Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung von ¹³CO₂ Entstehung, Verteilung und Ausscheidung zur verbesserten Interpretation der Ergebnisse beim ¹³C-Methacetin Atemtest zur Messung der enzymatischen Leberfunktion

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Pouria Taheri

aus Teheran

Datum der Promotion 25.06.2017

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Abs	trakt	6
2.	Abs	tract	7
3.	Einl	eitung	8
	3.1.	Klinische Bedeutung nicht-invasiver Atemtests	
	3.1.1		
	3.1.2		
	3.1.3	. Messung der Leberfunktion	11
	3.1.4	Der LiMAx-Test	14
3	3.2.	Auswertungs- und Interpretationsprobleme	15
3	3.3.	Einflussfaktoren in der Praxis	17
	3.3.1	. Substratpharmakokinetik	17
	3.3.2	. Bedeutung von Kohlendioxid- und Bikarbonatkinetik	18
3	3.4.	Mögliche Bedeutung für nicht-invasive Atemtests	24
4.	Frag	gestellung	26
	۰۰۰. ۱.1.	¹³ CO ₂ -Abatmungskinetik nach ¹³ C-Methacetininjektion	
	l.2.	Pharmakokinetik von Substrat und Produkt im Serum	
4	ł.3.	Reproduzierbarkeit der Messergebnisse	
4	l.4.	Körperliche Belastung zur Erhöhung der CO ₂ Produktionsrate	
5.	Mot	hoden	
	меі 5.1.	Studienablauf	
ī	5.1. 5.1.1		
	5.1.1 5.2.	Probandenkollektiv	
	5.2. 5.3.	13C-Methacetin Atemtest	
•	5.3.1		
	5.3.2		
	5.3.3	O Company of the comp	
	5.3.4		
	5.4.	Untersuchung der Pharmakokinetik im Serum	
	5.5.	Körperliche Belastung zur Erhöhung der CO ₂ -Produktionsrate	
	5.6.	Statistische Auswertung	
		· ·	
6.	_	ebnisse	
(5.1 .	13CO ₂ -Abatmungskinetik	42

(6.1.2	1.	Kurvenverlauf	42
(6.1.2	2.	Reproduzierbarkeit	46
(6.1.3	3.	Dosisabhängigkeit	50
6.2	2.	Sub	stratpharmkokinetik von ¹³ C-Methacetin im Serum	54
(6.2.2	1.	Kurvenverlauf	54
(6.2.2	2.	Reproduzierbarkeit	57
(6.2.3	3.	Dosisabhängigkeit	59
6.3	3.	Pro	duktpharmakokinetik von Paracetamol im Serum	62
(6.3.2	1.	Kurvenverlauf	62
(6.3.2	2.	Reproduzierbarkeit	64
(6.3.3	3.	Dosisabhängigkeit	66
6.4	ŀ.		ammenfassender Vergleich der Kinetiken	
6.5	5.	Ein	fluss von erhöhter CO ₂ Produktion	71
7.]	Dis	kuss	ion	76
7.1	l.	Dis	kussion der Methode	77
7.2	2.	Dis	kussion der Ergebnisse	79
•	7.2.2		DOB	
,	7.2.2	2.	Methacetin-Kinetik	82
•	7.2.3	3.	Paracetamolkinetik	83
•	7.2.4	1.	Einfluss CO ₂ -Produktion	83
•	7.2.5	5.	Limitationen der Studie	84
7. 3	3.	Klii	nische Bedeutung der Ergebnisse	85
7.4	ŀ.	Abs	chließende Schlussfolgerungen	87
8. 2	Zus	amr	nenfassung	89
8.1			leitung	
8.2	2.		hoden	
8.3	3.	Erg	ebnisse	89
8.4	ŀ.		lussfolgerungen	
9.]	I ita	noti	ırverzeichnis	01
7. 1	LILE	all	n vei zeichins	
10 . <i>A</i>	Abb	ildu	ingsverzeichnis	102
11. '	Tab	elle	nverzeichnis	105
12.]	Leb	ens	auf	106
13. 1	Puk	lika	tionen	111

14.	Eidesstattliche Versicherung	.112
15.	Danksagung	.114

1. Abstrakt

¹³C-Atemtests klinisches Potential haben ein großes zur nicht-invasiven Leberfunktionsmessung. Trotz zahlreicher erfolgreicher klinischer Studien fehlt es weiterhin an einer genauen Charakterisierung der Abatmungs- und Substratpharmakokinetik sowie der Reproduzierbarkeit des Atemtestes. In einer prospektiv klinischen Studie wurden gesunde Probanden mehrfach mit intravenös appliziertem ¹³C-Methacetin in unterschiedlichen Dosierungen und Umständen untersucht. Bestimmt wurden die ¹³CO₂-Abatmungskinetik (delta-over-baseline; DOB in %), sowie die Pharmakokinetik von ¹³C-Methacetin und Paracetamol (mg/l) im Serum. Ein Teil der Messungen erfolgten unter Belastung auf dem Fahrradergometer, um den Einfluss einer erhöhten CO₂ Produktion zu untersuchen. Insgesamt wurden 21 freiwillige Probanden ausgewertet. Für den Test wurde den Probanden 2 bzw. 4 mg/kg Körpergewicht (KG) ¹³C-Methacetin intravenös injiziert. Im Rahmen der Studie kam es zu keinen Nebenwirkungen oder Laborwertveränderungen. Eine Minute nach Injektion von 2 mg/kg ¹³C-Methacetin kam es bei allen Probanden zu einem raschen Anstieg des DOB. Das Maximum wurde nach 4-11 Minuten erreicht. Die doppelte Dosierung des Substrats ergab eine ungefähre Verdoppelung der DOB Werte. Die körperliche Belastung bei der Dosierung von 2 und 4 mg/kg KG führte zu erheblichen Veränderungen der DOB Kinetik im Vergleich zu Messungen in Ruhe. Der Serumspiegel von ¹³C-Methacetin bei einer Dosierung von 2 mg/kg KG zeigte innerhalb von 10 Minuten einen raschen Abfall. Es zeigte sich kein Einfluss auf den Serumspiegel bei der wiederholten ¹³C-Methacetin Gabe innerhalb von 2 Tagen. Nach Injektion von 4 mg/kg KG ergab sich eine identische ¹³C-Methacetin Substratpharmakokinetik wie bei 2 mg/kg KG. Paracetamol zeigte einen raschen Nachweis im Serum innerhalb der ersten Minuten bis zum Erreichen eines konstanten Plateaus. Der Einfluss von körperlicher Belastung im Zeitraum 50.-60. Minute hat einen Effekt auf die DOB Kinetik als Zeichen für den wichtigen Effekt des Bikarbonatpools. Bei den Messungen unter kontinuierlicher körperlicher Belastung zeigte sich bei allen Dosierungen eine andere DOB Kinetik als bei den Messungen in Ruhe. Die vorliegende Studie konnte erstmals pharmakokinetische Charakteristika des ¹³C-Methacetin Atemtests beschreiben. Die Maximaspiegel der Abbauprodukte (DOBmax) korrelieren eng mit dem schnellen Substratabbau im Serum und sind ein zuverlässiger und reproduzierbarer Parameter. Die neue Methodik des LiMAx-Tests, der als zentralen Parameter das DOB Maximum nutzt, ist daher eine geeignete Methode, um zuverlässige Messwerte der Leberfunktionskapazität zu erhalten.

2. Abstract

¹³C-breath tests have a high clinical potential for non-invasive functional liver testing. Despite numerous successful clinical studies, there is still a lack of a precise characterisation in breath and substrate pharmacokinetics as well as in reproducibility. In a prospective clinical study, healthy volunteers were examined multiple times with intravenous application of ¹³Cmethacetin in various dosages and circumstances. We analysed ¹³CO₂-breath kinetics (deltaover-baseline; DOB in ‰), as well as the ¹³C-methacetin und paracetamol (mg/l) kinetics in blood. A part of the tests were performed under physical stress to understand the role of increased CO₂ production. 21 volunteers were analysed. We injected ¹³C-methacetin in different dosages. Side effects or abnormal laboratory results could not been seen while performing the analysis. One minute after the injection of 2 mg/kg body weight (BW) of ¹³Cmethacetin, we observed in every volunteer a fast increase of ¹³C-output in breath. Maximum level was reached after approximately 4-11 minutes. Dose duplication resulted in duplication of DOB values. Physical stress with a dosage of 4 mg/kg BW had the same effect on the kinetics of DOB as in 2 mg/kg BW. ¹³C-methacetin levels in serum with a dosage of 2 mg/kg BW showed a rapid decrease within 10 minutes. There was no significant influence of repetitive ¹³C-methacetin administration after 2 days. After intravenous application of 4 mg/kg BW, we determinded identical ¹³C-methacetin kinetics in serum as with 2 mg/kg BW. Paracetamol shows quick evidence in serum within the first minutes until it reaches a constant level. The influence of physical stress within the 50.-60. minute has merely an effect on the kinetics of DOB as a sign for the importance and effect the bicarbonatpool contains in ¹³Crelated, non-invasive breath tests. In the measurements with continous physical stress we noticed a completely different kinetics of DOB in comparison to the previous tests in physical tranquillity. For the first time, this present study described important pharmacokinetical characteristics of the ¹³C-methacetin breath test. The maximum level of the certain metabolite (DOBmax) correlates closely with the fast metabolisation of the substrate in serum. Therefore, it is a reliable and reproducable parameter. With the new method of the LiMAxtest, which uses DOBmax as their central parameter in the assay, we have a significant tool that provides reliable data concerning accurate determination of functional liver capacity.

