	66,4	5,45
6	4	6,67	36,2	3,76	150	26,7	0,35
Median	4,5	2,56	19,2	4,71	405	53,1	1,90
Min	4	1,69	14,8	3,76	150	26,7	0,35
Max	6	6,67	36,2	6,52	591	67,6	5,45

(B) Freies Ertapenem

ID	n	CL l/h	V _{SS} l	t _{1/2} h	AUC _{24h} mg*h/l	C _{max} mg/l	C _{24h} mg/l	f _u (%)	fT _{>2 mg/l} (%)	fT _{>0.25 mg/l} (%)
1	5	4,53	30,4	4,66	221	32,6	0,99	43,7±4,5	80	100
2	4	3,84	32,4	5,85	261	31,8	1,97	53,6±6,3	99	100
3	4	5,95	33,1	3,86	168	29,3	0,43	34,5±5,7	64	100
4	4	10,6	61,9	4,06	94,7	15,8	0,29	39,5±5,1	52	100
5	6	5,27	62,0	8,15	190	18,1	2,45	36,2±1,0	100	100
6	4	15,1	71,0	3,25	66,1	13,4	0,09	30,9±2,4	39	79
Median	4	5,61	47,5	4,36	179	23,7	0,71	37,8	72	100
Min	4	3,84	30,4	3,25	66,1	13,4	0,09	30,9	39	79
Max	6	15,1	71,0	8,15	261	32,6	2,45	53,6	100	100

Von Clearance und Verteilungsvolumen ausgehend wurden Konzentrations-Zeit-Verläufe für die freie und totale Konzentration der sechs Patienten simuliert (Abb. 7). Hierbei wurde ein steady-state, also ein Gleichgewichtszustand angenommen, d.h. es wurde davon ausgegangen, dass sich Zufuhr und Ausscheidung nivellieren.

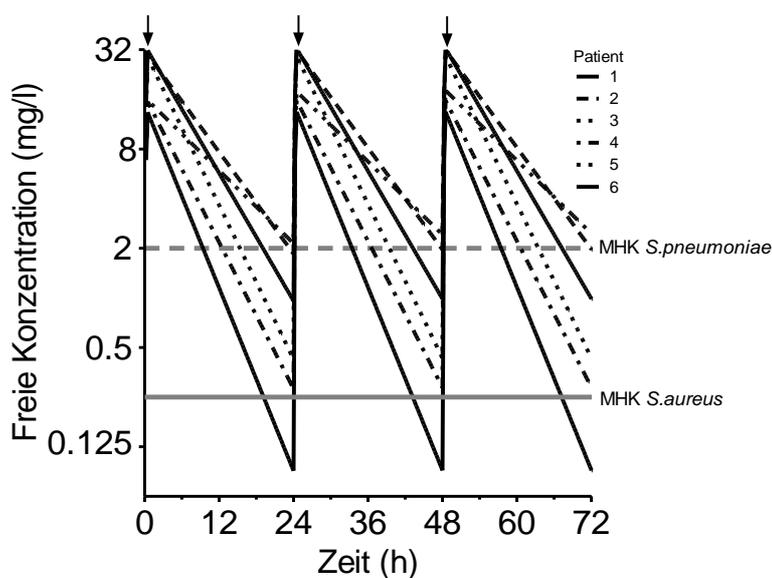


Abb. 7: Simulierte freie Konzentrations-Zeit-Verläufe der sechs mit Ertapenem behandelten Patienten. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzwerte der potentiellen Pathogene *Penicillin-resistenter S. pneumoniae* (2 mg/l) und *Methicillin-sensibler S. aureus* (0,25 mg/l) an [35]. Die Pfeile markieren das jeweilige Ende der Infusionen.

Abb. 7 veranschaulicht, dass die freie Ertapenemkonzentration der sechs beobachteten Patienten während 39 - 100 % (Median 72 %), bzw. 79 - 100 % (Median 100 %) der Zeit eines Dosierungsintervalls oberhalb der EUCAST-Grenzwerte von 2 mg/l, bzw. 0,25 mg/l, lag. Es wird weiterhin ersichtlich, dass Patient Nr. 6 die niedrigsten freien Konzentrationen aufwies.

Die hohe Korrelation der aus der Simulation berechneten Werte mit den gemessenen Werten zeigt Abb. 8 und demonstriert die gute Anpassung des Rechenmodells an die Messwerte.

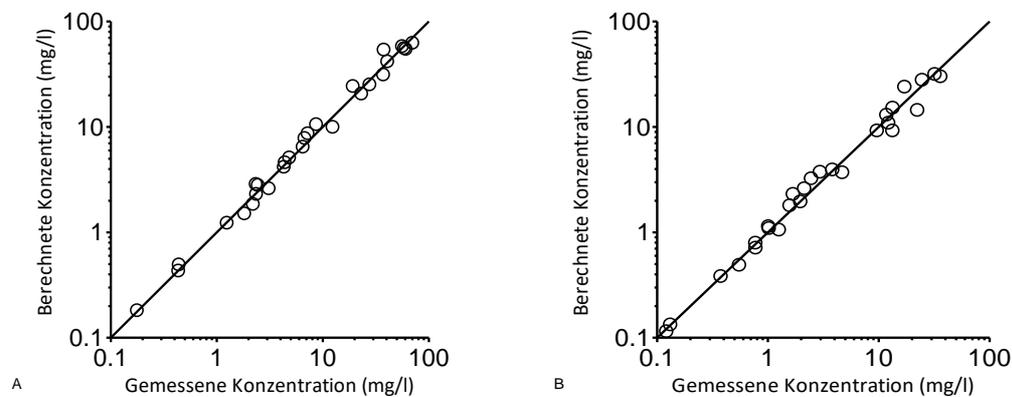


Abb. 8: Übereinstimmung von berechneter und gemessener Konzentration (A total, B frei) von Ertapenem (A: n = 28; r = 0,982; B: n = 27; r = 0,966).

4.2 Bindung von Ertapenem an Albumin

In Vorversuchen wurde die Bindung von Ertapenem an Albumin einer Alburnorm®-Lösung bestimmt. Die ungebundene Fraktion von Ertapenem in mit Ringer-Lösung auf 45 g/l Albumin verdünnter 20 %igen Alburnorm®-Lösung war 84,1 % unabhängig von der Ertapenemkonzentration (Bereich von 1 bis 250 mg/l). Die freie Konzentration von Ertapenem 10 und 100 mg/l war auch unabhängig von der eingestellten Albumin-Konzentration (Bereich 10-50 g/l) und betrug 83,5 %. Aufgrund der unplausiblen Ergebnisse wurden die weiteren Versuche mit reinem HSA durchgeführt.

Die freie Konzentration (Mittelwert \pm SD) betrug 94 ± 1.5 , 83 ± 1.2 , 60 ± 0.87 , 47 ± 1.3 und 30 ± 0.45 % für HSA Konzentrationen von 3, 10, 30, 50 und 100 g/l. Dabei war der ungebundene Anteil nicht von der Konzentration an Ertapenem (3-300 mg/l) abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ertapenem an HSA nicht sättigbar ist. Dies ist in Abb. 9 daran zu erkennen, dass das Verhältnis des totalen zum ungebundenen Anteil von Ertapenem konstant bleibt (die Kurve knickt nicht ab). Die Bindung an HSA war im gesamten beobachteten Konzentrationsbereich linear. Eine Sättigung bei (deutlich) höheren Konzentrationen wurde nicht überprüft, da dieser Bereich außerhalb möglicher Wirkspiegel liegt.

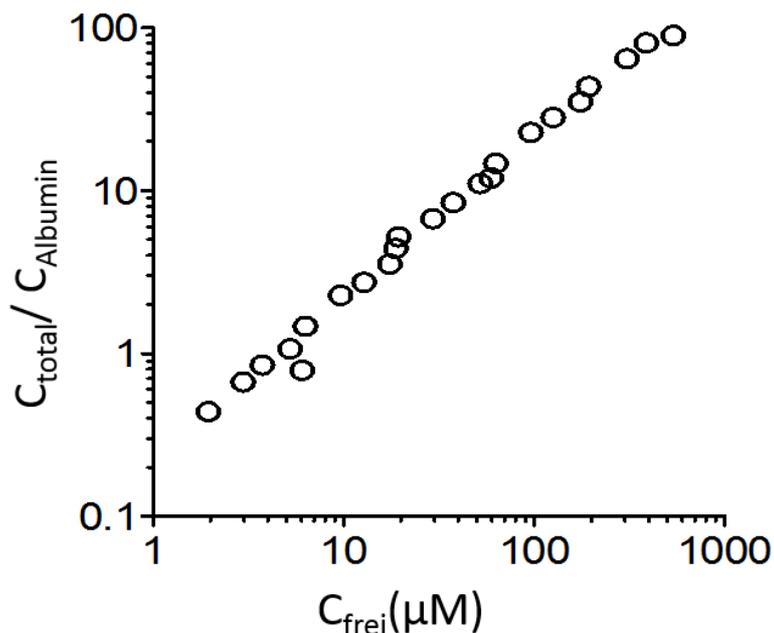


Abb. 9: Michaelis-Menten-Diagramm zur Bindung von Ertapenem (3-300 mg/l, 6.3-630 μM) an HSA 3-100 g/l. Abk.: C_{total} totale Konzentration von Ertapenem, $C_{Albumin}$ Albuminkonzentration, C_{frei} freie Ertapenemkonzentration.

4.2.1 Bindung an Probandenplasma

Die Bindung an Probandenplasma zeigt Abb. 10. Unter 40 mg/l totaler Konzentration von Ertapenem lag der ungebundene Anteil bei etwa 20 %. Er stieg auf 25 % bei 100 mg/l und bis zu 30 % bei 200 mg/l an. Der Kurvenverlauf konnte im semilogarithmischen Maßstab mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden.

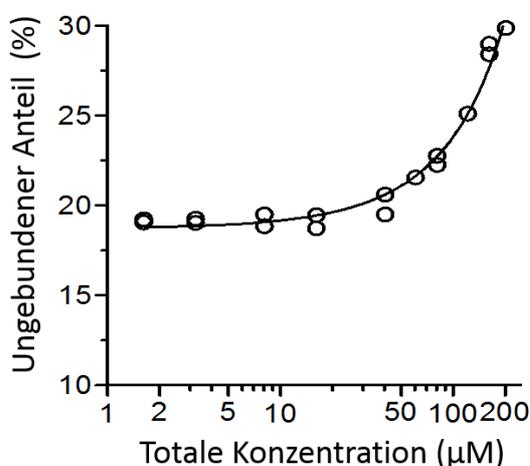


Abb. 10: Abhängigkeit der freien Konzentration von Ertapenem im Plasma von der Gesamtkonzentration (Einzelwerte zweier Assays mit $n = 1$ für 60, 120 und 200 mg/l).

Bei der Verdünnung von Probandenplasma mit IPP zeigten sich schrittweise erhöhte freie Konzentrationen wie es in Abb. 11 an den ausgefüllten Symbolen zu sehen ist. Je stärker das

Plasma verdünnt wurde, desto geringer wurde die Proteinbindung. Die Dissoziationskonstante für die Bindung von Ertapenem an Albumin betrug 0,17 mM (Konfidenzintervall 95 %: 0,13 – 0,21 mM). Die Anzahl der Bindungsstellen betrug 1,3 (Konfidenzintervall 95 %: 1,1 – 1,5).

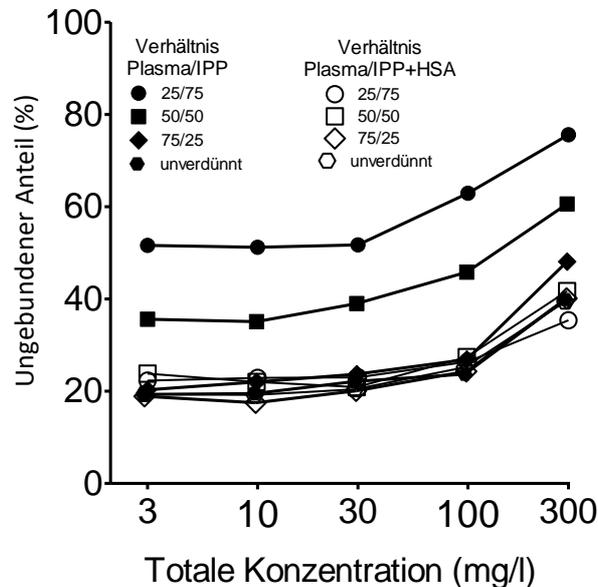


Abb. 11: Ungebundener Anteil von Ertapenem bei Verdünnung des Plasmas mit Phosphatpuffer (IPP) (ausgefüllte Symbole) ohne Albumin und unter Konstanthaltung des Albumingehalts (HSA) (leere Symbole).

Wurde die Albuminkonzentration jedoch konstant gehalten und nur alle anderen Plasmabestandteile verdünnt, zeigte sich keine veränderte Proteinbindung (leere Symbole, z.T. verdeckt). Hierbei zeigten sich auch keine Unterschiede durch den Grad der Verdünnung. Die Dissoziationskonstante betrug 0,155 mM (Konfidenzintervall 95%: 0,12 – 0,19 mM), die Anzahl der Bindungsstellen 1,1 (Konfidenzintervall 95 %: 0,92 - 1,3). Das Bindungsgleichgewicht lag also diskret weiter auf der Seite der dissoziierten Form. Die sättigbare, nicht-lineare Bindung blieb für das verdünnte Probandenplasma in beiden Fällen erhalten.

Es lässt sich feststellen, dass die Affinität von Ertapenem an Albumin während der Verdünnungsversuche nahezu identisch war, unabhängig davon ob alle Plasmabestandteile inklusive Albumin verdünnt wurden oder Albumin konstant gehalten wurde.

4.2.2 Bindung an Patientenplasma

Die Bestimmung der Proteinbindung in Patientenplasma erfolgte durch Analyse aller 29 Patientenproben. Dabei zeigte sich insgesamt eine schwächere Proteinbindung als im Probandenplasma wie in Abb. 12 zu sehen ist.

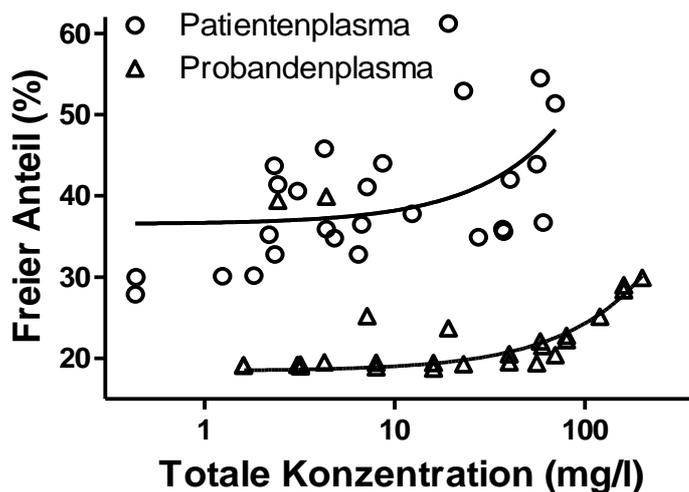


Abb. 12: Vergleich des ungebundenen Anteils in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration in Plasma von Probanden und Patienten.

Die Bindung war auch in Patientenplasma nichtlinear und sättigbar. Die Anzahl an vorhandenen Bindungsstellen fiel mit 0,4 (Konfidenzintervall 95 %: 0.16-0.65) deutlich geringer aus als in Probandenplasma. Die Dissoziationskonstante war mit 0,086 mM (Konfidenzintervall 95 %: 0.026-0.15 mM) niedriger. Die Affinität der Bindung stieg also an, es waren jedoch weniger Bindungsstellen vorhanden.

4.2.3 Vergleich der Proteinbindung

Es lässt sich feststellen, dass die Proteinbindung im Patientenplasma stärker ausgeprägt war als in HSA-Lösung, jedoch geringer ausfiel als in Probandenplasma, unabhängig davon ob das Probandenplasma verdünnt war oder nicht. Das Michaelis-Menten-Diagramm in Abb. 13 veranschaulicht dies. Einen Vergleich der Bindungsstellen und der Dissoziationskonstanten (Affinitäten) liefert Tab. 13.

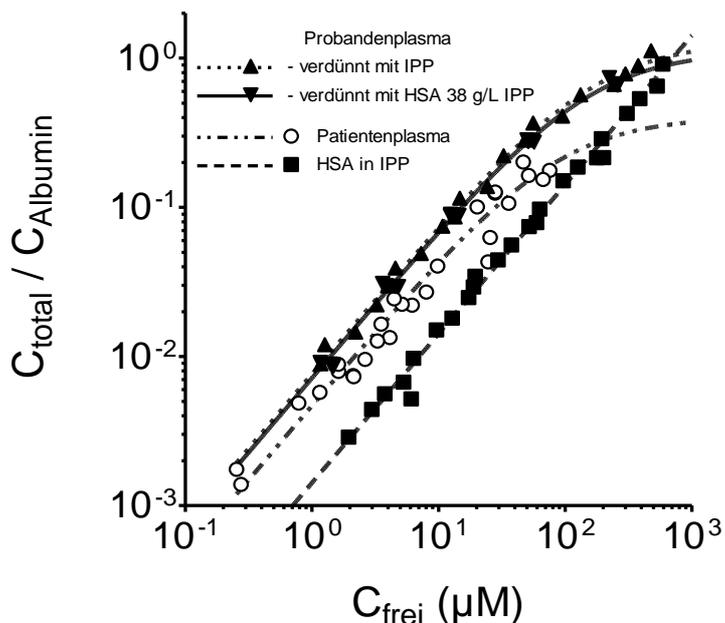


Abb. 13: Graphische Veranschaulichung der Michaelis-Menten-Analyse der Bindung von Ertapenem an Albumin in Plasma gesunder Probanden, von Intensivpatienten und in HSA-Lösung, die z.T. verdünnt wurde. Abk.: C_{total} , C_{frei} , $C_{Albumin}$: Molare Konzentrationen von gebundenem und ungebundenem Ertapenem, bzw. Albumin, *HSA* Humanes Serum Albumin, *IPP* Isotonischer Phosphatpuffer

Tab. 13: Anzahl an Bindungsstellen (n) und Dissoziationskonstante (k_d) für die Bindung von Ertapenem an Albumin in HSA-Lösung, Plasma von Probanden, das mit Phosphatpuffer, bzw. mit Albumin 38 g/l (Plasma+IPP+HSA) verdünnt wurde und in klinischen Proben von Intensivpatienten. Abk.: *p.e.* Punktschätzung, *CI95* 95% Konfidenzintervall, *n.d.* nicht bestimmt, *HSA* Humanes Serumalbumin, *IPP* Isotonischer Phosphatpuffer, r^2 Bestimmtheitsmaß

	HAS		Plasma+IPP		Plasma+IPP+HSA		Intensivpatienten	
	p.e.	CI95	p.e.	CI95	p.e.	CI95	p.e.	CI95
n	n.d.	n.d.	1,3	1,1-1,5	1,1	0,92-1,3	0,40	0,16-0,65
k_d (mM)	n.d.	n.d.	0,17	0,13-0,21	0,155	0,12-0,19	0,086	0,026-0,15
n/k_d (M^{-1})	1420	1344-1496	7640		7205		4720	
r^2	0,98		0,98		0,99		0,92	

5 Diskussion

5.1 HPLC-Methode

Ertapenem wurde in Humanplasma meist mittels HPLC und UV-Detektion bei 300 nm, in neueren Studien auch mittels LC/MSMS-Methoden bestimmt [70]. Die in dieser Arbeit beschriebene HPLC-Methode mit UV-Detektion bei 300 nm erwies sich als hinreichend empfindlich und präzise für die Analyse von Ertapenem im Plasma von Intensivpatienten. Sie zeigte eine gute Selektivität trotz der Zusatzpeaks in den Chromatogrammen der Intensivpatienten und ließ eine zuverlässige Quantifizierung zu. Bei einem der Intensivpatienten kam es zu einer Interferenz bei der Bestimmung der freien Konzentration, die die Auswertung über die Peakfläche geringfügig, nicht aber die über die Peakhöhe beeinflusste. Die Proben wurden deshalb generell über die Peakhöhenmethode ausgewertet. Freie und totale Plasmakonzentrationen von Ertapenem bei Intensivpatienten konnten zuverlässig mit der HPLC-Methode gemessen werden. Nur in einer Probe, die aber erst 37 Stunden nach Infusion von Ertapenem gewonnen worden war, waren die freien Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze.

Die Kombination der HPLC-Analytik mit der Ultrafiltration unter "physiologischen" Bedingungen - wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben - öffnet für die Zukunft die Möglichkeit, freie und totale Konzentrationen im Rahmen eines TDM-Konzeptes schnell und präzise zu bestimmen. Als Vorteile der HPLC-Methode für ein TDM-Konzept sind sicherlich die einfache Probenvorbereitung und Durchführung der Messungen aufzuführen, sowie die hohe Flexibilität der Methode bei Interferenzen. Nachteilig ist der relativ hohe Aufwand durch geschultes Personal, sowie die dadurch entstehenden Kosten. Dennoch ist die Methode im Vergleich zu LC/MSMS-Methoden durch die vielfach geringeren Anschaffungskosten des analytischen Instrumentariums wesentlich kostengünstiger und kann auch von kleineren Kliniken geleistet werden. Die von Kritikern angeführte geringere Selektivität der UV-Detektion im Vergleich zur massenspektroskopischen Detektion [71] war in dieser Studie für alle Belange ausreichend.

5.2 Ultrafiltration als Methode der Wahl zur Messung freier Plasmakonzentrationen

Es gibt zahlreiche Methoden zur Bestimmung freier Konzentrationen. Hierzu zählen u.a. die Gleichgewichtsdialyse, die Mikrodialyse, die Ultrafiltration und die Ultrazentrifugation. Jede dieser Methoden weist Vor- und Nachteile auf [72]. Einige Forschungsgruppen verwendeten mathematische Modelle oder Daten gesunder Probanden zur Berechnung der freien

Konzentrationen ohne diese zu messen [53,73,74]. Die Variabilität der Ergebnisse ist nicht nur zwischen den Methoden auf Grund unterschiedlicher Untersuchungsbedingungen groß, sondern auch innerhalb der jeweiligen Methoden [58].

Als historischer Goldstandard zur Bestimmung der Proteinbindung gilt die Gleichgewichtsdialyse [72]. Aufgrund des großen Zeitaufwandes und der teils fehlenden Stabilität einiger Substanzen, insbesondere der Betalactame, über einen längeren Zeitraum bei 37 °C hat die Gleichgewichtsdialyse in den letzten Jahren jedoch immer mehr an Stellenwert verloren.

Heutzutage wird zur Bestimmung freier Konzentrationen in Plasma zumeist die Ultrafiltration herangezogen [72]. Sie ist leicht durchführbar, schnell (<0.5 h vs. 4-24 h bei der Gleichgewichtsdialyse) und kostengünstig [58]. 2003 beschrieben Musson und Kollegen ein Protokoll für Ertapenem, welches die Ultrafiltration von Plasma bei 1500 g und Raumtemperatur empfahl [75]. Hintergrund dieser experimentellen Bedingungen war wohl die einfache Durchführbarkeit. Leider wurde dabei die Wichtigkeit des Einflusses experimenteller Bedingungen wie pH, Temperatur und Zentrifugalkraft außer Acht gelassen [58]. Auf die große Bedeutung der Untersuchungsbedingungen soll hier nicht in allen Details eingegangen werden; einige Aspekte sind jedoch relevant für die Interpretation der hohen Variabilität der Ergebnisse zur Proteinbindung und sollen deshalb aufgeführt werden (vgl. [58]):

- 1) Die Proteinbindung von Ertapenem ist abhängig vom pH-Wert und höher bei $\text{pH} > 8$ im Vergleich zu $\text{pH} = 7,4$. Das Ansteigen des pH-Werts durch Entweichen von CO_2 während der Gewinnung, der Lagerung und der Zentrifugation der Plasmaproben macht eine Pufferung nötig: die pH-Werte in der vorliegenden Arbeit, ca. 7,3 vor der Zentrifugation, danach zwischen 7,5 und 7,6, liegen hinreichend genau beim physiologischen pH-Wert von 7,4.
- 2) Auch die Temperatur hat einen Einfluss auf das chemische Gleichgewicht der Proteinbindung. So zeigte sich, dass die Ergebnisse für f_u von Majumdar 2002 und der Fachinformation von 5-8 % bei Raumtemperatur ohne Pufferung der Proben reproduziert werden konnten, jedoch unter physiologischen Bedingungen ($\text{pH} 7,4$, 37 °C) um das Zweibis Vierfache anstiegen [41,58,76].
- 3) Außerdem sei auf die Relevanz hoher Zentrifugalkräfte hingewiesen, die in zwei Studien zu finden waren (15000g) [77,78]: sie verkürzen die Zeit des Ultrafiltrationsvorgangs durch eine schnellere Gewinnung von ausreichend Ultrafiltrat, verursachen jedoch bei zu hohem Druck durch die Zentrifugalkraft, abhängig vom Molekulargewicht der Substanz,

niedrigere ungebundene Fraktionen, was man „pressure effect“ nennt [58,79]. Aus diesem Grund sollten derart hohe Zentrifugalkräfte vermieden werden.