3. Einleitung

3.1. Klinische Bedeutung nicht-invasiver Atemtests

3.1.1. Entwicklungsgeschichte

Mediziner haben schon zu Zeiten der griechischen Antike herausgefunden, dass der Atem Ihrer Patienten Ihnen entscheidende Informationen bzgl. Ihres Leidens geben kann. Im 18. Jahrhundert erkannte und bewies Antoine Lavoisier in Frankreich, dass der Atem Kohlenstoffdioxid (CO₂) enthält.(1) Im 19. Jahrhundert entwickelten Chemiker Atemtests zur Bestimmung von Alkohol und auch für Azeton, welches bei Diabetes mellitus in der Abatemluft erhöht ist.(1)

Die Entwicklung von Atemtests vom wissenschaftlichen Gegenstand zur klinischen Anwendung nimmt mittlerweile eine jahrzehntelange Geschichte ein. Durch Dodds et al. wurde 1920 die erste Arbeit mit der Bestimmung des Kohlendioxidpartialdruckes nach der Einnahme einer Mahlzeit erstmalig durchgeführt (2, 3) In den 60er Jahren wurde das Prinzip von Atemtest durch die Arbeiten von Schwabe et al. Und Abt et al. wieder aufgenommen. (2, 4, 5)1971 demonstriert der mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Chemiker Linus Pauling, dass der menschliche Atem ein komplexes Gas ist, welches aus mehr als 200 verschiedenen, flüchtigen, organischen Verbindungen in picomolarer Konzentration besteht.(6) Manche dieser Verbindungen dienen heute als Marker von Erkrankungen und mehr als 3000 Gase sind nun als Bestandteil der Atemluft identifiziert worden.(7)

Die sogenannten nicht-invasiven Atemtests beruhen darauf, dem Patienten ein spezifisches Substrat zu verabreichen, welches zumeist mit einem Isotop markiert ist. Durch die Spezifität der unterschiedlichen Substrate kann man verschiedene Organsysteme bzw. Organfunktionen, oder auch bestimmte Infektionen (Stoffwechsel der Erreger), nachweisen. (siehe unten) Die Ausscheidung des Isotops wird dann in der Atemluft, dem Blut oder Urin nachgewiesen. (8-10) (2)

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Interpretation von Atemtests, die Kohlenstoffmarkierte Substrate verwenden. Die ersten Tests mit ¹³C-basierenden Atemtests sind schon in den 30'er Jahren durchgeführt worden.(11) In den darauffolgenden 40'er und 50'er Jahren basiert die Forschung mit weiterführenden Arbeiten (bspw. Kinetikstudien) mehr auf den radioaktiv markierten Isotopen. Einsatzgebiete dieser sind u.a. die Prüfung der exokrinen Pankreasfunktion. Es stellt sich jedoch heraus, dass sie aufgrund der Halbwertszeit des

Markers (i. d. F. 5730 Jahre) sowie der Kinetik der Kohlenstoff-Eliminierung nicht praktikabel sind.(12, 13) Die Nichtradioaktivität des Markers ¹³C spielt eine wichtige Rolle, da hierdurch wiederholte Anwendungen ohne Risiko ermöglicht werden.

In den 70'er Jahren findet eine Wiederbelebung der nicht-radioaktiven, stabilen Isotopen statt. Die umfangreiche Verfügbarkeit der ¹³C-markierten Substrate ist dabei von Vorteil. Der erste Test mit ¹³C-Glukose wurde 1973 beschrieben.(14) In den 80er Jahren konnte der Zusammenhang von Substratpharmakokinetik und Abatmung Relation von Syntheseleistungen des Körpers gestellt werden.(15) Diese Arbeit ebnete den Weg für die ¹³C-Methacetin. wie Trägerstoffen Messungen Bestimmung Massenspektrometern statt, die jedoch als unpraktisch und kostspielig gelten. Durch die wegweisenden Arbeiten von den Arbeitsgruppen um Braden et al. 1994 ,Koletzko et al. 1995 und Götze et al. 1998 konnte der Ersatz der teuren und großen Massenspektrometer durch die kleinere und kostengünstigere nicht-dispersive, Isotop-selektive Infrarot-Spektroskopie (NDIRS) eingeleitet werden. (2, 16, 17) Diese Methodik wird immer stärker von Forschungsgruppen in Bereichen wie Nahrungsmittel-, Veterinär- sowie in Humanmedizinischen Forschung genutzt.(2, 18-21) Sie ist eine deutlich preisgünstigere und in der technischen Handhabung weniger anspruchsvolle Lösung mit ausreichender Genauigkeit.(2, 12, 22) Dennoch ist verschiedenen Arbeitsgruppen, wie bspw. der von Götze et al. aufgefallen, dass die Testergebnisse ungenau sein können und so die Weiterentwicklung der Technik vorangetrieben werden muss (2, 23) Die FLIP-Methode (fast-liver-investigated packet) ist ebenfalls als solche zu sehen und sollte eine genauere Bestimmung der Werte darstellen.(24, 25) Sie ist eine Echtzeitbestimmung der Gase in der Ausatemluft, die basierend auf einer Nanosekundenabsorptionsspektroskopie entstehen und so genaue und akkurate Werte abbilden.

Die Methodik zieht einen immer weiteren Kreis bzgl. ihres diagnostischen Spektrums, um eine noch genauere Beurteilung von Präsenz oder Fehlen von ätiologisch signifikanten Veränderungen im Metabolismus bestimmen zu können, sei es durch eine bestimmte Erkrankung oder des Fehlens eines spezifischen Enzyms (siehe unten).

Auch der Verlauf von Erkrankungen und das Abschätzen von Schweregraden wird durch die nicht-invasiven Atemtests unterstützt.(26) Darauf basierend, dass das ¹³C-Kohlendioxid von genau dem und nur diesem zu untersuchenden Zielenzym gespalten wird, gelingt dieses in einen eigenständigen, metabolischen Signalweg, was in der Abgabe von ¹³C-Kohlendioxid in die Abatemluft resultiert.(1, 9)

Durch die patientenfreundliche, nicht-invasive Diagnostik, die die quantitative in vivo Untersuchung von Enzymaktivität, Organfunktionen und Transportvorgängen erlaubt, können diese Tests eine bedeutende Rolle in der klinischen Diagnostik spielen.(27) Dementsprechend besitzen nicht-invasive Atemtests ein ausgesprochenes Wachstumspotential und werden in Zukunft immer zahlreicher in der Routinediagnostik zum Einsatz kommen.(12, 28)

3.1.2. Aktuelle Einsatzgebiete

Zahlreiche ¹³C-Atemtests kommen schon heute in der klinischen Routine zum Einsatz. Der häufigste Test wird zur Diagnostik von Infektion der Magenschleimhaut durch Helicobacter pylori mittels markiertem Harnstoff durchgeführt.(29) Andere Tests untersuchen die Darmmotilität (Oktansäure u.a.)(30), die Funktion der Bauchspeicheldrüse (Triglyceride, Hioleine u.a.)(31) oder der verschiedenen Stoffwechselsysteme der Leber (Methacetin u.a.)(32, 33).

Alle diagnostisch genutzten ¹³C-Atemtests beruhen auf demselben Grundprinzip: Nach oraler oder intravenöser Applikation einer mit dem stabilen Kohlenstoffisotop ¹³C-markierten Substanz wird deren Metabolisierung anhand der ¹³CO-Anreicherung in der Atemluft beobachtet. (2, 10) Dazu werden in bestimmten zeitlichen Intervallen Atemproben gesammelt und analysiert. Den Atemtests liegt die Hypothese zugrunde, dass neben dem untersuchten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt alle anderen Stoffwechselvorgänge vernachlässigbar schnell, oder zumindest zeitlich konstant ablaufen.(12) Je nach Wahl des geeigneten ¹³Cmarkierten Substrats lassen sich Transport und Verdauungsvorgänge, Resorptions- und Oxidationsprozesse oder (bakterielle) enzymatische Aktivitäten analysieren.(8) Die Markierung der Substanz besteht dabei meist aus einem schweren Kohlenstoffatom der funktionellen Gruppe (z.B. stabile Isotop 13C). Die Methodik der Atemtests basiert auf der enzymatischen Umwandlung einer an ¹³C-markierten Substanz zu einem Metaboliten und ¹³CO₂. Das Prinzip des in dieser Arbeit beschriebenen nicht-invasiven ¹³C-Methacetin Atemtests beruht auf der enzymatischen Umwandlung in einem Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) abhängigen Schritt von ¹³C-Methacetin zu Paracetamol (Acetaminophen) und ¹³CO₂. (2) Inzwischen steht eine Vielzahl ¹³C-markierter Testsubstanzen für verschiedene diagnostische Fragestellungen zur Verfügung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der nichtinvasiven ¹³C-Atemtests

Organ	Indikation	Substrat	Target-Enzym	Ref.
Magen	Helicobacter-pylori Nachweis	¹³ C-Harnstoff	bakt. Urease	(34-36)
	Magenentleerung	¹³ C-Octanoat ¹³ C-Acetat	hepatische Oxidierung	(37-40)
Leber	Leberfunktion	¹³ C-Methacetin ¹³ C-Aminopyrin ¹³ C-Galaktose ¹³ C-Phenacetin ¹³ C-Phenylalanin ¹³ C-Erythromycin ¹³ C-Coffein ¹³ C-Methionin	hepatische mikrosomale Dealkylierung Cytochrom P450	(23, 41- 45)
Pankreas	Exokrine Pankreasfunktion	¹³ C-gemischte Triglyzeride ¹³ C-Triolein ¹³ C-Tripalmitin ¹³ C-Hiolein ¹³ C-Cholesterinoctanoat ¹³ C-Protein ¹³ C-Stärke	Lipase Cholesterinase Trypsin Amylase	(46-49)
GI- Trakt	Resorption	¹³ C-Palmitinsäure ¹³ C-Olein		(50, 51)
	Orozäkale Transitzeit	¹³ C-Lactoseureid	bakterielle Hydrolasen/ Ureasen	(52)
	Kohlenhydrat- Assimilation	¹³ C-Lactose ¹³ C-Fructose ¹³ C-Glucose ¹³ C-Stärke ¹³ C-Saccharose		(53-55)
	Bakterielle Überwucherung	z.B. 13C-Glykocholat		(56)

3.1.3. Messung der Leberfunktion

In dieser Arbeit möchte ich mich auf die Messung der Leberfunktion konzentrieren. Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, gibt es eine Vielzahl an Atemtests für die Untersuchung der enzymatischen/metabolischen Leberfunktion im Vergleich zu anderen Erkrankungen. Hierin

zeigt sich indirekt, wie schwierig es ist, die tatsächliche Leberfunktion quantitativ zu bestimmen.

Die Leber ist das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels und die größte Drüse des Körpers. Die wichtigsten Aufgaben sind die Produktion lebenswichtiger Eiweißstoffe (z. B. Gerinnungsfaktoren), Verwertung von Nahrungsbestandteilen (z. B. Speicherung von Glukose und Vitaminen), die Gallenproduktion und damit einhergehend der Abbau und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen.

In den letzten 20 Jahren wurden spezifische Tests entwickelt, um die zytosolische (57), mikrosomale (respektive Cytochrome P450 Enzym) (58) und auch mitochondrielle (59) Enzymsysteme in den Hepatozyten bestimmen zu können. Insgesamt konnte bisher keiner dieser Tests eine überlegene diagnostische Wertigkeit herstellen. Daher spielen nichtinvasive Atemtests in der klinischen Leberdiagnostik noch keine relevante Rolle.(60, 61) Eine weitere, eingehende Evaluierung und Interpretation der unterschiedlichen Testmethoden ist notwendig, um dem Goldstandard der invasiven Leberbiopsie, Konkurrenz zu machen.(28)

3.1.3.1. Qualitative Abschätzung der Leberfunktion

Störungen der Leberfunktion sind aufgrund der ausgeprägten Funktionsreserve der Leber nicht unmittelbar klinisch erkennbar. Erst bei schwerstgradigen Funktionseinschränkungen kommt es zu den klassischen Symptomen der Leberzirrhose, bzw. des Leberversagens. Darunter fallen u.a. Aszites, Ikterus, Blutungsneigung und die hepatische Enzephalopathie. Frühstadien einer Lebererkrankung sind bisher nur eingeschränkt erkennbar. Auch beim akuten Leberversagen dauert es mehrere Tage, bis es zur Ausprägung eindeutiger Symptome kommt. Nicht-invasive Atemtests können dabei helfen, therapeutische Pläne zu optimieren, die Entscheidung für den richtigen Zeitpunkt für eine Lebertransplantation zu erleichtern oder um die residuale Organfunktion vor Leberteilresektionen zu testen.(27)

3.1.3.2. Quantitative Leberfunktionstests

Zur Beurteilung der Leberfunktion wird eine Vielzahl von verschiedenen Methoden eingesetzt. Zum besseren Verständnis sollte man diese in statische und dynamische Tests unterscheiden (siehe Tabelle 2).