Auf die Methode von Musson 2003 Bezug nehmend wurde die Ultrafiltration von Ertapenem in weiteren Studien, z.T. unter Abänderung des Filters, der Zentrifugalkraft oder der Temperatur, jedoch nie unter physiologischen Bedingungen angewendet und führte zu nicht vergleichbaren Resultaten der Proteinbindung von Ertapenem zwischen den Studien [54,78,80,81]. In allen Fällen wurde die ungebundene Fraktion falsch niedrig bestimmt.

Auch wenn die physiologische Situation des Körpers diskret variiert (Hypo/Hyperthermie, Azidose, Entzündung etc.), scheint es dennoch sinnvoll zu sein, Messungen unter physiologischen Bedingungen durchzuführen. Die in dieser Arbeit und einer Vorläuferarbeit [58] dargestellten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss von pH und Temperatur auf die Ergebnisse der Ultrafiltration von Ertapenem. Diese Aspekte wurden bereits früher für diverse Substanzen beschrieben und sind im Allgemeinen nicht neu [79,82–86], gerieten aber anscheinend zwischenzeitlich in Vergessenheit.

Die Ultrafiltration bleibt bei allen methodischen Fallstricken, die mit ihr verknüpft sind, die Methode der Wahl für Spiegelbestimmungen im Rahmen eines therapeutischen drug monitorings (TDM) und wurde bereits in der Routinebestimmung von freien Plasmakonzentrationen zahlreicher Beta-Laktame eingesetzt [87].

5.3 Proteinbindung von Ertapenem

Die Michaelis-Menten-Kinetik der Albuminbindung von Ertapenem ließ wichtige Unterschiede zwischen HSA-Lösungen, Plasma gesunder Probanden und Plasma von Intensivpatienten erkennen (Abb. 13). In HSA-Lösungen war die Bindung über den gesamten untersuchten Bereich (3-300 mg/l) linear. In Plasma hingegen war sie nichtlinear und ausgeprägter – so als ob zusätzliche Bindungspartner vorhanden wären. Es zeigte sich aber, dass das Ausmaß der Proteinbindung gleich blieb, unabhängig davon, ob das Plasma mit Isophosphatpuffer oder mit Albumin-Lösung verdünnt wurde und so die Albuminkonzentration konstant gehalten wurde. Dieses Ergebnis schließt andere quantitativ bedeutende Bindungspartner als Albumin aus. Die Bindung von Ertapenem im Plasma von Intensivpatienten konnte weniger genau (vgl. Tab. 13) beschrieben werden, was auch an der gepoolten Analyse der Proben verschiedener Patienten lag. Sie war insgesamt geringer als in verdünntem Plasma gesunder Probanden, jedoch höher als in HSA-Lösung. Einschränkend bleibt an dieser Stelle zu bemerken, dass laut einiger Autoren die

Bindungseigenschaften von kommerziell erworbenem HSA nicht zwangsläufig mit den Bindungseigenschaften des Albuminmoleküls im Plasma gleichgesetzt werden dürfen [12,88]. Grund hierfür sind wohl Konformationsänderungen des Moleküls. So konnte von Nix 2004 gezeigt werden, dass die Proteinbindung zwischen verschiedenen HSA-Lösungen deutlich variierte und bei gleichen Albuminwerten zumeist geringer war als in Serum. Folgende Schlussfolgerungen lassen sich trotz dieser Einschränkung ziehen:

- 1) Albumin ist der einzige, relevante Bindungspartner für Ertapenem.
- 2) Die Bindung von Ertapenem wird von anderen Plasmabestandteilen beeinflusst.
- 3) Plasma von Intensivpatienten ist kein verdünntes Plasma gesunder Probanden.

Es ist aus der Literatur zwar bekannt, dass Hypoalbuminämie zu einer geringeren Proteinbindung von Pharmaka führen kann [20]. Hieraus darf jedoch nicht die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Hypoalbuminämie die einzige Ursache für die geringere Proteinbindung darstellt. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann gefolgert werden, dass hinter der veränderten Proteinbindung von Ertapenem bei kritisch kranken Patienten mehr als nur die Hypoalbuminämie steckt. Eine analoge Schlussfolgerung wurde aus Untersuchungen mit Cephazolin gezogen [89].

Die Erklärung für die veränderten Bindungseigenschaften des Albuminmoleküls scheint komplex zu sein und bedarf weiterer Forschung. Es gibt zahlreiche publizierte Faktoren, welche die Albuminbindung von Pharmaka beeinflussen. So wurde berichtet, dass Fettsäuren und Kalziumionen Konformationsänderungen des Albuminmoleküls verursachen können, die je nach Pharmakon sowohl zu einer verstärkten als auch zu einer verminderten Proteinbindung führen können [90]. Eine wichtige Rolle scheint auch der Redox-Status des Albuminmoleküls zu spielen. So führen Diabetes Mellitus, Nephropathien oder Lebererkrankungen [91] aber u.U. auch Beatmungsformen auf Intensivstationen oder Sepsis zu oxidativem Stress. Hierdurch kommt es zu Konformationsänderungen des Albuminmoleküls und veränderten physikochemischen Eigenschaften der verschiedenen Bindungsstellen mit Folgen für die Bindungseigenschaften [92]. Der Diabetes Mellitus nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonderrolle ein: er führt neben dem angesprochenen oxidativen Stress auch zu nicht enzymatischen Glykosylierungen, was ebenso veränderte Bindungseigenschaften zur Folge haben kann [93]. Wie der Diabetes, so übt auch die Sepsis möglicherweise neben dem oxidativen Stress über einen zweiten Mechanismus einen Einfluss auf die Albuminbindung aus: bei der Abtötung gram-negativer Bakterien werden Lipopolysaccharide freigesetzt, die zu einer herabgesetzten Proteinbindung führen können [94]. Verdrängung aus der Eiweißbindung durch die ausgedehnte Begleitmedikation einiger

Intensivpatienten ist eher unwahrscheinlich, da für eine solche kompetitive Verdrängung hohe Konzentrationen nötig sind und Betalactame im Vergleich zu vielen anderen Pharmaka selbst hoch dosiert werden.

Was den ungebundenen Anteil von Ertapenem angeht, erscheint das Ergebnis dieser Arbeit sowohl für Plasma gesunder Probanden (20-25 %) als auch für Plasma von Intensivpatienten (31-54 %) im ersten Moment hoch, da die Fachinformation und Majumdar 2002 einen ungebundenen Anteil von 5-8 % angeben [76]. Jedoch ist der gemessene ungebundene Anteil in den Kontext der Krankheitssituation und der Messmethodik zu setzen. So ist der in dieser Arbeit gemessene Wert dem Wert einer Studie von Brink 2009 an acht Patienten mit schwerer Sepsis sehr ähnlich. Auch wenn der ungebundene Anteil in der Arbeit nicht explizit benannt wurde, so lässt sich aus den Werten für AUC_{total} und AUC_{frei} ein f_u von ca. 55 % errechnen [54]. Ebenso geben Frasca et al. in ihrer Studie an sechs Patienten mit VAP und Wundinfekten einen ungebundenen Anteil von 40 – 51 % an. Bei Intensivpatienten, die auf eine kontinuierliche Nierenersatztherapie angewiesen waren, wurde f_u mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt. Der Wert von 20 – 40 % fällt hier zwar etwas niedriger als der in dieser Arbeit gemessene aus, übersteigt den Ausgangswert der Fachinformation allerdings immer noch um ein Mehrfaches [95]. Die Bestätigung eines hohen ungebundenen Anteils durch die Gleichgewichtsdialyse als Referenzmethode bestätigt die Ergebnisse dieser Arbeit. Diesen Studien gegenüber steht der gemessene ungebundene Anteil von 10,9 % bei Verbrennungsopfern [57], wobei hier mittels Ultrafiltration nach der Methode von Musson 2003 vorgegangen wurde, was die Richtigkeit dieses Wertes fraglich erscheinen lässt [75].

Zwei Gründe erklären die Diskrepanz zwischen den Werten dieser Arbeit und den Werten der Fachinformation:

- 1) Geringere Plasmaproteinbindung bei Intensivpatienten, die jedoch nicht allein durch Hypoalbuminämie erklärt werden kann.
- 2) Die Angaben der Fachinformation (basierend auf der Methode von Musson [75]) sind auch für Probandenplasma falsch niedrig, weil die Bedeutung der experimentellen Bedingungen missachtet wurde.

5.4 Pharmakokinetische Parameter von Ertapenem bei Intensivpatienten

Trotz der geringen Anzahl von Proben und der variablen Zeitpunkte (opportunistic sample schedule), während der die Proben gewonnen wurden, war es möglich zuverlässige

Berechnungen anzustellen. Verglichen mit den pharmakokinetischen Parametern gesunder Probanden [76] waren in dieser Arbeit sowohl das Verteilungsvolumen (19,2 vs. 8,2 l) als auch die Clearance (2,56 vs. 1,77 l/h) etwa zweifach erhöht. Diese Ergebnisse decken sich mit den erhöhten Werten für Verteilungsvolumen und Clearance aus Vergleichsstudien an Patienten mit Pneumonie, Sepsis, Hautinfektionen, intraabdominellen Infektionen und Verbrennungen, wobei Clearance und Verteilungsvolumen in einigen dieser Studien noch drastischer erhöht waren [53–57].

Ein Grund für das erhöhte Verteilungsvolumen ist die erhöhte ungebundene Fraktion (31 – 54 vs. 5 – 8 %). Der Zusammenhang von ungebundener Fraktion und Verteilungsvolumen lässt sich wie folgt ausdrücken:

$$V_d = \left(\frac{f_u}{f_{uT}} \right) \times V_T + V_P \quad (1)$$

V_d Verteilungsvolumen, f_u ungebundene Fraktion im Plasma, f_{uT} ungebundene Fraktion im Gewebe, V_T Verteilungsvolumen im Gewebe, V_P Verteilungsvolumen im Plasma.

Es wird deutlich, dass das Verteilungsvolumen proportional zur ungebundenen Fraktion des Antibiotikums ist. Relevant ist dies v.a. für hydrophile Substanzen wie Ertapenem, deren Verteilungsvolumen natürlicherweise eher klein ist. Der an Plasmaproteine gebundene Anteil ist neben der geringen Gewebegängigkeit (V_T ist klein) der limitierende Faktor [20]. Die verminderte Proteinbindung (f_u ist erhöht) hat also ein größeres Verteilungsvolumen zur Folge. Das erhöhte Verteilungsvolumen wiederum verursacht niedrigere Spitzenspiegel und (sofern sich die Clearance nicht in gleichem Maß erhöht) höhere Talspiegel, ein für Beta-Laktame günstiger Effekt, da hierdurch die Zeit über der MHK verlängert wird (s.u.). So lag in dieser Arbeit die für Beta-Laktame weniger relevante Spitzenkonzentration bei allen Patienten unter der in der Fachinformation mit 155 µg/ml angegebenen Konzentration, C_{24h} allerdings über den angegebenen 1 µg/ml.

Auch die Clearance ist durch die erhöhte ungebundene Fraktion gesteigert, da nur die ungebundene Fraktion ausgeschieden werden kann. Folgender mathematischer Zusammenhang unterstützt diese These:

$$CL = \frac{Q \times (f_u \times CL_{Int})}{Q + f_u \times CL_{Int}} \quad (2)$$

CL Clearance, Q renaler Blutfluss, f_u ungebundene Fraktion, CL_{Int} intrinsische Clearance.

Für renal eliminierte Antibiotika - Ertapenem wird zu 80 % renal ausgeschieden - steigt die Gesamtclearance bei konstanter intrinsischer Clearance (die Rate an tubulärer Sekretion und das Vorkommen von Transportern und Enzymen bleibt gleich) also entweder durch eine höhere ungebundene Fraktion (f_u wird größer) oder durch einen erhöhten renalen Blutfluss (Q wird größer) [20]. Ersteres erklärt die erhöhte Clearance bei normaler Nierenleistung der Patienten dieser Studie, d.h. es liegt mehr Ertapenem ungebunden vor und kann ausgeschieden werden. Letzteres kam wohl bei Patient Nr. 6 (vgl. Tab. 12) neben der geringen Proteinbindung hinzu. Dieser hatte mit Abstand die höchste Clearance für Ertapenem. Dies könnte durch eine verstärkte renale Ausscheidung („augmented renal clearance“) bedingt gewesen sein ($CL_{CG} = 137$ ml/min), ein häufiger Zustand bei jüngeren Patienten mit intrazerebralen Veränderungen wie in vorliegendem Fall (47 Jahre, intrazerebrale Blutung) [5]. Patient Nr. 6 erreichte die niedrigsten Plasmakonzentrationen der sechs beobachteten Patienten, für sensible und intermediäre Pathogene waren die Plasmaspiegel aber ausreichend.