Leberspezifische Syntheseprodukte wie Albumin, Gerinnungsfaktoren oder Gallensäure erlauben eine qualitative Abschätzung der Leberfunktion. Ursache dafür sind die weitgehend unbekannten Syntheseraten, Verteilungsvolumina, ein vermehrter Verbrauch oder eine vermehrte Ausscheidung von Albumin über die Nieren oder den Darm. Sie werden als

statische Parameter der Leberfunktion bezeichnet (siehe unten). Um eine genauere Abschätzung zu erlauben werden zusätzliche dynamische Testmethoden zur quantitativen Bestimmung benötigt.(28, 43, 62)

Die Betrachtung des Patienten mit signifikanten Symptomen, wie dem Schweregrad der Aszites oder das Vorhandensein von Enzephalopathie, sind mitentscheidend für die klinische Klassifizierung. Um ein Gesamtbild des Schweregrades zu ermitteln, fließen diese Parameter in spezifische Bewertungssysteme (Scores) mit ein. Hierbei sticht der Child-Pugh Score als renommierteste Maßeinheit hervor, der einen hohen Stellenwert in der Beurteilung der Leberfunktion einnimmt.(63)

Das Problem besteht darin, dass die Parameter für die Erstellung des Child-Pugh-Score von der subjektiven Einschätzung des Untersuchers (Aszitesmenge, Enzephalopathie) und von anderen Erkrankungen (konsumierenden Erkrankungen, Eiweißverlust, Ernährung, Albumin, Quickwert) abhängen.(45) Somit gibt es zwar in den einzelnen Unterformen klare Abgrenzungen, doch herrscht Unklarheit in Krankheitsstadien, die vom Schweregrad her zwischen den Klassifikationsstufen stehen.(45) Holtmeier, Stravitz, Di Campli et al. und auch Degre et al. haben gezeigt, dass dynamische Atemtests hierbei eine entscheidende Stütze sind.(64-67) (2, 68, 69)

Der bisherige Goldstandard, die Leberbiopsie, hat nicht nur einen invasiven Charakter, zudem gibt sie auch keine exakten Abschätzungen wieder. Deshalb besteht seit langem der Bedarf an dynamischen Leberfunktionstests.(1) Zahlreiche dynamische Tests wurden im Laufe der Jahrzehnte untersucht. Dabei messen Sie die Leberfunktion über die Bildung von Metaboliten nach Gabe einer Fremdsubstanz, einem Isotopomer (z.B. ¹³C-Methacetin).(1) (15) Einsatzgebiete dieser dynamischen Leberfunktionstests dienen meist Verlaufs- und Prognosebeurteilung chronischer Lebererkrankungen (z.B. Leberzirrhose, äthyltoxischer oder viraler Genese)(32, 70) sowie vor und nach großen leberchirurgischen Eingriffen (Klatskin-Tumoren, hepatozelluläres Karzinom, cholangiocelluläres Karzinom, Lebertransplantation). (26, 71-74)

Tabelle 2: Statische und dynamische Tests in der klinischen Diagnostik.

	Marker	Funktion
	Albumin	Syntheseleistung
	Gerinnungsfaktoren	Syntheseleistung
Ctation by Toute	(F II, F VII)	Ausscheideleistung
Statische Tests	Bilirubin	Cholestase
	GGT, AP, CHE	hepatozell. Schaden
	ALT, AST	Clearenceleisung
	ICG-Test	Metabolisierung
Dynamische Tests	¹³ C-Atemtest	Metabolisierung

3.1.4. Der LiMAx-Test

"Messung der maximalen Leberfunktionskapazität"

In der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin-Campus Virchow wird seit 2004 ein Leberfunktionstest, der LiMAx-Test, entwickelt und klinisch evaluiert. Dieser beruht auf der Trägersubstanz ¹³C-Methacetin, welcher sich aufgrund seines schnellen Metabolismus sowie dem charakteristischen Fehlen von Toxizität bei der verabreichten Dosis gut eignet.(26, 63, 71, 75) ¹³C-Methacetin ist eine Substanz mit einem hohen First-Pass Effekt, was eine günstige Voraussetzung für einen dynamischen Test ist.(15) Es wird von funktionierenden Leberzellen aufgenommen. Das Cytochrom P450 1A2-Enzym spaltet es in Paracetamol und ¹³CO₂ bei einem einzigen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt: der O-Dealkylierung. (2, 9, 15)

Ein möglicher Schwachpunkt der metabolischen Leberfunktionstests ist die teilweise ausgeprägte Abhängigkeit gegenüber Enzyminduktoren sowie -inhibitoren. Die bekannten Cytochrom P450-Enzymsysteme können durch zahlreiche Substanzen, wie z.B. Pharmaka, in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Dies kann Auswirkungen auf das gemessene Ergebnis und die damit verbundene Aussagekraft haben. Allerdings ist das Cytochrom P450 1A2 im Vergleich zu anderen Subenzymen wenig beeinflussbar.(76)

3.2. Auswertungs- und Interpretationsprobleme

Bei den in der Literatur beschriebenen 13 C-Atemtests kamen bisher unterschiedliche Test- und Auswertungsalgorithmen zum Einsatz. Gemeinsames Ziel war die möglichst valide Ableitung einer Metabolisierungsrate anhand des Atemtests. Die zugrundeliegende Methodik wurde bereits in den 1970er Jahren von Schoeller et al. anhand der damals verfügbaren Massenspektrometrie definiert.(9) Jeder Atemtest beginnt mit dem Entnehmen einer Atemprobe vor Substratapplikation, um das individuelle basale 13 CO2/ 12 CO2-Verhältnisses (δ_{t0}) im Atem zu bestimmen. Während des Tests werden nach der 13 C-Substratapplikation zu bestimmten Zeitpunkten Atemproben entnommen, um die Veränderung des 13 CO2/ 12 CO2-Verhältnisses (δ_{s}) zu bestimmen. Für jeden Messzeitpunkt wird der Anstieg des 13 CO2/ 12 CO2-Verhältnisses (δ_{t}) im Vergleich zum Basalwert als "Delta over baseline" (DOB) berechnet. DOB = δ_{s} - δ_{t0} [‰]. Zur besseren Anschaulichkeit kann zusätzlich eine prozentuale Wiederfindungsrate (Dosis%/h) aus dem Verhältnis der abgeatmeten zur verabreichten 13 C-Menge berechnet werden. Hierbei wird die abgeatmete 13 C-Menge mittels Standard- 13 C/ 12 C-Ratio (R_{PDB}) (77) und der geschätzten endogenen CO2-Produktion (300 mmol CO2/ 12 Ch) berechnet.(78)

Für diese Berechnungen können aber unterschiedliche Messzeitpunkte oder Algorithmen herangezogen werden. In den meisten Studien wurden zu unterschiedlichen, festgelegten Zeitpunkten Atembeutel gesammelt und anschließend gemessen. Oftmals wurde das $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Verhältnis zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. nach 10, 20, 30, oder 60 Minuten) oder die Fläche unter der Kurve (AUC) als aussagefähiger Parameter berechnet.(1)

Allerdings ist noch nicht geklärt, welcher Wert sich am besten eignet und somit die Organfunktion am besten repräsentiert. Dabei sollte die Testwertdifferenz zwischen Kranken und Gesunden maximal groß sein, um eine hohe diagnostische Wertigkeit zu erlauben.

Des Weiteren ist die optimale Substratdosierung, der bestmögliche zeitliche Ablauf der DOB Messungen und die Reproduzierbarkeit des Testablaufs bisher noch nicht endgültig definiert worden.

Folglich sind die Ergebnisse, die durch die verschiedenen Berechnungen erfolgt sind, zwar in sich schlüssig, da mathematisch validiert, jedoch nicht immer miteinander vergleichbar. Tabelle 3 zeigt einen Überblick über einige der verschiedenen Berechnungsmethoden.

Tabelle 3: In der Literatur beschriebene Auswertungsparameter

System	Autor/ Jahr	Messpunkte/-intervall	Substrat Dosierung	Mess- Parameter
Leberfunktion	Standard	Automatische Messung: 10 Min. vor Substratgabe sowie jede min des Testes bis zur 60. Min.	2mg/kg/KG	DOBmax
	Stockmann '08,	Automatische Messung: 10 Min vor & in jeder Min bis zur 60.	2mg/kg KG i.v.	DOBmax
	Lalazar '08	0.,30., 60. Min.	75 mg p.o.	AUC
alternativ	Schneider '07	alle 5 Min. bis 60.Min.	75 mg p.o.	DOB,AUC
	Braden '07	alle 5 Min. Bis 60. Min.	75 mg p.o.	AUC, %Dosis/Std.
	Portincasa '06	Vor Applikation, sowie alle 15 Min.–120. Min.	100mg p.o.	AUC vs. 13 delta DOB.

Gleichbedeutend betrifft es die Technologie bzgl. der Analyse:

Vom HAMS (hoch-auflösender Massen Spektrometer) entwickelt es sich kontinuierlich bis hin zum jetzigen Standard NDIRS (nichtdispersive Isotopenselektive Infrarot Spektrometrie), der technisch einfachere und kostengünstige Methode mit adäquater Präzision darstellt.(79) (2) Pfaffenbach et al. zeigten den Einsatz der nichtdispersiven, isotopenselektiven Infrarot-Spektroskopie (NDIRS) beim ¹³C-Methacetin Atemtest und leisteten somit erhebliche Arbeit, um die viel aufwendigere und preisintensivere massenspektrometrische Messung, abzulösen.(2, 80) Zudem konnte Adamek et al. für die gemessenen Werte mit der neuen Methode (NDIRS) hohe Korrelationen zu den gemessenen Werten mit dem Isotopenmassenspektrometer (IRMS) nachweisen.(23)

In Zukunft sollen weitere Techniken, wie bspw. CRDS (cavity-ring down Spectroscopy) kostengünstigere Varianten anbieten, so dass nicht nur die Probengewinnung vereinfacht ist, sondern auch die Auswertung.(81, 82) Auch die FLIP-Methode lässt die Erwartungen steigen, dass die Entwicklung in eine zeitlich hochaufgelöste und präzise Messmethodik tendiert.(24, 25)

Die Systeme greifen hauptsächlich das Verhältnis von ¹³CO₂/¹²CO₂ in der Ausatemluft auf, berücksichtigen so jedoch nicht das gesamte Volumen des CO₂ in der Ausatemluft.(83) Dabei gibt es interindividuelle Unterschiede, die das Ergebnis beeinflussen können. (2)

Probleme bei der Beurteilung der ¹³CO₂-Ausscheidung ergeben sich aus der Hypothese, dass das in verschiedenen Kompartimenten entstehende ¹³CO₂ nicht auf direktem Wege aus der Lunge abgeatmet wird. Zunächst erfolgt der Abtransport mit dem Blutkreislauf, wobei sich das ¹³CO₂ auch in anderen Kompartimenten des Körpers löst. Die größte Rolle hierbei dürfte das Bikarbonat-Puffersystem des Blutes spielen. Die endogene CO₂-Produktion sowie die verschiedenen Pfade, über die CO₂ transportiert wird, werfen die Frage auf, ob das mit dem Substrat verabreichte ¹³CO₂ im Gesamten wieder abgeatmet wird. Nur so kann man rechtfertigen, dass die ¹³CO₂-Atemtests auch einen spezifischen Zusammenhang mit der Leberfunktion aufweisen.(84, 85) Leese et al. haben in ihrer Arbeitsgruppe in verschiedenen Publikationen auf die Rolle des pH-Wertes und ihre daraus entstehenden Verschiebungen des CO₂ hingewiesen.(86) Ein einheitliches System würde die Standardisierung nicht nur vereinfachen, sie könne die Vergleichbarkeit von klinischen Studien erleichtern.

3.3. Einflussfaktoren in der Praxis

3.3.1. Substratpharmakokinetik

Damit das ¹³C in den Organismus gelangen kann, bedient man sich einem einfachen System von Trägersubstanz, einem Isotopomer. Das Zielenzym oder der Stoffwechselweg baut dieses ab. Nach Abspaltung erfolgt dann die Abatmung der markierten Substanz. Die zentrale Frage dabei ist, ob die abgeatmete Menge an abgespaltenem ¹³C gleichzusetzen ist mit der Aktivität des Zielenzyms. Durch die Vorstellung des Kompartimentmodelles ist dies kaum noch zu bejahen.(87) Es rückt nun mehr die Bedeutung der Abbaugeschwindigkeit sowie der Verteilung ins Zentrum. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Genauigkeit der Ergebnisse validierbar ist. Die Bedeutung zeigt sich in der Analyse der Atemtests: Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft werden verschiedene Parameter genutzt, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen (DOBmax, AUC, etc.). So kann nicht von einer gemeinsamen Richtlinie gesprochen werden. Um dies zu erreichen, muss man einer tiefgreifenderen Erforschung der Substratpharmakokinetik nachgehen. Die Substratpharmakokinetik bezieht sich auf die tatsächliche Abbaurate des verabreichten Stoffes im Blut. Somit ist die Auswertung nicht nur auf den errechneten Wert in der Abatemluft abhängig und dem damit verbundenen Auswertungsalgorithmus. Vielmehr beschreibt man, an welchem Zeitpunkt und Messwert in der Abatemkurve bestimmt werden muss, um eine exakte, quantitative Leberfunktion herzuleiten.

3.3.2. Bedeutung von Kohlendioxid- und Bikarbonatkinetik

Kohlendioxid (CO₂) ist das wichtigste Endprodukt des oxidativen Stoffwechsels. Und da es durch Hydrierung leicht in Kohlensäure umgewandelt wird, kann es zur Quelle einer nennenswerten Azidose werden, wenn man seine Akkumulation zulässt. Den Stellenwert der CO₂-Elimination erkennt man am Verhalten der Atemregulation, die dafür sorgt, dass ein konstanter *p*-CO₂ im arteriellen Blut (Pa-CO₂) aufrechterhalten wird. Ein Anstieg des Pa-CO₂ um 5 mmHg kann zu einer Verdoppelung des Atemminutenvolumens führen. Der arterielle PO₂ hingegen müsste auf 55 mmHg sinken, um dieselbe Ventilation zu bewirken.(88)

Tabelle 4: Normalwerte von CO₂ in arteriellem und venösem Blut

Parameter	Arterielles Blut	Venöses Blut
$p\mathrm{CO}_2$	40 mmHg	45 mmHg
Physikalisch gelöstes CO ₂	27 ml/l	29 ml/l
gesamter CO2-Gehalt	490 ml/l	530 ml/l
Blutvolumen	1,251	3,75 1
CO ₂ -Volumen	613 ml	1988 ml

Der gesamte CO₂-Gehalt setzt sich aus der Summe der verschiedenen Anteile zusammen, einschließlich des physikalisch gelösten CO₂, der Bikarbonatkonzentration im Plasma, den Erythrozyten sowie dem Carbamino-CO₂-Gehalt der Erythrozyten. Bei Addition dieser Werte ergibt sich ein Gesamt-CO₂-Gehalt von 23 mval/l, wovon 17 mval/l im Plasma befinden, und 6 mval/l im Erythrozyten. (88) (siehe Tab. 4)

Der CO₂-Transport ist ein komplexer Vorgang. Der Kernprozess ist die Reaktion von CO₂ mit Wasser, bei der zuerst Kohlensäure (H₂CO₃) gebildet wird. Diese normalerweise langsam ablaufende Reaktion, die ca. 40 Sekunden dauert, wird durch das Enzym Carboanhydrase erheblich beschleunigt und benötigt dann weniger als 10 Millisekunden.(79)

Dieses beschleunigende Enzym liegt nur im Erythrozyten vor, nicht im Plasma. Deshalb erfolgt die rasche Hydrierung nur in den roten Blutkörperchen. Hieraus resultiert ein Druckgradient, der zur Aufnahme in die Zelle führt. CO₂ wird aus dem Gewebe, vor allem bei Belastung bzw. körperlicher Arbeit an das Blut abgegeben und gelangt in die Erythrozyten, wo es zu H₂CO₃ hydriert wird und wiederum in HCO₃– und H⁺ dissoziiert.(89)(siehe Abb. 1)

Das entstehende H⁺ hingegen kann sich nicht aufgrund der Pufferwirkung des Hämoglobins im Erythrozyten ansammeln und somit die Hydrierungsreaktion verlangsamen. Das HCO₃gelangt durch einen Austausch mit Cl wieder aus dem Erythrozyten hinaus und fördert so die weitere Diffusion von CO₂ in das rote Blutkörperchen (Hamburger-Shift), wird aber zu ca. 77% wieder das Blut abgegeben. Dieser Anionenaustausch an wird geschwindigkeitsbestimmender Schritt bezeichnet. (90) Durch diese Vorgänge entsteht ein Auffangbecken, dass die Aufnahme großer CO₂-Volumina in den Erythrozyten bewältigen hilft.

In der Lunge hingegen verläuft diese Reaktion rückwärts, so dass CO₂ abgegeben wird und HCO₃ aufgenommen. Die Schnelligkeit dieses Prozesses erlaubt es dem Plasma-Bikarbonat-Ionen Pool die intraerythrozytäre Carboanhydrase zu nutzen und am kapillären CO₂ Austausch teilzunehmen. Folglich wird der überwiegende Anteil des CO₂ im Blut in Form von HCO₃ zwischen Gewebe und Lunge, welches das ausscheidende Organ ist, transportiert. Dies ist für das im Atemtest gebildete ¹³CO₂ auch der Fall.

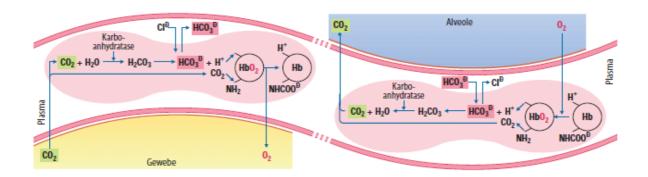


Abbildung 1: Chemische Reaktion im Erythrozyten beim Gasaustausch im Gewebe (links) und in der Lunge (rechts).

Aus Schmidt, Robert F., Thews, Gerhard: Physiologie des Menschen 27. Auflage 1997

Das bedeutendste Teil-Puffersystem im Körper ist der des Bikarbonates mit knapp 75 % der Gesamtpufferkapazität des Blutes. Obwohl sein pK ungünstig bei 6,1 liegt, ist es von großer Bedeutung, weil es ein offenes System ist: Über die Atmung kann ständig CO₂ abgegeben werden; die Menge lässt sich sogar variieren (entsprechend Hypo- oder Hyperventilation). Auch HCO₃- kann den Bedürfnissen entsprechend über die Nieren und indirekt über die Leber ausgeschieden werden. Sein Gesamtvolumen beschränkt sich auf 22-26 mmol/l und dient vor allem dem Kohlenstofftransport.(88)

Die anderen Teil-Puffersysteme werden wegen ihrer geringeren Bedeutung oft als Nicht-Bikarbonat-Puffer zusammengefasst. Es sind geschlossene Systeme, bei denen sich die Gesamtkonzentration der Puffersubstanzen nicht schnell ändern kann: unter anderem Proteinat-Puffer, Hämoglobin und auch Plasmaproteine.

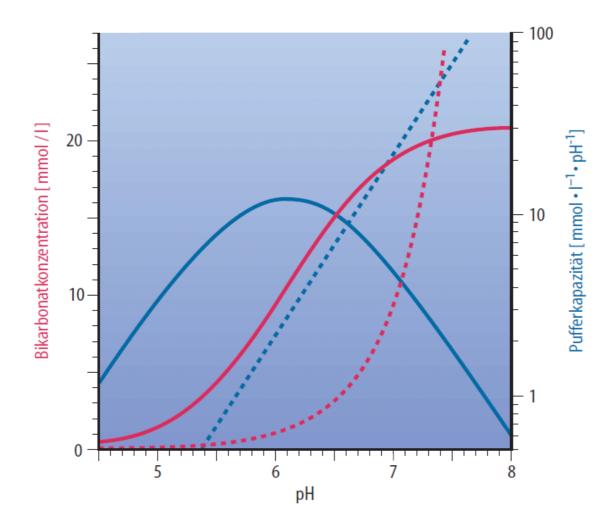


Abbildung 2: Beziehung zwischen dem pH-Wert und der Bikarbonatkonzentration

Pufferkurve (rot) sowie der Pufferkapazität (blau) für das geschlossene System (durchgezogene Kurven) und das offene System bei $P-CO_2=40$ mmHg (gestrichelte Kurven); Man beachte die logarithmische Skalierung der rechten Ordinate.