Man kann also davon ausgehen, dass die erhöhte ungebundene Fraktion sowohl ein erhöhtes Verteilungsvolumen als auch eine höhere Clearance nach sich gezogen hat. Der Zusammenhang zwischen Halbwertszeit, Verteilungsvolumen und Clearance wird durch folgende Formel beschrieben:

$$t_{1/2} = \ln 2 \times \frac{V_d}{CL} \quad (3)$$

$t_{1/2}$ Halbwertszeit, V_d Verteilungsvolumen, CL Clearance.

In einem solchen Fall, sind die Plasmakonzentrationen und die Halbwertszeit davon abhängig, welcher der beiden Faktoren überwiegt. Theoretisch kann es bei einem Überwiegen der Erhöhung der Clearance zu nicht ausreichenden Plasmaspiegeln kommen, da die Konzentration des Antibiotikums möglicherweise zu früh unter die MHK fällt, bzw. diese im Extremfall nie übersteigt. Berichtet wurde dies neben Ertapenem [53,54] auch für andere Antibiotika, die zu einem (hohen) Anteil renal eliminiert werden und zu einem hohen Anteil eiweißgebunden sind wie z.B. Ceftriaxon, Flucloxacillin, Teicoplanin, Daptomycin [5,96–99]. Ähnlich wie in Vergleichsstudien [53–57], ergab sich in dieser Arbeit jedoch eine nahezu gleichbleibende, bzw. geringfügig verlängerte Halbwertszeit (4,7 vs. 3,8 h).

5.5 Beurteilung der PK/PD-Indices von Ertapenem

Zur Beurteilung ausreichender Plasmakonzentrationen betrachtet man gewöhnlich im Falle von Ertapenem den PK/PD-Index $fT_{>MHK}$, d.h. die Zeit während der die MHK im Dosierungsintervall überschritten wird, wobei ein Wert von 40 % in jedem Falle überschritten werden sollte [30]. Mit einer Ausnahme wurde das Ziel von $fT_{>MHK=2mg/l} > 40\%$ des Dosierungsintervalls erreicht und bei Patient Nr. 6 nur knapp verfehlt. Für eine MHK von 1 mg/l und somit für alle gemäß EUCAST als sensibel oder intermediär eingestuften Bakterien wurde auch bei Patient Nr. 6 eine $fT_{>MHK=1mg/l} > 50\%$ erreicht.

Einige Autoren zielen für Intensivpatienten auf eine $fT_{>MHK} = 100\%$ ab, da dies mit einem besseren klinischen Resultat verknüpft war [100–102]. Die groß angelegte, multizentrische, internationale DALI-Studie mit 384 Patienten auf 68 Intensivstationen fand eine Assoziation von positivem klinischem Outcome mit einer $fT_{>MHK} = 100\%$ im Vergleich zu einer $fT_{>MHK} = 50\%$ [7]. Andere Studien diskutieren sogar Konzentrationen, die für die gesamte Dauer, bzw. einen Teil des Dosierungsintervalls 4 x MHK beträgt [6,101,103]. Respektiert man derartige Ziele müsste man von einer ungenügenden Dosierung der beobachteten Ertapenem-Patienten in dieser Studie sprechen. Ein Vorteil eines solchen Therapieregimes ist jedoch nicht durch größere prospektive Studien belegt und es gibt bislang keine Evidenz dafür, dass diese Werte erreicht werden müssten [101]. Vom heutigen Kenntnisstand ausgehend ist es nicht zwangsläufig notwendig eine vierfache MHK-Konzentration zu erreichen, bzw. diese über den gesamten Dosiszeitraum aufrecht zu erhalten. Zumeist wird es durchaus toleriert und als unproblematisch angesehen, wenn die freien Konzentrationen für einen gewissen Teil der Zeit unter die MHK fallen [31]. Die abschließende Beurteilung, für welche Zeit welche Konzentration überschritten werden muss, ist noch nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

Einen großen Einfluss auf die Interpretation von PK/PD-Indices hat die Proteinbindung, insbesondere dann, wenn freie Konzentrationen von gemessenen totalen Konzentrationen und f_u -Werten aus der Fachinformation berechnet wurden [73,74], weil bei der Etablierung der Daten [76] gemachte Fehler weitergetragen werden [104]. Diese Vorgehensweise führt dann unter Umständen zu falschen Werten für die freie Konzentration und zu fraglichen Schlussfolgerungen. So kamen Burkhardt et al. 2006 in ihrer Studie an 17 VAP-Patienten zu einem $fT_{>MHK=2mg/l}$ von nur 25 %, einem nicht ausreichenden Wert. Es wurden allerdings keine freien Konzentrationen gemessen, sondern mit einem mathematischen Modell (two-class binding site equation) berechnet auf Basis der "falsch niedrigen" Werte, die in die Fachinformation aufgenommen

wurden [53]. Mit einem derartigen Vorgehen wäre u.U. in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Schlussfolgerung entstanden, dass Ertapenem nicht ausreichend dosiert wurde. Dieser Vergleich macht deutlich, dass bei Substanzen wie Ertapenem entsprechend einem Consensus Papier [33] die freien Konzentrationen gemessen und nicht berechnet werden sollten.

5.6 Einschränkungen der vorliegenden Arbeit

Einige Einschränkungen dieser Arbeit müssen gemacht werden. Zuerst sollte festgestellt werden, dass nicht beansprucht werden kann, dass die gemessenen freien Konzentrationen den wahren freien Konzentrationen *in vivo* entsprechen. Aber sie sind näher an der Realität als einige frühere Messungen, da die Ultrafiltration unter physiologischen Bedingungen durchgeführt wurde. Zudem wurden die Werte der vorliegenden Arbeit indirekt "validiert"; mit der Gleichgewichtsdialyse wurden ähnliche Ergebnisse erzielt [95]. Die Gründe für die offensichtlich veränderten Bindungseigenschaften des Albuminmoleküls konnten in der vorliegenden Studie (noch) nicht geklärt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten jedoch hilfreich für weitere Untersuchungen sein. Weiterhin ist es nicht möglich, durch die Ultrafiltration den Wirkspiegel am Ort der Infektion zu messen, sondern lediglich die Konzentration im Plasma, die nur näherungsweise einen Rückschluss auf die Konzentration am Ort der Infektion zulässt. Das wäre eher mit der Mikrodialyse möglich, die jedoch als invasive, interventionelle Maßnahme im Rahmen dieser Beobachtungsstudie nicht verwendet werden konnte [105]. Zudem wurden keine MHKs für Bakterien bestimmt, sondern die allgemeinen EUCAST-Grenzwerte als Referenz herangezogen. Somit ist nur eine ungefähre Vorstellung mit den Daten dieser Patienten verknüpft, inwieweit die antimikrobielle Therapie erfolgreich gewesen sein könnte. Eine Auswertung von klinischem und mikrobiologischem Erfolg war nicht Teil dieser Arbeit.

Eine weitere Schwäche dieser Studie liegt in der geringen Anzahl von Patienten. Es war zwar möglich freie Konzentrations-Zeit-Verläufe der Patienten zu simulieren, eine Generalisierbarkeit geht hiervon jedoch aufgrund der geringen Patientenzahl nicht aus. Trotzdem gibt die Studie interessante Hinweise und einen Aufschluss über die veränderte Pharmakokinetik von Ertapenem bei Intensivpatienten.

Die Patienten wiesen in wichtigen Charakteristika wie Nierenfunktion oder Albuminwerten nur leichtgradig abnormale Werte auf, was nicht typisch für Intensivpatienten ist. Die Patientengruppe könnte jedoch trotzdem repräsentativ sein, da es aufgrund der

Pseudomonaden-Lücke eher unwahrscheinlich ist, dass schwerer erkrankte Patienten mit Ertapenem im Kontext der Intensivmedizin behandelt werden.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter von Ertapenem bei Intensivpatienten mit spezieller Berücksichtigung der Proteinbindung. Es wurden freie und totale Konzentrationen von Ertapenem im Plasma von sechs Intensivpatienten, die einmal täglich eine Infusion mit 1 g Ertapenem über 30 Minuten verabreicht bekamen, mittels HPLC bestimmt. Die Plasma-Konzentrations-Zeit-Verläufe konnten befriedigend durch ein Ein-Kompartiment-Model beschrieben werden. Die Proteinbindung von Ertapenem wurde in Albumin-Lösung, sowie in Plasma gesunder und kritisch kranker Patienten bestimmt und in einer Michaelis-Menten-Kinetik dargestellt.

Folgende Ergebnisse und Schlussfolgerungen zeigt diese Arbeit:

- Die Bestimmung der freien Konzentration von Ertapenem durch Ultrafiltration ist anfällig auf experimentelle Bedingungen wie pH, Temperatur und Zentrifugalkraft. Die ungebundene Fraktion im Plasma gesunder Freiwilliger, gemessen unter "physiologischen" Bedingungen (pH 7,4, 37 °C) betrug etwa 20 % und damit ein Mehrfaches im Vergleich zu 5 – 8 %, dem Wert der Fachinformation.
- Die Proteinbindung fiel im Plasma von Intensivpatienten mit einer ungebundenen Fraktion (f_u) von 31 – 54 % sogar noch geringer aus.
- Neben dem bekannten Einfluss der Hypoalbuminämie auf die Proteinbindung gibt es vermutlich weitere Faktoren bei Intensivpatienten, welche die Bindungseigenschaften des Albuminmoleküls verändern. Eine abschließende Beurteilung, um welche Faktoren es sich handelt, bedarf weiterer Forschungsarbeit.
- Die Pharmakokinetik bei Intensivpatienten war von einem höheren Verteilungsvolumen und einer höheren Clearance geprägt.
- Die Schlussfolgerung früherer Arbeiten, dass Ertapenem bei Intensivpatienten höher dosiert werden sollte, um hinreichend hohe freie Plasmakonzentrationen zu erreichen, konnte widerlegt werden. Der Grund für diese Schlussfolgerung war die Annahme einer falsch hohen Proteinbindung.
- Trotz der deutlich abweichenden Pharmakokinetik gegenüber gesunden Probanden, gibt diese Arbeit einen Hinweis darauf, dass die Standarddosierung von Ertapenem bei Intensivpatienten ausreichend sein könnte.

7 Literatur

1. Vincent J-L, Rello J, Marshall J *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama* 2009;**302**:2323–2329.
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G *et al.* Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007;**33**:606–18.
3. Kumar A, Roberts D, Wood KE *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*: *Crit Care Med* 2006;**34**:1589–96.
4. Colardyn F. Appropriate and timely empirical antimicrobial treatment of icu infections--a role for carbapenems. *Acta Clin Belg* 2005;**60**:51–62.
5. Udy AA, Roberts JA, Lipman J. Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in the critically ill. *Intensive Care Med* 2013;**39**:2070–82.
6. Taccone FS, Laterre P-F, Dugernier T *et al.* Insufficient β -lactam concentrations in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Crit Care* 2010;**14**:R126.
7. Roberts JA, Paul SK, Akova M *et al.* DALI: Defining Antibiotic Levels in Intensive Care Unit Patients: Are Current β -Lactam Antibiotic Doses Sufficient for Critically Ill Patients? *Clin Infect Dis* 2014;**58**:1072–83.
8. Beck S, Wicha SG, Kloft C *et al.* Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Antibiotikatherapie. *Anaesthesist* 2014;**63**:775–82.
9. Stahlmann R, Lode H. Pharmakokinetik von Antibiotika bei Übergewichtigen und kritisch Kranken. *DMW-Dtsch Med Wochenschr* **140**:271–276.
10. A. Bunte, H. Knothe, K. Mündnich *et al.*, Lehrfilm: Antibiotika, Grundlagen der Therapie, Film in Wissenschaft und Technik, Eberhard Stock (Bielefeld, 1977; http://www.filmarchives-online.eu/viewDetailForm?FilmworkID=8c9bc4c268e02bd34fe93d023db5be39&set_language=de) (aufgerufen am 06.03.2016)
11. Merrikin DJ, Briant J, Rolinson GN. Effect of protein binding on antibiotic activity in vivo. *J Antimicrob Chemother* 1983;**11**:233–238.