Aus Schmidt, Robert F., Thews, Gerhard: Physiologie des Menschen 27. Auflage 1997

3.3.2.1. Kompartimentmodell

CO₂-Kompartimente wurden in gesunden Organismen mit der intravenösen Applikation von radioaktiv markierten ¹¹C, ¹⁴C, oder auch nicht-radioaktiven ¹³C-markierten Bikarbonat untersucht. Weil die Regeneration der markierten Trägersubstanz in vorangegangen Arbeiten nicht mit der Menge an ¹³CO₂ in der Abatemluft einherging, gingen Arbeitsgruppen wie die von Barstow, Irving und auch Roecker davon aus, dass das ¹³C-markierte Kohlenstoff nicht direkt über die Luft abgegeben, sondern folgerichtig in anderen Kompartimenten zwischengespeichert wird.(79, 84, 91) Meineke et al. konnten durch ihre Studien nachweisen,

dass sogar bis zu 30% der verabreichten Anteile der gegebenen Substanz nicht direkt ausgeschieden werden.(13)

Abbildung 3 zeigt eine systematische Darstellung des Kompartimentmodells. Dabei wird deutlich, dass ¹³CO₂, welches in die Kompartimente abgegeben wird, nicht vollständig in den vaskulären Pool und damit zur Ausatmung zurückgelangt. Im Kompartiment Knochen wird dies bspw. am deutlichsten.

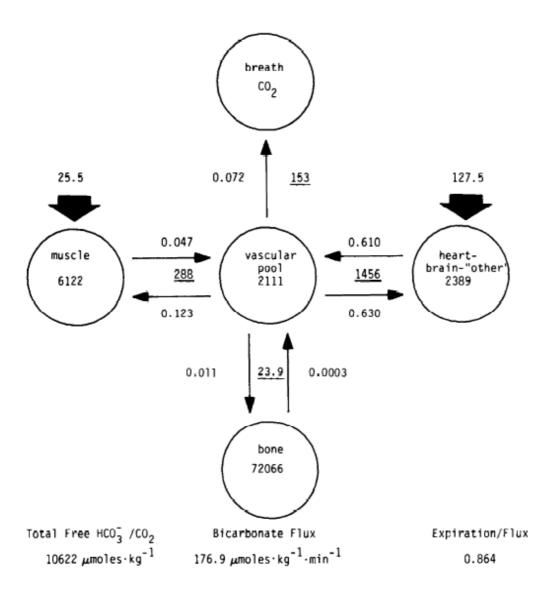


Abbildung 3: Kompartmentmodell zur Verteilung des CO2.(79)

In der Literatur wird hier von einem Drei-Mammillary Kompartiment-Modell gesprochen (siehe Abb. 3).(91) Der Begriff Mammillary bezeichnet den Zusammenhang aller

Kompartimente zu einem Hauptpool. Zu unterscheiden ist er von dem Catenary-Modell, welches eine Verlinkung der Pools in Kettenform darstellt.(92)

Die Auswaschungsdynamik ist bei unterschiedlicher metabolischer Rate offenbar klar voneinander unterscheidbar. Schon eine milde Zunahme der CO₂-Produktion, die mit leichter körperlicher Belastung einhergeht, geht auch mit einer Zunahme von ¹³CO₂ in der Abatemluft einher.

Man fand, dass die metabolische Rate von CO₂ bzgl. der Auswaschungskurve für ¹³CO₂ genau vorausgesagt werden kann. Schließlich erlaubt das Modell, das aus der Auswaschungskurve entstand, die Effekte der erhöhten metabolischen Rate in Bezug zur CO₂-Dynamik innerhalb des Körpers auszuwerten. Die Untersuchung des Bikarbonat-Systems mittels markiertem CO₂ erlaubt daher auch ein besseres Verständnis der ¹³CO₂ Abatmung beim Atemtest.(93)

3.3.2.2. CO₂ Produktionsrate

Eine erhöhte körperliche Belastung führt aufgrund der erhöhten Muskelarbeit zu einer erhöhten Produktion von CO₂. Weil körperliche Arbeit einerseits einen Anstieg der Stoffwechselrate sowie andererseits einen Anstieg des Blutflusses zu verschiedenen Organen und Geweben mit sich zieht, geht man davon aus, dass dies einen Effekt auf die Kinetik des Bikarbonates, und damit auf das CO₂ hat.(93) Es ist berichtet worden, dass Teile des CO₂, welches bei kontinuierlicher Belastung gebildet werden, im Körper gespeichert werden und sich das Atemaustauschverhältnis verringert.(94, 95). Yunoki et al. haben in Ihrer Arbeit gezeigt, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen erhöhter CO₂-Produktion und Lactat als Antwort von körperlicher Belastung gibt. Jedoch ist der zeitliche Ablauf der erhöhten Produktion von CO₂ verspätet und wirft die Frage auf, wohin das CO₂ diffundiert ist, bzw. ob das abgeatmete CO₂ aus der gleichen Produktion entstammt.(96)

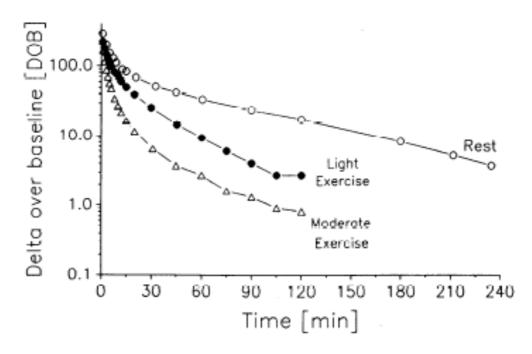


Abbildung 4: Semilog-Plot der Kinetik des ¹³CO₂ nach intravenöser Injektion von ¹³C-markiertem Bikarbonat in Ruhe, leichter und schwerer körperlicher Belastung. (93)

3.4. Mögliche Bedeutung für nicht-invasive Atemtests

Die Grundlage von nichtinvasiven Atemtests ist die Ausatemkinetik des markierten ¹³CO₂. Anhand dessen geht man davon aus, dass der zu beurteilende Stoffwechselweg mit dem Abbau korreliert. Wie nun in den vorangegangenen Abschnitten besprochen, ist die Frage berechtigt, ob die Ausatemkinetik dem tatsächlichen Substratmetabolismus entspricht.

Nun kann man nicht davon ausgehen, dass jeder Patient der mittels ¹³C- markierten Atemtest untersucht wird, die gleichen Voraussetzungen erfüllt. Medikation, Komorbidität u.a. Faktoren spielen eine beeinflussende Rolle. Was den Stoffwechsel betrifft können Erkrankungen mit einem erhöhten Umsatz, wie bspw. bei Hyperthyreose oder M. Cushing und die damit einhergehende erhöhte CO₂-Produktion dazu führen, dass sich das Verhältnis zwischen ¹³C und ¹²C verändert, und so das tatsächliche Ergebnis negativ beeinflusst. (86)

Ebenso spielt die Halbwertszeit der Trägersubstanz eine Rolle. Bei Substraten, die lange Halbwertszeiten besitzen kann es zu verzögerter Freisetzung kommen. Das Ergebnis verschiebt sich damit zunehmend, so dass der eigentlich gemessene Wert in der Ausatemluft nicht mehr im Zusammenhang mit der verabreichenden Menge und dem Substratmetabolismus entspricht. Auch Ernährungsgewohnheiten, Zigarettenkonsum sowie

weitere soziale Einflussfaktoren können die Ergebnisse positiv oder negativ beeinflussen. (2, 97-99)

Der entscheidende Faktor zur Entstehung dieser Arbeit ist jedoch die Pharmakokinetik und ihr Verhalten im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Atemtests. Durch die Zwischenspeicherung des Produktes im Bikarbonat-Pool entstehen Verzögerungen in der Abatmung. Diese Verzögerungen erschweren neben interindividuellen Variationen und der zu definierenden Auswertungsmethoden eine exakte Bestimmung. Um diese Faktoren zu klären, benötigen wir die Bestimmung der Pharmakokinetik des verabreichten Substrates. Um diese evidenten Faktoren interpretieren und so das Verteilungs- und Ausscheidungsverhalten des 13 CO₂ besser nachvollziehen zu können, sind im Rahmen dieser Studie Fragen entstanden, die in den folgenden Abschnitten mit der Darlegung der Ergebnisse beantwortet werden sollen.

4. Fragestellung

4.1. ¹³CO₂-Abatmungskinetik nach ¹³C-Methacetininjektion

Es sollte die physiologische ¹³CO₂-Abatmungskinetik beim ¹³C-Methacetin-Atemtest beschrieben werden. Diese konnte erstmals genauer in einer größeren Population von Probanden durch eine Online-Messung (siehe LiMAx-Test) mit hoher Messfrequenz untersucht werden.

Zeitlicher Verlauf

- Wie lange nach Injektion des ¹³C-Methacetin kommt es zu einem Anstieg der ¹³CO₂-Abatmung?
- Gibt es eine einheitliche Abatmungskinetik beim Gesunden?
- Ist die Abatmungskinetik beim LiMAx-Test reproduzierbar?

Konzentrationsmaximum (DOBmax)

• Wann wird das Maximum der ¹³CO₂-Abatmung (DOB) erreicht?

Dosisabhängigkeit

- Wird bei der im LiMAx-Test verabreichten Dosierung von 2mg/kg KG eine Sättigung des CYP1A2-Systems erreicht?
- Besteht ein direkter Einfluss der Dosierung auf den DOB-Level?

4.2. Pharmakokinetik von Substrat und Produkt im Serum

Durch die simultane Bestimmung von ¹³C-Methacetin im Serum ist ein Vergleich der Abatmungskinetik mit der Pharmakokinetik im Serum möglich.

- Wie hoch sind die Serumspiegel von ¹³C-Methacetin nach intravenöser Applikation und korrelieren sie zeitlich mit dem Maximum der ¹³CO₂-Abatmung?
- Nach welcher Zeit ist der Abbau des ¹³C-Methacetins in der Leber beendet?
- Lässt sich ein gleichsinniger Anstieg des Abbauprodukts Paracetamol nachweisen?

4.3. Reproduzierbarkeit der Messergebnisse

Durch die mehrfach durchgeführten Messungen im Rahmen des Studienprotokolls sollte die intraindividuelle Reproduzierbarkeit der ¹³CO₂-Abatmung (DOB) und Pharmakokinetik untersucht werden.

- Kommt es nach wiederholten Messungen zu Veränderungen der grundlegenden Messparameter?
- Wie gut sind die DOB und LiMAx Werte reproduzierbar?

4.4. Körperliche Belastung zur Erhöhung der CO₂ Produktionsrate

Mögliche Einflussfaktoren auf das Bikarbonat-Puffer-System sollen durch erhöhte CO₂-Produktion mittels körperlicher Belastung während des Tests untersucht werden.

Einfluss erhöhter CO₂-Produktion während des Tests

- Welche Rolle spielt der Bikarbonat-Puffer bei der Ausscheidung des ¹³CO₂?
- Kann die ¹³CO₂-Abatmungskinetik unabhängig von der Serumkonzentration durch eine erhöhte CO₂-Produktion beeinflusst werden?

Durchführung des Tests mit erhöhter CO2-Produktion

- Welche Rolle spielt eine erhöhte CO₂-Produktion bei der Ausscheidungskurve und ihrem Maximum?
- Wird die Pharmakokinetik von ¹³C-Methacetin im Serum durch die erhöhte CO₂-Produktion beeinflusst?

5. Methoden

5.1. Studienablauf

Für diese Studie wurden gesunde Probanden (siehe 5.2) an fünf Messtagen innerhalb von maximal zwei Wochen untersucht, um stabile und vergleichbare Untersuchungsbedingungen sicherzustellen. Der ¹³C-Methacetin Atemtest wurde am Probanden auf einem Ergometer sitzend abgenommen. Eine mindestens dreistündige Nahrungskarenz war notwendig. Vor Messbeginn erhielt der Proband eine Venenverweilkanüle in eine Ellenbeuge (Vena basilica). Hieraus erfolgte eine Routineblutentnahme, bei der verschiedene Parameter zum Ausschluss von generellen Laborwertveränderungen, insbesondere von Lebererkrankungen bestimmt wurden (Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, Asparatataminotransferase [AST], Alaninaminotransferase [ALT], Glutamatdehydrogenase [GLDH], Alkalische Phosphatase [AP], Gamma-Glutamyl-Transferase [GGT], Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten). Dieses wurde am gleichen Tag vom Zentrallabor untersucht.

Für den Test wurde den Probanden ¹³C-Methacetin in unterschiedlichen Mengen intravenös injiziert und das ¹³CO₂/¹²CO₂-Verhältnisses der Ausatemluft mit der technisch maximalen Messpunktdichte des isotopenselektiven nicht-dispersiven Infrarotspektrometer Messgeräts (je nach Messung varierend zwischen 50 bis 70 Sekunden; FANci, FAN GmbH, Leipzig) analysiert. Das Gerät ist als Medizinprodukt CE-zertifiziert (siehe 5.3).

Hierdurch ergaben sich je nach Messung leicht abweichende Messintervalle von ca. 1 Minute. Über diese Einzelmessungen wurden das Maximum des DOB und der Zeitpunkt des Maximums je Messung für die weitere Auswertung definiert. Zu besseren Vergleichbarkeit der DOB Kinetik mit der Substrat und Produkt-Pharmakokinetik wurden die Ergebnisse in den Abbildungen nur für die Messzeitpunkte 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30, 50, 60 und 70 Minuten dargestellt. Die Ausscheidung des in der Leber entstehenden ¹³CO₂ wurde damit für insgesamt 70 Minuten untersucht.

Blutentnahmen zur Bestimmung der ¹³C-Methacetin-Konzentration im Blut erfolgten nach 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30 und 60 Minuten. Anschließend wurde die Venenverweilkanüle entfernt. Während der gesamten Untersuchung befand sich der Patient in sitzender Position (siehe 5.4).

Bei der zweiten Messung begann der Patient 60 Minuten nach Testbeginn mit einer zehnminütigen Belastung auf dem Fahrradergometer, die sich aus Ruheherzfrequenz (im

weiteren RHF) multipliziert mit dem Faktor 1.9 ergab. Dieses wurde mit Hilfe eines Brustpulsmessgerätes (Polar, Germany) verfolgt und konnte während der Belastungsdauer durch den Probanden und Untersucher individuell kontrolliert werden.

Bei der dritten Messung erfolgt der analoge Ablauf wie bei der zweiten Messung, nur dass die Menge des verabreichten ¹³C-Methacetins auf 4 mg/kg KG erhöht wurde.

Bei der vierten Messung wurde der Proband einer halbstündigen körperlichen Belastung (RHF x1.9) zu Beginn der Messung ausgesetzt. Falls die Probanden hierbei starken Durst entwickelten, war das Trinken von Wasser problemlos möglich. Bei Beschwerden oder Erschöpfung des Probanden wäre der Test sofort abgebrochen worden.

Bei der fünften Messung wurde der Aufbau der vierten Messung wiederholt mit dem Unterschied, dass erneut 4 mg/kg KG ¹³C-Methacetin verabreicht wurde. Abschließend erfolgte eine erneute Routineblutentnahme zum Ausschluss von Laborwertveränderungen im Rahmen der Studie.

Tabelle 5: Übersicht zum Ablauf der Kinetikstudie

Untersuchungstag	1	2	3	4	5
Methacetin-Gabe	2 mg/kg KG	2 mg/kg KG	4 mg/kg KG	2 mg/kg KG	4 mg/kg KG
Blutentnahmen					
Routineblutentnahme	X				X
Pharmakokinetik - ¹³ C-Methacetin - Paracetamol	X	X	X	X	X
Belastung					
Ergometer mit RHF × 1.9 (190% Steigerung)		5060. Min.	5060. Min.	-1020. Min.	-1020. Min.

5.1.1. Ethikkommission

Die durchgeführte Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA2/061/08). Jeder Proband wurde ausführlich über den Ablauf der Studie, die Studienziele und mögliche Risiken der Teilnahme aufgeklärt. Zudem erhielten alle

Probanden ein detailliertes Informationsblatt. Es bestand jederzeit die Möglichkeit die Teilnahme an der Studie abzubrechen. Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis.

5.2. Probandenkollektiv

Die Studie wurde an freiwilligen, gesunden Probanden durchgeführt. Diese wurden über Aushänge in der Universität, Rundmails und persönliche Bekannte der Arbeitsgruppe rekrutiert. Es wurde eine Aufwandsentschädigung von 100 Euro an jeden Probanden ausgezahlt. Nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung über Ziel und Fragestellung der Studie, den praktischen Ablauf sowie Risiken und Belastungen wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Weibliche Probanden wurden während eines Menstruationszyklus untersucht.

Einschlusskriterien

- 1. Männliche oder weibliche, gesunde Personen, Alter ≥ 18 und ≤ 60 Jahre
- 2. Personen, die ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie gegeben haben

Für die Studie wurden nur sportlich aktive Personen ausgewählt, um ein ausreichendes Belastbarkeitsniveau während der sportlichen Betätigung in den Untersuchungen sicherzustellen.

Ausschlusskriterien

- 1. Personen, bei denen eine Lebererkrankung oder eine koronare Herzkrankheit bekannt ist
- 2. Raucher
- 3. Personen, die regelmäßig Alkohol konsumieren
- 4. Personen, die regelmäßig Medikamente einnehmen
- 5. Personen, die im Untersuchungszeitraum an einer Infektionskrankheit leiden
- 6. Jegliche Faktoren, die die Fähigkeit des Probanden einschränken, während der Studie zu kooperieren (z.B. mentale Funktion oder Drogenmissbrauch)
- 7. Frauen im gebärfähigen Alter, außer Frauen, die eines der folgenden Kriterien erfüllten:
 - Negativer Schwangerschaftstest bei Studieneinschluss und Zustimmung zur sexuellen Enthaltsamkeit beginnend mit Studieneinschluss
 - eine als sicher geltende Verhütungsmethode (Pearl-Index unter 1%) die regelmäßig und korrekt angewendet wurde (z. B. orale Kontrazeptiva)

5.3. ¹³C-Methacetin Atemtest

5.3.1. Allgemeines Testprinzip

Es wurden eine Vielzahl quantitativer Leberfunktionstests in der Literatur beschrieben, wie z.B. ¹³C-Aminopyrin Atemtest, ¹³C-Coffein-Clearence, Ethyl-1-¹³C-Phenacethin Atemtest und der hier angewandte ¹³C-Methacetin Atemtest. Alle diese Tests beruhen auf einer nichtinvasiven, quantitativen Bestimmung der hepatischen, mikrosomalen Funktionskapazität des Fremdstoffmetabolismus. Sie folgen dem Prinzip, dass eine markierte Substanz, deren Stoffwechselweg bekannt ist, in einer bestimmten Dosis parenteral oder oral appliziert wird. Die Markierung der Substanz besteht dabei meist aus einem schweren Kohlenstoffatom der funktionellen Gruppe (z.B. stabile Isotop ¹³C). Die Methodik der Atemtests basiert auf der enzymatischen Umwandlung einer an ¹³C-markierten Substanz zu einem Metaboliten und ¹³CO₂.

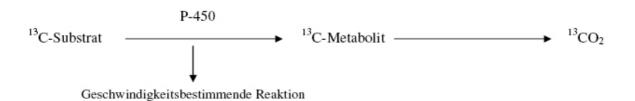


Abbildung 5: Prinzip des Atemtests. (2, 10)

Das Prinzip des ¹³C-Methacetin Atemtest beruht, wie oben bereits beschrieben, auf der enzymatischen Umwandlung, in einem, Cytochrom P450 1A2 abhängigen Schritt von ¹³C-Methacetin zu Paracetamol (Acetaminophen) und ¹³CO₂ (siehe Abb. 6 und 7)

Metabolismus des Substrates:

Abbildung 6: Umwandlung ¹³C-Methacetin in Paracetamol und ¹³CO₂

Hier wurde das Gerät für eine online Messung modifiziert. Während des Testes zieht das Gerät zu vorbestimmten Zeiten die Ausatemluft des Patienten in die Messeinheit, um die Änderung des ¹³C-Anteiles im abgeatmeten CO₂ über die Zeit zu bestimmen. Zu jedem Messzeitpunkt wird die Vergrößerung des ¹³CO₂-Anteils im Vergleich zum Basalwert der Atemluft (Veränderung des Verhältnisses ¹³CO₂/¹²CO₂) als "Delta over Base" (DOB) berechnet.

5.3.2. Praktische Durchführung

Der ¹³C-Methacethin Atemtest wurde bei allen Probanden an aufeinander bestimmten Tagen durchgeführt (siehe Tab. 5). Es musste eine Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz von mindestens 3 Stunden eingehalten werden.

Für den ¹³C-Methacetin Atemtest wurde den Probanden eine definierte Menge ¹³C-markiertes Methacetin intravenös appliziert. Hierfür musste dem Probanden eine ¹³C-Methacetindosis von 2mg/kg Körpergewicht (KG) intravenös injiziert werden. Zum Nachspülen wurden 20 ml Natriumchlorid (NaCl) verwendet. Die Venenverweilkanüle wurde möglichst in eine Cubitalvene platziert. Um die Pharmakokinetik des Atemtests bezüglich seiner Sättigung besser beurteilen zu können, wurde den Probanden bei den Messungen 3 und 5 je 4 mg/kg KG intravenös verabreicht.





Abbildung 7: ¹³C-Methacetin- Flasche

Abbildung 8: Injektionssystem

Die Probanden wurden vor dem Test instruiert sich möglichst ruhig zu verhalten, um jegliche körperliche Anstrengung zu vermeiden, da dies die Testergebnisse verfälschen könne.