12. Nix DE, Matthias KR, Ferguson EC. Effect of Ertapenem Protein Binding on Killing of Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;**48**:3419–24.
13. Zeitlinger MA, Sauermann R, Traunmüller F *et al.* Impact of plasma protein binding on antimicrobial activity using time–killing curves. *J Antimicrob Chemother* 2004;**54**:876–80.
14. Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient: *Crit Care Med* 2009;**37**:840–51.
15. Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 2007;**43**:117–137.
16. Pea F. Plasma pharmacokinetics of antimicrobial agents in critically ill patients. *Curr Clin Pharmacol* 2013;**8**:5–12.
17. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R *et al.* Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *JAMA* 2005;**294**:813–8.
18. Roberts DM, Roberts JA, Roberts MS *et al.* Variability of antibiotic concentrations in critically ill patients receiving continuous renal replacement therapy: A multicentre pharmacokinetic study*. *Crit Care Med* 2012;**40**:1523–8.
19. Gonzalez D, Schmidt S, Derendorf H. Importance of Relating Efficacy Measures to Unbound Drug Concentrations for Anti-Infective Agents. *Clin Microbiol Rev* 2013;**26**:274–88.
20. Roberts JA, Pea F, Lipman J. The Clinical Relevance of Plasma Protein Binding Changes. *Clin Pharmacokinet* 2013;**52**:1–8.
21. SAFE Study Investigators. Effect of baseline serum albumin concentration on outcome of resuscitation with albumin or saline in patients in intensive care units: analysis of data from the saline versus albumin fluid evaluation (SAFE) study. *BMJ* 2006;**333**:1044–1044.
22. Minimale Hemm-Konzentration – Wikipedia: https://de.wikipedia.org/wiki/Minimale_Hemm-Konzentration (aufgerufen am 18.02.2016)
23. Eagye KJ, Banevicius MA, Nicolau DP. Pseudomonas aeruginosa is not just in the intensive care unit any more: Implications for empirical therapy*. *Crit Care Med* 2012;**40**:1329–32.

24. Eagle H, Fleischman R, Musselman AD. Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin; importance of the aggregate time penicillin remains at effectively bactericidal levels. *Am J Med* 1950;**9**:280–99.
25. Eagle H, Fleischman R, Levy M. Continuous vs. Discontinuous Therapy with Penicillin. *N Engl J Med* 1953;**248**:481–8.
26. Flückiger U, Segessenmann C, Gerber AU. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem in a human-adapted mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;**35**:1905–1910.
27. Lorente L, Jiménez A, Palmero S *et al.* Comparison of clinical cure rates in adults with ventilator-associated pneumonia treated with intravenous ceftazidime administered by continuous or intermittent infusion: a retrospective, nonrandomized, open-label, historical chart review. *Clin Ther* 2007;**29**:2433–2439.
28. Lorente L, Jiménez A, Martín MM *et al.* Clinical cure of ventilator-associated pneumonia treated with piperacillin/tazobactam administered by continuous or intermittent infusion. *Int J Antimicrob Agents* 2009;**33**:464–8.
29. Craig WA. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;**22**:89–96.
30. Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of “bug and drug.” *Nat Rev Microbiol* 2004;**2**:289–300.
31. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998:1–10.
32. Schuck, Derendorf. Pharmacokinetic/ pharmacodynamic evaluation of anti-infective agents.
33. Mouton JW, Dudley MN, Cars O *et al.* Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J Antimicrob Chemother* 2005;**55**:601–7.
34. Shah PM. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2003;**52**:538–42.

-
35. Livermore DM. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother* 2003;**52**:331–44.
36. Hammond ML. Ertapenem: a Group 1 carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties. *J Antimicrob Chemother* 2004;**53**:ii7-ii9.
37. Jackson JJ, Kropp H. β -Lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. *J Infect Dis* 1992;**165**:1033–1041.
38. Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Epp SF *et al.* Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;**43**:424–7.
39. Friedland I, Stinson L, Ikaidi M *et al.* Resistance in Enterobacteriaceae: results of a multicenter surveillance study, 1995-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;**24**:607–12.
40. Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW *et al.* Activity of Ertapenem (MK-0826) versus Enterobacteriaceae with Potent β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;**45**:2831–7.
41. Fachinformation INVANZ: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000389/WC500033921.pdf (aufgerufen am 26.02.2016)
42. Koh TH, Sng L-H, Babini GS *et al.* Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Singapore Producing IMP-1 β -Lactamase and Lacking an Outer Membrane Protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;**45**:1939–40.
43. Nicolau DP, Carmeli Y, Crank CW *et al.* Carbapenem stewardship: does ertapenem affect *Pseudomonas* susceptibility to other carbapenems? A review of the evidence. *Int J Antimicrob Agents* 2012;**39**:11–5.
44. Yellin AE, Hassett JM, Fernandez A *et al.* Ertapenem monotherapy versus combination therapy with ceftriaxone plus metronidazole for treatment of complicated intra-abdominal infections in adults. *Int J Antimicrob Agents* 2002;**20**:165–173.
45. Solomkin JS, Yellin AE, Rotstein OD *et al.* Ertapenem versus piperacillin/tazobactam in the treatment of complicated intraabdominal infections: results of a double-blind, randomized comparative phase III trial. *Ann Surg* 2003;**237**:235.

46. Ortiz-Ruiz G, Caballero-Lopez J, Friedland IR *et al.* A study evaluating the efficacy, safety, and tolerability of ertapenem versus ceftriaxone for the treatment of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2002;**34**:1076–1083.
47. Vetter N, Cambroner-Hernandez E, Rohlf J *et al.* A prospective, randomized, double-blind multicenter comparison of parenteral ertapenem and ceftriaxone for the treatment of hospitalized adults with community-acquired pneumonia. *Clin Ther* 2002;**24**:1770–1785.
48. Roy S, Higareda I, Angel-Muller E *et al.* Ertapenem once a day versus piperacillin–tazobactam every 6 hours for treatment of acute pelvic infections: a prospective, multicenter, randomized, double-blind study. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2003;**11**:27–37.
49. Graham DR, Christopher L, Osvaldo M *et al.* Ertapenem once daily versus piperacillin-tazobactam 4 times per day for treatment of complicated skin and skin-structure infections in adults: results of a prospective, randomized, double-blind multicenter study. *Clin Infect Dis* 2002;**34**:1460–1468.
50. Tomera KM, Burdmann EA, Reyna OGP *et al.* Ertapenem versus Ceftriaxone Followed by Appropriate Oral Therapy for Treatment of Complicated Urinary Tract Infections in Adults: Results of a Prospective, Randomized, Double-Blind Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**:2895–900.
51. Jimenez-Cruz F, Jasovich A, Cajigas J *et al.* A prospective, multicenter, randomized, double-blind study comparing ertapenem and ceftriaxone followed by appropriate oral therapy for complicated urinary tract infections in adults. *Urology* 2002;**60**:16–22.
52. Wong BK, Xu X, Yu S *et al.* Comparative disposition of [¹⁴C]ertapenem, a novel carbapenem antibiotic, in rat, monkey and man. *Xenobiotica* 2004;**34**:379–89.
53. Burkhardt O, Kumar V, Katterwe D *et al.* Ertapenem in critically ill patients with early-onset ventilator-associated pneumonia: pharmacokinetics with special consideration of free-drug concentration. *J Antimicrob Chemother* 2006;**59**:277–84.
54. Brink AJ, Richards GA, Schillack V *et al.* Pharmacokinetics of once-daily dosing of ertapenem in critically ill patients with severe sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2009;**33**:432–6.

-
55. Boyadjiev I, Boulamery A, Simon N *et al.* Penetration of Ertapenem into Muscle Measured by In Vivo Microdialysis in Mechanically Ventilated Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;**55**:3573–5.
56. Frasca D, Marchand S, Petitpas F *et al.* Pharmacokinetics of Ertapenem following Intravenous and Subcutaneous Infusions in Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**:924–6.
57. Dailly E, Arnould JF, Fraissinet F *et al.* Pharmacokinetics of ertapenem in burns patients. *Int J Antimicrob Agents* 2013;**42**:48–52.
58. Kratzer A, Liebchen U, Schleibinger M *et al.* Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: Impact of experimental conditions. *J Chromatogr B* 2014;**961**:97–102.
59. McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T *et al.* Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2010;**878**:2039–43.
60. Shin WG, Lee MG, Lee MH *et al.* Factors influencing the protein binding of vancomycin. *Biopharm Drug Dispos* 1991;**12**:637–46.
61. Hoek FJ. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 2003;**18**:2024–31.
62. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;**16**:31–41.
63. Roberts JA, De Waele JJ, Dimopoulos G *et al.* DALI: Defining Antibiotic Levels in Intensive care unit patients: a multi-centre point of prevalence study to determine whether contemporary antibiotic dosing for critically ill patients is therapeutic. *BMC Infect Dis* 2012;**12**:152.
64. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP *et al.* APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;**13**:818–29.
65. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993;**270**:2957–63.
66. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study.

Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998;**26**:1793–800.

67. Bone RC, Balk RA, Cerra FB *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;**101**:1644–55.

68. EUCAST: Clinical breakpoints (Version 5.0; Stand 01.01.2015). http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (aufgerufen am 18.02.2015).

69. Kratzer AL. Entwicklung und Erprobung von HPLC-basierten Methoden für das Therapeutische Drug-Monitoring von Betalaktam-Antibiotika, Linezolid und Tigecyclin–Bestimmung von freien und totalen Konzentrationen im Plasma von Intensivpatienten. 2016.

70. Pickering MK, Brown SD. Assays for determination of ertapenem for applications in therapeutic drug monitoring, pharmacokinetics and sample stability. *Biomed Chromatogr* 2014;**28**:1525–31.

71. Jin H-E, Jin S-E, Maeng H-J. Recent bioanalytical methods for quantification of third-generation cephalosporins using HPLC and LC-MS(/MS) and their applications in pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr* 2014;**28**:1565–87.

72. Zhang F, Xue J, Shao J *et al.* Compilation of 222 drugs’ plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov Today* 2012;**17**:475–85.

73. Burkhardt O, Hafer C, Langhoff A *et al.* Pharmacokinetics of ertapenem in critically ill patients with acute renal failure undergoing extended daily dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;**24**:267–71.

74. Sauermann R, Burian B, Burian A *et al.* Tissue pharmacokinetics of ertapenem at steady-state in diabetic patients with leg infections. *J Antimicrob Chemother* 2013;**68**:895–9.

75. Musson DG, Birk KL, Kitchen CJ *et al.* Assay methodology for the quantitation of unbound ertapenem, a new carbapenem antibiotic, in human plasma. *J Chromatogr B* 2003;**783**:1–9.

76. Majumdar AK, Musson DG, Birk KL *et al.* Pharmacokinetics of Ertapenem in Healthy Young Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**:3506–11.

77. Boselli E, Breilh D, Saux M-C *et al.* Pharmacokinetics and lung concentrations of ertapenem in patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2006;**32**:2059–62.
78. Breilh D, Fleureau C, Gordien JB *et al.* Pharmacokinetics of free ertapenem in critically ill septic patients: intermittent versus continuous infusion. *Minerva Anesthesiol* 2011;**77**:1058–62.
79. Spector R, Vernick R, Lorenzo AV. Effects of pressure on the plasma binding of digoxin and ouabain in an ultrafiltration apparatus. *Biochem Pharmacol* 1973;**22**:2485–2487.
80. Wiskirchen DE, Housman ST, Quintiliani R *et al.* Comparative pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of ertapenem 1 gram/day administered as a rapid 5-minute infusion versus the standard 30-minute infusion in healthy adult volunteers. *Pharmacotherapy* 2013;**33**:266–74.
81. Gordien J-B, Boselli E, Fleureau C *et al.* Determination of free ertapenem in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2006;**830**:218–23.
82. Whitlam JB, Brown KF. Ultrafiltration in serum protein binding determinations. *J Pharm Sci* 1981;**70**:146–50.
83. Kochansky CJ, McMasters DR, Lu P *et al.* Impact of pH on Plasma Protein Binding in Equilibrium Dialysis. *Mol Pharm* 2008;**5**:438–48.
84. Ponganis KV, Stanski DR. Factors affecting the measurement of lidocaine protein binding by equilibrium dialysis in human serum. *J Pharm Sci* 1985;**74**:57–60.
85. Keen PM. The Binding of Three Penicillins in the Plasma of Several Mammalian Species as Studied by Ultrafiltration at Body Temperature. *Br J Pharmacol Chemother* 1965;**25**:507–14.
86. Klotz IM, Urquhart JM, Weber WW. Penicillin-protein complexes. *Arch Biochem* 1950;**26**:420–35.
87. Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J *et al.* A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2012;**907**:178–84.
88. Schmidt S, Röck K, Sahre M *et al.* Effect of Protein Binding on the Pharmacological Activity of Highly Bound Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;**52**:3994–4000.