Vor Startbeginn wurden an dem Messgerät Studiennummer, Größe, Gewicht und ¹³C-Methacetinmenge des Patienten eingegeben. Danach wurde dem Probanden eine speziell

angefertigte Gesichtsmaske, ähnlich einer CPAP-Maske, auf das Gesicht gesetzt. Dabei war zu beachten, dass die Maske gut auf dem Gesicht sitzt und keine Atemluft entweicht konnte. Die Maske war mittels eines Kunststoffschlauches mit einem Feuchtigkeitsaustauscher, welcher sich an der Messeinheit befindet, verbunden. Während der ersten zehn Testminuten wurden 5 Basalwerte gemessen und zum δ_{t0} gemittelt.

Während der nächsten laufenden 70 Minuten wurden kontinuierlich mit maximaler Sampling rate des Messgeräts (50-70 Sekunden) Atemgasproben in das Gerät gezogen und analysiert. Der Proband atmete während dieser Zeit ganz normal weiter.

Die Atemmaske wurde nach Beendigung desinfiziert und anschließend in ein hausübliches Desinfektionsbad für eine Stunde gelegt. Nach einer Stunde wurde sie gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und durch die Raumluft getrocknet.

5.3.3. Analyse des Atemgases

Für die in der Studie durchgeführten Messungen zur Bestimmung des Isoptopenverhältnisses $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ im Atemgas, wurde das NDIRS-Gerät FANci 2db-16 (Fischer Analysen Instrumente, Leipzig) verwendet. (siehe Abb. 10)

Der wichtigste Teil des NDIRS ist ein für die Isotopenanalyse modifizierter Analysator (URAS 10), der für die quantitative Analyse von CO₂ und anderen Gasen eingesetzt wird.

Für die quantitative Bestimmung der Konzentration von Gasen, bspw. in Luft oder anderen Gasen, wird seit Ende der Neunziger Jahre mit großem Erfolg die Infrarot (IR)-Spektroskopie eingesetzt.(2) Bei der nichtdispersiven Infrarotspektroskopie wird auf dispersive Elemente wie Gitter oder Prismen verzichtet.. Es wird dabei eine breitbandige Lichtquelle und ein akusto-optischer Detektor benutzt. Dieser reagiert nur auf die Wellenlänge, bei denen das zu messende Medium (Gas) absorbiert wird. (2, 18, 20, 21, 100)

Der Detektor, bestehend aus einer Gaszelle sowie einem Kondensatormikrophon, wird mit dem zu beurteilendem Gas angefüllt,. Durch Erwärmung nach Absorption des Lichtes durch das Gas ändert sich der Druck in der Gaszelle sowie die Kapazität des Kondensatormikrophons. Der massgebende Schritt dabei ist, dass nur die Wellenlängen zu Druckschwankungen führen, bei denen das Gas im Detektor absorbiert wird. Befindet sich nun eine bestimmte Menge an Gas zwischen der Messzelle und der Lichtquelle mit denen der Detektor gefüllt ist, kann die Konzentration des Gases aus der Amplitude der Druckschwankungen in der Detektorzelle bestimmt werden. (2, 101)

Die Amplitude der Druckschwankungen ist nun proportional zur Transmission und umgekehrt proportional zur Gaskonzentration in der Messzelle. Durch die Füllung der Detektorzellen wird die Selektivität des Spektrometers erreicht. Betrachtet man das Messgerät genauer, so lassen sich zwei separate IR-Kanäle für ¹³CO₂ und ¹²CO₂ identifizieren. In dem ersten IR-Kanal wird ein Messbereich von 0-500 ppm ¹³CO₂ und im zweiten IR-Kanal ein Messbereich von 0-5 Volumenprozent ¹²CO₂ erfasst. Es wurde eine Filterzelle für den ¹²CO₂-Kanal eingebaut, um die Restempfindlichkeit zwischen ¹³CO₂ und ¹²CO₂ zu verringern. Diese wird mit reinem CO₂ gefüllt ist.(102) Die Filterzelle dient dazu, nahezu alle interferierenden Wellenlängen zu blockieren. Die verbleibende Restquerempfindlichkeit wird durch arithmetische Korrektur ausgeglichen. Sowohl durch die Thermostatisierung auf 50° Celsius als durch die gasdichte Verpackung werden Messfehler Temperaturunterschiede in der Umgebung oder der unterschiedlichen CO₂– Konzentration in Umgebungsluft vermieden. (80, 81) Eine für jeden Kanal vorhandene Kalibrierungseinheit besteht aus einer Kalibrierungsküvette, die selektiv mit Gas gefüllt wird. Für die Kalibrierung wird das Messgas durch Nullgas ausgetauscht und gleichzeitig die Kalibrierungsküvette elektromagnetisch in den Strahlengang geschoben. Durch CO₂ Absorption an Natronkalk wird das Nullpunktgas aus der Umgebungsluft gewonnen. Durch Membranpumpen, die sich im Gerät befinden, werden Atemgasproben aus dem Atemgasschlauch kontinuierlich durch die Messzellen beider Kanäle gepumpt.(2, 102)



Abbildung 9: NDIRS FANci 2db16-Messgerät

5.3.4. Berechnung und Darstellung der Testergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Berechnungen gehen auf die von Ghoos et al. benutzten Gleichungen zurück und wurden für die Berechnung der in dieser Studie aufgezeigten Ergebnisse verwendet.(2, 9, 103, 104)

1) **DOB**–Wert in [‰] zu unterschiedlichen Testzeiten

DOB-Wert (Delta over baseline): Differenz zwischen dem Deltawert (δ_s) einer nach Methacetingabe entnommenen Atemprobe und dem Deltawert (δ_t) einer vor Substanzgabe entnommenen Atemprobe.

2) TMax des Atemtests

Die TMax gibt das Zeitintervall bis zum Maximum des DOB Werts an.

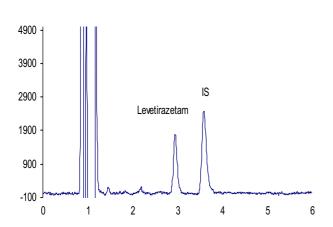
3) LiMAx Wert wird wie folgt berechnet:

$$LiMAx = \frac{DOB_{max} \cdot R_{PDB} \cdot P \cdot M}{BW}$$

Das Resultat wird in $[\mu g/kg/h]$ angegeben. R_{PDB} ist der Standard- $^{13}C/^{12}C$ -Ratio $(R_{PDB}=0.011237)$, P steht für die angenommene CO_2 -Produktionsrate (300 [mmol/h] • Körperoberfläche), M repräsentiert die molare Masse von ^{13}C -Methacetin und BW steht für das Körpergewicht in kg der zu untersuchenden Person.(9)

5.4. Untersuchung der Pharmakokinetik im Serum

Die Serumpharmakokinetik wurde mittels Blutentnahme und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Die HPLC Messungen wurde am Pharmakologischen Institut der Charité, Campus Mitte, durchgeführt. Hierfür wurde eine Messreihe für Leveritazetam, ein Antiepileptikum, genutzt. (Abb. 11 und 12) Dies bot sich an, da ¹³C-Methacetin und Leveritazetam eine nahezu identische Polarität aufweisen und so diese schnelle UV-Absorptionsmethode, die schon vorhanden ist, genutzt werden kann. Der Flow beträgt 1,5 ml/min, die UV-Absorption 260nm bei einer Laufzeit von 13 Minuten. Zur Probenvorbereitung wurden zu 50 μl Serum mit 100 μl Fällungsreagenz (Acetonitril/ Methanol, 50/50) gemischt, zentrifugiert und 10 μl des Präparates in die Anlage filtriert.



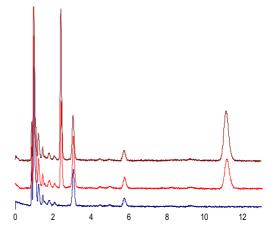


Abbildung 10: Levetirazetam-Messmethodik Chromsystem

Abbildung 11: ¹³C-Methacetin und Paracetamol auf Levetirazetam Methode

Die Kalibrierung beträgt für 13 C-Methacetin und Paracetamol 0,4 und 8 µg/ml, die Sensitivität für beide liegt bei 0,25 µg/ml. Es ist bei dieser Messmethodik von einer Linearität bis zu 100 µg/ml auszugehen.

5.5. Körperliche Belastung zur Erhöhung der CO₂-Produktionsrate

Innerhalb der Studienplanung stellte sich die Frage nach der optimalen körperlichen Belastung um die CO₂-Produktion zu erhöhen. Dabei wurde nach einem geeigneten Belastungsniveau gesucht, dass die Leistungsfähigkeit der Probanden widerspiegelt, diese jedoch nicht überfordert und so den Versuch zum Abbruch bringt. Hier hat sich aus den Voruntersuchungen die Herzfrequenz als sicherer Marker erwiesen.(105, 106) Einerseits ist sie gut vom Probanden über den Brustgurt und dem Pulsmesser selbst kontrollierbar, andererseits sagt die Ruhefrequenz viel über den Leistungsstand aus. Bei gleichbleibender Belastung bzgl. des Widerstandes auf dem Fahrradergometer konnten dadurch standardisierte, reproduzierbare Versuchsbedingungen erreicht werden.

Die individuelle Belastungsintensität wurde so gewählt, dass eine sog. Steady State Belastung erreicht wurde (siehe Abb. 12). Befindet sich eine Belastung im moderaten/leichten Belastungsniveau, so kann die Sauerstoffschuld auf einem niedrigen Niveau gehalten werden, so dass die Regeneration bis zum Ruhepuls schnell erreicht wird.

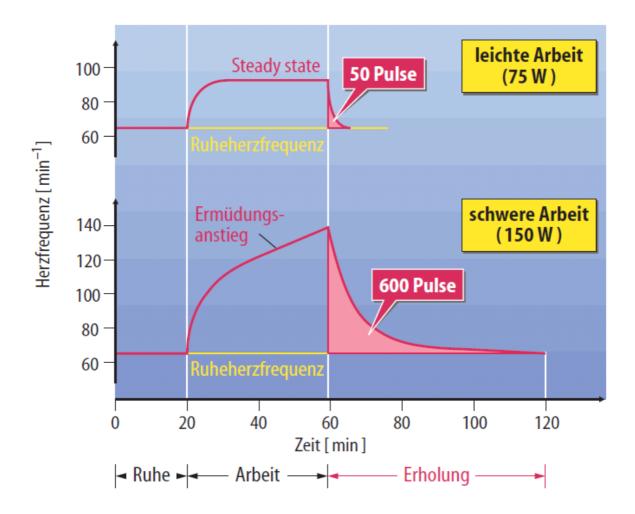


Abbildung 12: Verhalten der Herzfrequenz bei Probanden durchschnittlicher Leistungsfähigkeit während leichter und schwerer dynamischer Arbeit mit konstanter Leistung (rot: Erholungssumme).