89. Smits A, Roberts JA, Vella-Brincat JWA *et al.* Cefazolin plasma protein binding in different human populations: More than cefazolin–albumin interaction. *Int J Antimicrob Agents* 2014;**43**:199–200.
90. Decroix MO, Zini R, Chaumeil JC *et al.* Cefazolin serum protein binding and its inhibition by bilirubin, fatty acids and other drugs. *Biochem Pharmacol* 1988;**37**:2807–2814.
91. Schleibinger M, Steinbach CL, Töpper C *et al.* Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in ICU patients. *Br J Clin Pharmacol* 2015, DOI: 10.1111/bcp.12636.
92. Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007;**151**:580–90.
93. Nadai M, Yoshizumi H, Kuzuya T *et al.* Effect of diabetes on disposition and renal handling of cefazolin in rats. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 1990;**18**:565–70.
94. Nadai M, Hasegawa T, Kato K *et al.* Alterations in pharmacokinetics and protein binding behavior of cefazolin in endotoxemic rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;**37**:1781–1785.
95. Eyler RF, Vilay AM, Nader AM *et al.* Pharmacokinetics of Ertapenem in Critically Ill Patients Receiving Continuous Venovenous Hemodialysis or Hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;**58**:1320–6.
96. Ulldemolins M, Roberts JA, Wallis SC *et al.* Flucloxacillin dosing in critically ill patients with hypoalbuminaemia: special emphasis on unbound pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother* 2010;**65**:1771–8.
97. Joynt GM, Lipman J, Gomersall CD *et al.* The pharmacokinetics of once-daily dosing of ceftriaxone in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 2001;**47**:421–9.
98. Mohr JF, Ostrosky-Zeichner L, Wainright DJ *et al.* Pharmacokinetic Evaluation of Single-Dose Intravenous Daptomycin in Patients with Thermal Burn Injury. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;**52**:1891–3.
99. Barbot A, Venisse N, Rayeh F *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sequential intravenous and subcutaneous teicoplanin in critically ill patients without vasopressors. *Intensive Care Med* 2003;**29**:1528–34.

-
100. McKinnon PS, Paladino JA, Schentag JJ. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUIC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 2008;**31**:345–51.
101. Huttner A, Harbarth S, Hope WW *et al.* Therapeutic drug monitoring of the β -lactam antibiotics: what is the evidence and which patients should we be using it for? *J Antimicrob Chemother* 2015;**70**:3178–83.
102. Wong G, Sime FB, Lipman J *et al.* How do we use therapeutic drug monitoring to improve outcomes from severe infections in critically ill patients? *BMC Infect Dis* 2014;**14**:1.
103. Tam VH, Schilling AN, Neshat S *et al.* Optimization of Meropenem Minimum Concentration/MIC Ratio To Suppress In Vitro Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;**49**:4920–7.
104. Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H. Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 2010;**99**:1107–22.
105. Chaurasia CS, Müller M, Bashaw ED *et al.* AAPS-FDA Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application and Regulatory Perspectives. *Pharm Res* 2007;**24**:1014–25.

8 Anhang

8.1 Case-report form (CRF)

<p>Qualitätssicherung der Diagnostik und Therapie akuter Infektionen in der Intensivmedizin Erhebungsbogen QSInf CRF 2013-01-23.docx</p>		<p>Bogennummer _____</p>
<p>Hier Patientenetikett einkleben</p>	<p>Bitte alle Seiten des Formulars mit der eindeutigen Bogennummer (rechts oben) beschriften.</p>	
<p>Therapietag 1:</p>		
<p>Tag 28:</p>		
<p>Diese Seite nach Abschluss (Tag 28) entfernen und entsorgen (Datenmüll)!</p>		
<p>QSInf CRF 2013-01-23.docx</p>		<p>Seite 1/7</p>

Qualitätssicherung der Diagnostik und Therapie akuter Infektionen in der Intensivmedizin

Erhebungsbogen QSIInf CRF 2013-01-23.docx

Bogennummer _____

Patientenmerkmale:

Geschlecht (m/w)	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Größe (cm)

Diagnose, die zur Krankenhausaufnahme führte:	Datum:
Diagnose, die zur Aufnahme auf der Intensivstation führte:	Datum:
Bei Aufnahme auf der Intensivstation – APACHE II:	SOFA:
Therapielimitierung: <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	
Teilnahme an einer Studie, die in infektiologische Diagnostik oder Therapie eingreift: <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	

Infektion:

Datum/Zeit der Diagnose:
Infektionsherd ¹⁾ :
Diagnostische Kriterien ²⁾ :
Diagnosesicherheit: <input type="checkbox"/> sicher <input type="checkbox"/> wahrscheinlich <input type="checkbox"/> unwahrscheinlich
Behandlungsdringlichkeit: <input type="checkbox"/> niedrig <input type="checkbox"/> mittel <input type="checkbox"/> hoch (keine oder unwirksame Therapie wäre lebensbedrohlich)
Sepsis: <input type="checkbox"/> Infektion <input type="checkbox"/> Sepsis <input type="checkbox"/> Schwere Sepsis <input type="checkbox"/> Septischer Schock
Infektiöse Episode: <input type="checkbox"/> Erste <input type="checkbox"/> Zweite <input type="checkbox"/> Dritte oder weitere dieses Aufenthalts
Komplexe Situation ³⁾ : <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja, nämlich
¹⁾ z. B. nosokomiale Pneumonie, sekundäre Peritonitis, Kathetersepsis, unbekannt – am ehesten pulmonal
²⁾ z. B. Leukozytose – eitriges Trachealsekret – Infiltrat rechter Unterlappen, intraoperativer Befund, Fieber - Rötung der Einstichstelle – positive Blutkultur, Fieber – Organdysfunktionen
³⁾ z. B. Verlegung von externem Krankenhaus nach längerem Verlauf, mehrfache Wiederaufnahme auf Intensivstation, mehrere verschiedene Infektionen

Besondere Risikofaktoren:

Antimikrobielle Vortherapie (welche?):	
Lange Hospitalisierungszeit (Tage):	Invasive Beatmung (Tage):
Bekannte Kolonisation: <input type="checkbox"/> MRSA <input type="checkbox"/> VRE <input type="checkbox"/> ESBL <input type="checkbox"/> <i>P. aeruginosa</i> <input type="checkbox"/> Sonstige:	
<input type="checkbox"/> Pflegeheim <input type="checkbox"/> Chronische Dialyse <input type="checkbox"/> Tracheostomaträger <input type="checkbox"/> Chronische Wunden	
<input type="checkbox"/> Diffuse Peritonitis <input type="checkbox"/> Postoperative Peritonitis <input type="checkbox"/> Harnwegsobstruktion/chron. Dauerkatheter/Doppel-J	
Chronische Nebenerkrankungen:	<input type="checkbox"/> Strukturelle Lungenerkrankung <input type="checkbox"/> Herzinsuffizienz <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus
	<input type="checkbox"/> metastasiertes Tumorleiden <input type="checkbox"/> Leberzirrhose <input type="checkbox"/> Niereninsuffizienz <input type="checkbox"/> chron. Dialyse
Immunsuppression:	<input type="checkbox"/> Chemotherapie vor Kurzem <input type="checkbox"/> Glucocortikoide <input type="checkbox"/> Neutropenie <input type="checkbox"/> Hämatologische Erkrankung
Schwere Erkrankung:	<input type="checkbox"/> Schock <input type="checkbox"/> lebensbedrohliche Organdysfunktionen <input type="checkbox"/> schwer sanierbarer Fokus

Qualitätssicherung der Diagnostik und Therapie akuter Infektionen in der Intensivmedizin

Erhebungsbogen QSIInf CRF 2013-01-23.docx

Bogennummer _____

Antinfektiöse Therapie (Antibiotikum/Antimykotikum):

Wirkstoff 1	Name	von
	Dosierung/Dosierungsschema	bis
	Ggf. Begründung	
Kreatinin-Clearance (ml/min): <input type="checkbox"/> gemessen <input type="checkbox"/> geschätzt <input type="checkbox"/> relev. Leberinsuffizienz <input type="checkbox"/> CVVHD <input type="checkbox"/> HD		
Beendet wegen: <input type="checkbox"/> Therapieende <input type="checkbox"/> Deeskalation <input type="checkbox"/> Unwirksamkeit <input type="checkbox"/> Nebenwirkung		Dosis total:

Wirkstoff 2	Name	von
	Dosierung/Dosierungsschema	bis
	Ggf. Begründung	
Kreatinin-Clearance (ml/min): <input type="checkbox"/> gemessen <input type="checkbox"/> geschätzt <input type="checkbox"/> relev. Leberinsuffizienz <input type="checkbox"/> CVVHD <input type="checkbox"/> HD		
Beendet wegen: <input type="checkbox"/> Therapieende <input type="checkbox"/> Deeskalation <input type="checkbox"/> Unwirksamkeit <input type="checkbox"/> Nebenwirkung		Dosis total:

Wirkstoff 3	Name	von
	Dosierung/Dosierungsschema	bis
	Ggf. Begründung	
Kreatinin-Clearance (ml/min): <input type="checkbox"/> gemessen <input type="checkbox"/> geschätzt <input type="checkbox"/> relev. Leberinsuffizienz <input type="checkbox"/> CVVHD <input type="checkbox"/> HD		
Beendet wegen: <input type="checkbox"/> Therapieende <input type="checkbox"/> Deeskalation <input type="checkbox"/> Unwirksamkeit <input type="checkbox"/> Nebenwirkung		Dosis total:

Wirkstoff 4	Name	von
	Dosierung/Dosierungsschema	bis
	Ggf. Begründung	
Kreatinin-Clearance (ml/min): <input type="checkbox"/> gemessen <input type="checkbox"/> geschätzt <input type="checkbox"/> relev. Leberinsuffizienz <input type="checkbox"/> CVVHD <input type="checkbox"/> HD		
Beendet wegen: <input type="checkbox"/> Therapieende <input type="checkbox"/> Deeskalation <input type="checkbox"/> Unwirksamkeit <input type="checkbox"/> Nebenwirkung		Dosis total:

Wirkstoff 5	Name	von
	Dosierung/Dosierungsschema	bis
	Ggf. Begründung	
Kreatinin-Clearance (ml/min): <input type="checkbox"/> gemessen <input type="checkbox"/> geschätzt <input type="checkbox"/> relev. Leberinsuffizienz <input type="checkbox"/> CVVHD <input type="checkbox"/> HD		
Beendet wegen: <input type="checkbox"/> Therapieende <input type="checkbox"/> Deeskalation <input type="checkbox"/> Unwirksamkeit <input type="checkbox"/> Nebenwirkung		Dosis total:

Wirkstoff 6	Name	von
	Dosierung/Dosierungsschema	bis
	Ggf. Begründung	
Kreatinin-Clearance (ml/min): <input type="checkbox"/> gemessen <input type="checkbox"/> geschätzt <input type="checkbox"/> relev. Leberinsuffizienz <input type="checkbox"/> CVVHD <input type="checkbox"/> HD		
Beendet wegen: <input type="checkbox"/> Therapieende <input type="checkbox"/> Deeskalation <input type="checkbox"/> Unwirksamkeit <input type="checkbox"/> Nebenwirkung		Dosis total:

Therapieende:	Klinischer Erfolg: <input type="checkbox"/> Heilung <input type="checkbox"/> Besserung <input type="checkbox"/> Versagen <input type="checkbox"/> Unbekannt
---------------	---

QSIInf CRF 2013-01-23.docx

Seite 3/7

Qualitätssicherung der Diagnostik und Therapie akuter Infektionen in der Intensivmedizin

Erhebungsbogen QSIInf CRF 2013-01-23.docx

Bogennummer _____

Relevante Mikrobiologie:

Material:	Abnahmedatum:	Ergebnis:

Klinische Entwicklung:

Therapietag:	-1 ⁴⁾	1 ⁵⁾	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Lebendig:	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>												
Intensivstation:	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>												
Normalstation:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nicht im KH:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Katecholamine:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inv. Beatmung:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RRT:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antibiotika:	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>												
SOFA:															
Therapietag:	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	Σ
Lebendig:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Intensivstation:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Normalstation:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nicht im KH:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Katecholamine:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inv. Beatmung:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RRT:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antibiotika:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SOFA:															xxx

4) Tag vor der Beginn der antibiotischen Therapie 5) 1. Tag der antibiotischen Therapie

Hygienerrelevante Befunde / Nachweis schwierig zu behandelnder Erreger⁶⁾:

Material:	Abnahmedatum:	Ergebnis:

⁶⁾ auch nicht-multiresistente Isolate von *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clostridium difficile*

Qualitätssicherung der Diagnostik und Therapie akuter Infektionen in der Intensivmedizin

Erhebungsbogen QSInf CRF 2013-01-23.docx

Bogennummer _____

TDM / Konzentrationskontrollen:

Antibiotikum:	Aktuelle Dosierung:	Datum:	Zeit nach letzter Gabe:	Konzentration:	Label:
					A
					B
					C
					D
					E
					F
					G
					H

Klinische Chemie (bis Behandlungsende, max. Tag 10):

Parameter	Tag -1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leukos (1/nl)											
CRP (mg/l)											
PCT (µg/l)											
Kreatinin (mg/dl)											

Qualitätssicherung der Diagnostik und Therapie akuter Infektionen in der Intensivmedizin

Erhebungsbogen QSInf CRF 2013-01-23.docx

Bogennummer _____

Antibiotikum 2 wurde gemäß Empfehlungen dosiert:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Antibiotikum 3 wurde gemäß Empfehlungen dosiert:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Antibiotikum 4 wurde gemäß Empfehlungen dosiert:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Antibiotikum 5 wurde gemäß Empfehlungen dosiert:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Antibiotikum 6 wurde gemäß Empfehlungen dosiert:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
TDM / Konzentrationsbestimmung A:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch
TDM / Konzentrationsbestimmung B:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch
TDM / Konzentrationsbestimmung C:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch
TDM / Konzentrationsbestimmung D:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch
TDM / Konzentrationsbestimmung E:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch
TDM / Konzentrationsbestimmung F:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch
TDM / Konzentrationsbestimmung G:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch
TDM / Konzentrationsbestimmung H:	<input type="checkbox"/> zu niedrig	<input type="checkbox"/> korrekt <input type="checkbox"/> zu hoch

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Uwe Liebchen
Geburtsdaten	22.09.1990 in Aschaffenburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
E-Mail	uweliebchen@web.de
Telefon	(+49)1575/4212715

Ausbildung

1997 - 2001	Grundschule Aschaffenburg
2001 - 2010	Kronberg Gymnasium Aschaffenburg, Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
10/2010 – 12/2016	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Erwerb der Approbation für Ärzte

8.3 Publikationsverzeichnis

Publikationen

Kratzer A, Liebchen U, Schleibinger M et al. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: Impact of experimental conditions. *J Chromatogr B* 2014;961:97–102.

Liebchen U, Kratzer A, Wicha SG et al. Unbound fraction of ertapenem in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:3108–11.

Schleibinger M, Steinbach CL, Töpfer C et al. Protein binding characteristics and pharmacokinetics of ceftriaxone in ICU patients. *Br J Clin Pharmacol* 2015, DOI: 10.1111/bcp.12636.

Töpfer C, Steinbach CL, Dorn C et al. Variable linezolid exposure in ICU patients-possible role of drug-drug interactions. *Ther Drug Monit* 2016, DOI: 10.1097/FTD.0000000000000324.

Posterbeiträge

Kratzer AL, Rothe U, Lang S, Salzberger B, **Liebchen U**, Kees F, Kees MG. Qualitätssicherung der Antibiotikatherapie im Intensivbereich durch Spiegelbestimmung von Betalaktam-Antibiotika. 73. ADKA-Kongress 2014 (Hamburg)

Liebchen U, Kratzer A, Wicha S, Kees F, Kees M. Protein binding of ertapenem in plasma from healthy volunteers and from ICU patients. ECCMID 2014 (Barcelona)

Alexander Kratzer, Christoph Töpfer, Catherine Steinbach, Michael Schleibinger, **Uwe Liebchen**, Ulrich Rothe, Frieder Kees, Bernd Salzberger, Martin Kees. Totale und freie Plasmakonzentrationen von Linezolid bei Intensivpatienten unter Routinebedingungen. P-E-G Bad-Honnef-Symposium 2015 (Königswinter)

Kratzer A, Murschauser A, Schleibinger M, **Liebchen U**, Kees M, Rothe U, Kees F. In vitro investigations on the atypical protein binding behaviour of tigecycline using ultrafiltration. ECCMID 2015 (Kopenhagen)

Schleibinger S, Kees M, Kratzer A, **Liebchen U**, Kees F, Häberle H. Multiple-dose pharmacokinetics of tigecycline during continuous renal replacement therapy. 25.04.2015-28.04.2015. ECCMID 2015 (Kopenhagen)

8.4 Publierte Originalarbeit

J Antimicrob Chemother 2014; **69**: 3108–3111
doi:10.1093/jac/dku226 Advance Access publication 23 June 2014

Unbound fraction of ertapenem in intensive care unit patients

Uwe Liebchen¹, Alexander Kratzer^{2,3}, Sebastian G. Wicha⁴, Frieder Kees⁵, Charlotte Kloft⁴ and Martin G. Kees^{4,6*}

¹Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauß Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; ²Hospital Pharmacy, University Hospital Regensburg, Franz-Josef-Strauß Allee 11, 93053 Regensburg, Germany; ³Department of Pharmaceutical Biology, University of Regensburg, Universitätsstr. 31, 93053 Regensburg, Germany; ⁴Department of Clinical Pharmacy and Biochemistry, Institute of Pharmacy, Freie Universität Berlin, Kelchstr. 31, 12169 Berlin, Germany; ⁵Department of Pharmacology, University of Regensburg, Universitätsstr. 31, 93053 Regensburg, Germany; ⁶Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Charité University Hospital Berlin - Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin, Germany

*Corresponding author. Tel: +49-30-8445-2731; Fax: +49-30-8445-4469; E-mail: martin.kees@charite.de

Received 13 March 2014; returned 30 April 2014; revised 21 May 2014; accepted 27 May 2014

Objectives: To determine unbound ertapenem concentrations in plasma and to describe the pharmacokinetics of unbound ertapenem in intensive care unit (ICU) patients.

Patients and methods: For assessing the influence of experimental conditions and for development of the ultrafiltration protocol, plasma from healthy volunteers was used. Concentrations of total and unbound ertapenem were determined by HPLC in 29 plasma samples from six ICU patients treated with 1 g of ertapenem once daily. The concentration–time courses were described by a one-compartment model. Ertapenem binding to albumin was assessed by Michaelis–Menten kinetics in solutions of human serum albumin, in plasma from healthy volunteers and in plasma from ICU patients.

Results: The unbound fraction (f_u) of ertapenem was highly susceptible to pH and temperature during ultrafiltration and was ~20% in plasma from healthy volunteers at clinically relevant concentrations. In ICU patients, f_u was substantially higher (range 30.9%–53.6%). The unbound concentrations of ertapenem exceeded 2 mg/L for 72% (median; range 39%–100%) of the 24 h dosing interval and 0.25 mg/L for 100% (range 79%–100%). The number of binding sites per albumin molecule was 1.22 (95% CI 1.07–1.38) in plasma from healthy volunteers and 0.404 (95% CI 0.158–0.650) in samples from ICU patients.

Conclusions: Determination of unbound ertapenem by ultrafiltration is susceptible to experimental conditions. When determined at physiological pH and temperature, f_u of ertapenem is 2- to 4-fold higher than previously reported and even higher in ICU patients. Binding studies indicate that hypoalbuminaemia alone does not explain these differences. This issue should be further investigated for its clinical relevance.

Keywords: protein binding, carbapenems, β -lactams, pharmacokinetics, pharmacodynamics

Introduction

In contrast to most β -lactams, the carbapenem antibiotic ertapenem is highly bound to plasma proteins, thus prolonging its half-life and allowing for once-daily dosing. However, this could be problematic in critically ill patients, who often are hypoproteinaemic and for whom important alterations of pharmacokinetics have been reported.¹ Accordingly, differing conclusions have been drawn concerning the adequacy of unbound ertapenem concentrations resulting from standard doses.^{2–4}

We have recently demonstrated the importance of experimental conditions during ultrafiltration of vancomycin.⁵ The objective of the present study was to adapt our protocol to the determination of ertapenem, to apply it to samples from intensive care unit

(ICU) patients and to investigate ertapenem binding to albumin *in vitro*.

Methods

Chemicals, ultrafiltration and drug assay

Ertapenem for injection (Invanz[®]) was obtained from InfectoPharm, Heppenheim, Germany. Human serum albumin (HSA; lyophilized powder) essentially fatty acid free was obtained from Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany.

Ertapenem was determined adapting a published HPLC–UV method (lower limit of quantification 0.10 mg/L).⁶ Prior to ultrafiltration, plasma (300 μ L) was buffered with 10 μ L of 3 M potassium phosphate buffer (pH 7.5). Ultrafiltration was performed for 20 min (up to 40 min at lower

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

3108

Unbound ertapenem in ICU patients

temperatures) at 37°C and 1000 g using Nanosep Omega 10K devices (VWR, Ismaning, Germany).

Plasma specimens and pharmacokinetic analysis

Plasma from healthy volunteers was used for development of the ultrafiltration method. The Ethics Committee of Charité University Hospital Berlin gave approval for anonymized analysis of remains of samples from ICU patients obtained in the course of their treatment and related clinical data (reference EA4/028/13). Patients or their legal representatives had consented to such use in the medical treatment contract. Demographic and laboratory data were collected from the patient files prior to anonymization.

The sampling times reflected the fact that this was not a specifically designed pharmacokinetic study. Timepoints were chosen to cover a reasonable range of the dosing interval for each patient, deliberately avoiding the initial phase after the end of infusion because these measurements may be less robust and would anyway not affect $f_{T>MIC}$.

The pharmacokinetics of total and unbound concentrations were analysed separately by fitting a one-compartment model (zero-order input, first-order elimination) with $1/y^2$ weighting using Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight/Certara, St Louis, MO, USA).

Exploratory binding studies

The protein binding of ertapenem (3–300 mg/L) *in vitro* was investigated in HSA solutions (3–100 g/L) and in pooled plasma from six healthy volunteers (38 g/L albumin). The concentrations of albumin and other proteins were varied by dilution with either isoosmotic phosphate buffer (IPB; pH 7.4) or 38 g/L HSA in IPB. Binding of ertapenem to albumin was described by Michaelis–Menten kinetics.

Statistical analysis

Prism 6.0d for MacOSX (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for calculating statistics and Michaelis–Menten kinetics. The mean \pm SD and/or median and range are given, as appropriate. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$ without correcting for multiple comparisons.

Results**Ultrafiltration**

Ertapenem (16 and 80 mg/L) was stable in plasma for ≥ 1 h at 37°C and for ≥ 8 h at 25°C or 6°C. No adsorption onto the filter device was observed (ertapenem 0.8–80 mg/L). In plasma spiked with ertapenem, f_u was significantly higher when centrifugation was performed at 1000 g compared with 10 000 g ($n = 5$ each; 16 mg/L: $19.2\% \pm 1.1\%$ versus $13.5\% \pm 1.2\%$, $P < 0.0001$; 80 mg/L: $23.2\% \pm 2.5\%$ versus $16.4\% \pm 1.2\%$, $P = 0.0005$; unpaired *t*-test). Temperature and pH had an even higher influence (Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online). From 5°C to 20°C, f_u was constant, but it was substantially higher at 37°C (16 mg/L, buffered, 37°C/20°C: $19.0\% \pm 0.85\%/11.0\% \pm 0.91\%$, $P = 0.0004$). In unbuffered plasma (pH before/after ultrafiltration 7.9/8.3), f_u was approximately halved compared with in buffered plasma (pH 7.3/7.5).

Clinical data and pharmacokinetics

In total, 29 samples from six ICU patients treated with 1 g of ertapenem once daily were collected. All patients showed moderate hypoalbuminaemia (24.0–30.6 g/L); further characteristics are provided in Table S1 (available as Supplementary data at JAC

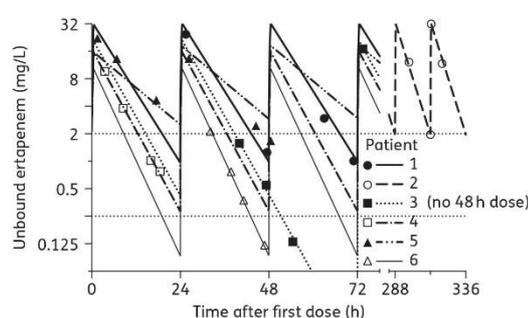


Figure 1. Observed unbound concentrations (symbols) and predicted concentration–time profiles (lines) of ertapenem in six ICU patients treated with 1 g once daily. For reference, the dotted horizontal lines indicate the MIC₉₀s of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (2 mg/L) and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (0.25 mg/L).²⁰

Online). Both total and unbound ertapenem concentrations were adequately described by a one-compartment model [Figure 1 and Table S2 (available as Supplementary data at JAC Online)]. The median (range) values for clearance, volume of distribution and half-life were 2.56 (1.69–6.67) L/h, 19.2 (14.8–36.2) L and 4.71 (3.76–6.52) h for total and 5.61 (3.84–15.1) L/h, 47.5 (30.4–71.0) L and 4.36 (3.25–8.15) h for unbound ertapenem, respectively. The median (range) f_u was 37.8% (30.9%–53.6%). The unbound concentrations exceeded 2 mg/L for a median 72% (39%–100%) of the dosing interval and 0.25 mg/L for 100% (79%–100%).

Exploratory binding studies

Binding of ertapenem to HSA showed no saturation within the investigated range and only n/k_d could be determined (where n is the number of binding sites and k_d is the dissociation constant). For HSA concentrations of 3–100 g/L, f_u (mean \pm SD; $n = 5$) decreased from $94\% \pm 1.5\%$ to $30\% \pm 0.45\%$, independent of the ertapenem concentration. In plasma from healthy volunteers, f_u was $\sim 20\%$ at total concentrations up to 30 mg/L and increased to $\sim 25\%$ at 100 mg/L and $\sim 40\%$ at 300 mg/L (Figure S2, available as Supplementary data at JAC Online). After stepwise dilution with IPB, f_u increased but remained unchanged when 38 g/L HSA in IPB was added. The results of the Michaelis–Menten kinetic analysis are shown in Figure 2 and Table S3 (available as Supplementary data at JAC Online). The fitted curves for these two groups were not statistically different (extra sum-of-squares *F*-test) and therefore pooled for comparison with the patient samples, which formally proved the difference of the binding characteristics ($P < 0.0001$). In particular, the number of binding sites per albumin molecule was 1.22 (95% CI 1.07–1.38) in plasma from healthy volunteers and only 0.404 (95% CI 0.158–0.650) in plasma from ICU patients.

Discussion

Ultrafiltration is a convenient method to determine unbound drug concentrations. In 2003, Musson *et al.*⁷ described an ultrafiltration

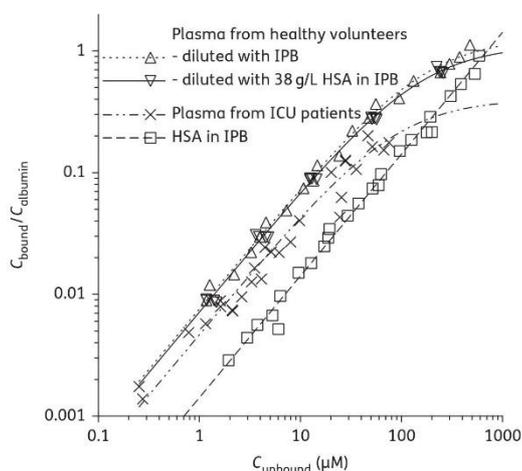
Liebchen *et al.*

Figure 2. Graphical illustration of the Michaelis–Menten kinetic analysis of ertapenem binding to albumin in plasma from healthy volunteers (38 g/L albumin), from ICU patients and in solutions of HSA in IPB. Albumin and total protein concentrations in plasma from healthy volunteers were varied by dilution with IPB with or without 38 g/L HSA. C_{bound} , C_{unbound} and C_{albumin} correspond to the molar concentrations of bound ertapenem, unbound ertapenem and albumin, respectively.

protocol for ertapenem, which included centrifugation of unbuffered plasma in a Centrifree device at 1500 *g* at room temperature. Others modified this technique, varying filter types, centrifugal force or temperature.^{8,9} Equilibrium dialysis is time-consuming and possibly problematic for unstable drugs, but was applied in a recent study on ertapenem during continuous renal replacement therapy.¹⁰ Some groups used mathematical models or fixed percentages,^{4,11} which carry along potential problems of the technique used to establish these data.

Our data clearly demonstrate a strong effect of pH and temperature on the results of ultrafiltration. Whereas ultrafiltration of unbuffered samples at room temperature reproduced the f_u value reported by Majumdar *et al.*¹² and stated in the summary of product characteristics (5%–8%), application of physiological conditions resulted in 2- to 4-fold higher values. High centrifugal forces shorten ultrafiltration time but cause pressure artefacts.^{5,13} These aspects have been described many years ago.^{14–16}

Michaelis–Menten kinetics of the binding of ertapenem to albumin revealed important differences between HSA solutions, plasma from healthy volunteers and plasma from ICU patients. In HSA solutions, binding was linear throughout the investigated concentration ranges whereas it was non-linear and higher in plasma, as if additional binding partners existed. However, binding to albumin was identical whether all plasma components including albumin were diluted or when albumin was kept constant, ruling out alternative binding partners. The binding in plasma samples from ICU patients could be described with less precision (also due to the pooled analysis), but was distinctly lower than in diluted plasma from healthy volunteers. In conclusion, (i) albumin is the only relevant binding partner for ertapenem, but (ii) its

binding properties are affected by other plasma components and (iii) plasma from ICU patients is not just diluted ‘healthy’ plasma.

These phenomena are likely to be complex. Fatty acids, calcium ions or its redox state have been reported to induce conformational changes of albumin, which enhance or diminish protein binding, depending on the substance.^{17,18} In plasma from ICU patients, the frequent presence of other highly protein-bound drugs (e.g. sedatives) might have a role. Certainly, there is more to altered protein binding of ertapenem (and presumably other drugs) in severely ill patients than hypoalbuminaemia.

Compared with data from healthy volunteers, both the volume of distribution and clearance of total ertapenem in our study were increased ~2-fold, whereas the mean half-life was nearly unchanged.¹² These findings are consistent with data from patients with ventilator-associated pneumonia or severe sepsis.^{3,4} As for unbound concentrations, our values are similar to those determined in eight patients with severe sepsis.³ Although not stated explicitly, a mean f_u of ~55% can be calculated from the AUC of total and unbound ertapenem.³ In patients on continuous renal replacement therapy, the f_u of ertapenem was determined by equilibrium dialysis to be 20%–40%.¹⁰ Similar to our results (30.9%–53.6%), these are multiples of 5%–8% which have been reported in healthy volunteers.¹² Such a different protein binding explains severely altered pharmacokinetics and has a strong impact on the interpretation of PK/PD indices when unbound concentrations are estimated from total concentrations and reported f_u .^{4,11,19}

One limitation of our study must be acknowledged. We cannot claim that our results reflect the true unbound concentrations *in vivo*. At best, they are closer to reality, as ultrafiltration was performed mimicking physiological conditions. Validation could be done by linking unbound concentrations to pharmacodynamics or pharmacokinetics,⁵ but this would require more data.

To summarize, we demonstrated that determination of unbound plasma concentrations of ertapenem by ultrafiltration is susceptible to experimental conditions. Mimicking physiological conditions, we found higher unbound concentrations in plasma from healthy volunteers than previously reported and these were even higher in samples from ICU patients, providing reasonable exposure to free drug with standard dosing. Our results suggest influences beyond hypoalbuminaemia in ICU patients.

Acknowledgements

Part of this work was presented as a poster at the Twenty-fourth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 2014 (P1741).

Funding

This work was funded by institutional sources only.

Transparency declarations

U. L. received a travel grant from InfectoPharm, Heppenheim, Germany. All other authors: none to declare.

Supplementary data

Figures S1 and S2 and Tables S1 to S3 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- 1 Udy AA, Roberts JA, Lipman J. Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in the critically ill. *Intensive Care Med* 2013; **39**: 2070–82.
- 2 Boselli E, Breilh D, Saux M-C et al. Pharmacokinetics and lung concentrations of ertapenem in patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2006; **32**: 2059–62.
- 3 Brink AJ, Richards GA, Schillack V et al. Pharmacokinetics of once-daily dosing of ertapenem in critically ill patients with severe sepsis. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **33**: 432–6.
- 4 Burkhardt O, Kumar V, Katterwe D et al. Ertapenem in critically ill patients with early-onset ventilator-associated pneumonia: pharmacokinetics with special consideration of free-drug concentration. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 277–84.
- 5 Kees MG, Wicha SG, Seefeld A et al. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. *J Clin Pharmacol* 2014; **54**: 318–23.
- 6 McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T et al. Analysis of 12 β -lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2010; **878**: 2039–43.
- 7 Musson DG, Birk KL, Kitchen CJ et al. Assay methodology for the quantitation of unbound ertapenem, a new carbapenem antibiotic, in human plasma. *J Chromatogr B* 2003; **783**: 1–9.
- 8 Wiskirchen DE, Housman ST, Quintiliani R et al. Comparative pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of ertapenem 1 gram/day administered as a rapid 5-minute infusion versus the standard 30-minute infusion in healthy adult volunteers. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 2013; **33**: 266–74.
- 9 Gordien JB, Boselli E, Fleureau C et al. Determination of free ertapenem in plasma and bronchoalveolar lavage by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 2006; **830**: 218–23.
- 10 Eyler RF, Vilay AM, Nader AM et al. Pharmacokinetics of ertapenem in critically ill patients receiving continuous venovenous hemodialysis or hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 1320–6.
- 11 Sauermann R, Burian B, Burian A et al. Tissue pharmacokinetics of ertapenem at steady-state in diabetic patients with leg infections. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 895–9.
- 12 Majumdar AK, Musson DG, Birk KL et al. Pharmacokinetics of ertapenem in healthy young volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3506–11.
- 13 Spector R, Vernick R, Lorenzo AV. Effects of pressure on the plasma binding of digoxin and ouabain in an ultrafiltration apparatus. *Biochem Pharmacol* 1973; **22**: 2486–7.
- 14 Whitlam JB, Brown KF. Ultrafiltration in serum protein binding determinations. *J Pharm Sci* 1981; **70**: 146–50.
- 15 Ponganis KV, Stanski DR. Factors affecting the measurement of lidocaine protein binding by equilibrium dialysis in human serum. *J Pharm Sci* 1985; **74**: 57–60.
- 16 Keen PM. The binding of three penicillins in the plasma of several mammalian species as studied by ultrafiltration at body temperature. *Br J Pharmacol Chemother* 1965; **25**: 507–14.
- 17 Zeitlinger MA, Derendorf H, Mouton JW et al. Protein binding: do we ever learn? *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3067–74.
- 18 Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007; **151**: 580–90.
- 19 Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 2010; **99**: 1107–22.
- 20 Livermore DM, Sefton AM, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 331–44.

9 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger möchte ich mich für die Überlassung des Themas, die Übernahme der Erstgutachterschaft sowie die Diskussions- und Hilfsbereitschaft in verschiedenen Phasen meiner Promotion und meines Studiums bedanken. Seine wertvollen Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2013 bis April 2016 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Frieder Kees. Ihm gilt mein aufrichtiger Dank für die Übernahme der Zweitgutachterschaft, die Geduld im Labor und das große Engagement, welches er mir in allen Bereichen entgegengebracht hat. Danken möchte ich ihm auch für seine Rücksichtnahme auf andere Lebensbereiche und die harmonische Zusammenarbeit. Die zahlreichen Gespräche und Anregungen werden mir als bereichernder Austausch in Erinnerung bleiben.

Herrn Dr. Martin Kees danke ich für die Durchführung des QSInf-Projektes und die Möglichkeit, daran mitwirken zu dürfen, für die Überlassung von klinischen Proben und für die Berechnung von pharmakokinetischen Parametern. Die kluge, zielstrebige und produktive Arbeitsweise empfand ich als inspirierend.

Ich danke auch meinen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die konstruktive Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hier Michael Schleibinger und Dr. Alexander Kratzer. Insbesondere die Ausarbeitung des Material- und Methodenteils konnte teilweise gemeinsam bewerkstelligt werden, da es sich bei den einzelnen Arbeiten um Teile einer größer angelegten Studie handelte.

Bei Herrn Prof. Dr. Jens Schlossman möchte ich mich für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl sowie die Überlassung von Büro- und Laborraum bedanken.

Für ihre tatkräftige Unterstützung in allen Fragen des Laboralltags danke ich den technischen Assistentinnen Astrid Seefeld und Gertraud Willberg herzlich.

Nicht zuletzt danke ich herzlichst meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung und ihr Interesse während der Entstehung dieser Arbeit.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Uwe Liebchen