Aus Löffler, Georg, Petrides, Petro E., Heinrich, Peter C.: Biochemie& Pathobiochemie, Springer Verlag; 8. Auflage, 2007

Wird jedoch ein Belastungsniveau oberhalb dieser Grenze erreicht, so muss der Organismus aufgrund der vermehrten CO₂-Produktion und dessen Abbau eine höhere Sauerstoffschuld eingehen. Dadurch wird der Ruhepuls erst deutlich später erreicht.

Dazu kommt, dass bei körperlicher Arbeit zwischen Belastungen oberhalb und unterhalb der Lactatschwelle unterschieden werden muss. Lactat spielt als Abbauprodukt der anaeroben Glykolyse eine richtungsweisende Rolle in der Leistungsdiagnostik des zu untersuchenden Organismus. Barstow et al. haben zeigen können, dass der CO₂-Haushalt und die Kinetik innerhalb der Kompartimente sehr sensibel auf Unterschiede im Stoffwechsel durch körperliche Arbeit reagiert.(93) Dabei spielt das eigentliche Belastungslevel eine bedeutende Rolle. Einerseits wird durch das hohe Belastungslevel eine vermehrte Sauerstoffschuld

eingegangen und die dadurch geforderte anaerobe Glykolyse fördert eine erhöhte Produktion von Lactat, andererseits führt eine geringe Belastungsstufe zu vermeintlich geringer CO₂-Produktion, die ein wichtiger Teilaspekt der Studie darstellt.

Wir haben uns in dieser Studie dazu entschieden einen Mittelweg zu gehen: Dabei konnten wir einerseits eine nicht zu hohe Belastung eingehen, da es aufgrund der erschwerten Atembedingungen (Maske) zu einer erhöhten Abbruchrate kommen konnte, jedoch die erhöhte CO₂-Produktion eine Maxime zur Beurteilung der Verteilung des ¹³CO₂ war. Von daher ergab sich im Zusammenhang mit Voruntersuchungen ein standardisierter Wert von

Ruheherzfrequenz x 1.9 = kontinuierliche Belastung unterhalb der anaeroben Schwelle

Dabei haben die Probanden mit Beginn der Zeit auf dem Fahrradergometer in kontinuierlicher Weise den Puls so schnell wie möglich erreicht um mit Belastungsende abrupt mit der körperlichen Belastung aufzuhören.

Die Zeiten der Belastung ergaben sich aus der Idee heraus, den möglichen Verdünnungseffekt (Messung 2 und 3 = ab 50.- 60. Minute) des ¹³C-Methacetins zu untersuchen. Dabei wurde vor allem beobachtet, wie das ¹³CO₂ sich auch nach Beendigung der Belastung bzgl. seines DOB-Wertes verhält. Bei der Messung 4 und 5 kam es zu einer halbstündigen Belastung direkt zu Beginn des Testes. Interessant war hierbei, inwieweit sich die Pharmakokinetik im Zusammenhang mit der Abatmungskinetik durch die erhöhte CO₂-Produktion der Muskulatur verhält.(107)

5.6. Statistische Auswertung

Die Datendarstellung erfolgt als Median mit Minimum und Maximum. Gruppenunterschiede wurden aufgrund fehlender Normalverteilung (Kolmogorow-Smirnow-Test) ausschließlich nicht-parametrisch mittels Wilcoxon Test für verbundene Stichproben und Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Pearson Korrelationskoeffizient. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der erfolgten Messergebnisse dem zunächst Korrelationsanalysen mit Pearson Korrelationskoeffizient. Zusätzlich erfolgte für jeden Parameter eine Berechnung des Variationskoeffizienten (Verhältnis aus Standardabweichung und Mittelwert), sowie der Intraklassen-Korrelationskoeffizienten (ICC) in einem zweifach gemischtem Modell.(108) Übereinstimmung wurde als schlecht (ICC 1/4 = 0.00e0. - 0,40), mittel (ICC = 0,40 - 0,59), gut (ICC = 0.60 - 0.74) und exzellent (ICC = 0.75 - 1.00) bewertet. Zur Besserungen optischen Beurteilbarkeit der Reproduzierbarkeit des LiMAx Tests wurde dieser zusätzlich als Bland Altman Plot dargestellt. (109, 110) Eine statistische Signifikanz wurde ab einem Wert von p<0.05 akzeptiert (beidseitig). Alle Ergebnisse sind nicht-beweisend in Übereinstimmung mit dem Studiendesign.

Die Analyse wurde mit Hilfe von IBM SPSS 23 durchgeführt.

Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgte anhand folgender Formeln:

Eliminationskonstante k

$$k = \frac{\ln C(1) - \ln C(2)}{\Delta t}$$

- C(1) Konzentration zum Zeitpunkt t1 (10 Minuten nach Injektion)
- C(2) Konzentration zum Zeitpunkt t2 (60 Minuten nach Injektion)

Δt Zeitdifferenz zwischen C1 und C2

Halbwertszeit

$$t^{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

6. Ergebnisse

Im Zeitraum Oktober bis Dezember 2008 wurden insgesamt 27 freiwillige Probanden in die Studie eingeschlossen. Nach der Untersuchung der ersten drei Probanden wurde nochmals minimale Veränderungen am Prüfungsprotokoll in der Dauer und Art der körperlichen Belastung vorgenommen sowie die Methodik zur HPLC-Messung von ¹³C-Methacetin entwickelt. Daher konnten die Ergebnisse der ersten drei Probanden nicht für die Auswertung herangezogen werden. Weitere vier Probanden widerriefen während der Studiendurchführung ihr Einverständnis und brachen die Studienteilnahme auf eigenen Wunsch ab. Gründe für Studienabbruch waren in allen Fällen persönlicher Natur. Daher wurden diese Probanden ebenfalls von der Datenauswertung ausgeschlossen. Die körperliche Belastung während Messung 3-5 wurde von allen Probanden gut toleriert. Es kam zu keinem Abbruch einer Messung aufgrund körperlicher Erschöpfung. In die Auswertung wurden letztlich 21 Probanden aufgenommen. Die detaillierten Probandencharakteristika sind in Tabelle 6 dargestellt.

Bei zwei Probanden führten Probleme bei der Atemgasanalyse (zu niedrige CO₂ Werte) zu nicht-konklusiven Messergebnissen bei jeweils einer Messung (1x Messung 1, 1x Messung 2). Daher wurden die DOB Werte dieser beiden Messungen aus der Auswertung ausgeschlossen. Hierdurch fehlen 2 Messwerte für die Analyse der Produzierbarkeit.

Tabelle 6: Probandencharakteristika

Probanden ausgewertet	21
Geschlecht	4 Frauen, 17 Männer
Alter [Jahre]	28 (21-47)
Größe [cm]	179 (162 – 198)
Gewicht [kg]	74 (50 – 98)
Body Mass Index	23 (18,9 – 29,6)
Sportliche Aktivitäten / Woche	3 (2 – 5)

Die laborchemische Untersuchung der Probanden bei den Messungen 1 und 5 ergaben fast ausschließlich Werte im Normbereich. Eine detaillierte Darstellung ist in Tabelle 7 aufgeführt. Bei drei Probanden fanden sich isoliert-erhöhte Bilirubin Werte im Serum. Die

Werte blieben vor den Studienmessungen und danach konstant erhöht. Kein Anhalt für eine klinisch relevante Lebererkrankung konnte anamnestisch eruiert werden. Die übrigen Laborparameter befanden sich ausnahmslos im Normalwertbereich. Zusammenfassend ergaben sich nach fünfmaliger Injektion von 2 mg/kg ¹³C-Methacetin keinerlei statistisch signifikante Veränderungen der Laborparameter.

Tabelle 7: Laborwerte der Probanden zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe

Parameter	Normwerte	Messung 1 (Studienbeginn)	Messung 5 (Studienende)	p Wert
Natrium	135-145 mmol/L	140 (136-144)	140 (136-140)	0,943
Kalium	3,8-5,2 mmol/L	3,7 (3,4-4,1)	3,8 (3-5)	0,295
Kreatinin	0,84-1,25 mg/dl	0,9 (0,6-1,2)	1,0 (0,6-1,2)	0,866
Harnstoff	14-46 mg/dl	31 (18-43)	29 (21-41)	0,323
Bilirubin	<1,0 mg/dl	0,7 (0,3-2,8)	0,6 (0,2-3,0)	0,299
AST	<50 U/L	28 (21-41)	27 (21-40)	0,687
ALT	<45 U/L	24 (13-41)	23 (10-39)	0,810
GLDH	<6,4 U/L	1,9 (1-6)	2,0 (1-7)	0,522
AP	35-129 U/L	55 (42-79)	59 (30-88)	0,053
GGT	<55 U/L	19 (9-38)	18 (9-50)	0,368
Leukozyten	4,5-11/nl	5,9 (3,9-8,4)	5,9 (4,0-7,8)	0,881
Erythrozyten	3,9-5,4/pl	4,8 (3,9-5,3)	4,7 (3,9-5,2)	0,103
Hämoglobin	12g/dl	14,5 (11,4-15,6)	14,3 (11,4-15,7)	0,138
Hämatokrit	0,35-0,52 l/L	0,43 (0,35-0,47)	0,42 (0,36-0,46)	0,202
Thrombozyten	150-400 /nl	250 (169-305)	259 (175-302)	0,130

6.1. ¹³CO₂-Abatmungskinetik

6.1.1. Kurvenverlauf

Eine Minute nach Injektion von 2 mg/kg KG ¹³C-Methacetin Lösung kam es bei allen Probanden zu einem steilen Anstieg der DOB-Kurve. Im Median wurde bereits nach 7 Minuten ein DOB Maximum von 32,0 (23,5-61,5) ‰ erreicht. Im weiteren Verlauf fielen die DOB Werte ausgehend vom Maximum relativ kontinuierlich ab und erreichten 60 Minuten nach Injektion einen Wert von 20,1 (16,4-24,7) ‰ (siehe Abb. 14). Nach dem Erreichen des Maximums ergibt sich daraus eine Halbwertszeit des DOB von $t_{1/2}$ = 72,2 (41,9-470) Minuten (Messung 1). Vergleicht man die Kurven der einzelnen Probanden miteinander, so sind diese in ihrer Form nahezu identisch (siehe Abb. 13). Bereits innerhalb von zwei Minuten nach Injektion kommt es zu einem raschen Anstieg der Kurve. Das Maximum der DOB Kurve wird bei 19 der 21 Probanden nach 4-11 Minuten erreicht. Ein Proband erreicht das Maximum bereits nach 3,4 Minuten, ein anderer erst nach knapp 27 Minuten. Die Maxima der DOB Werte unterscheiden sich dabei interindividuell erheblich. Es ergab sich eine schwache aber signifikante Korrelation zwischen dem Zeitpunkt und dem Wert des Maximums (r=0,522; p=0,015). Die Spannweite der DOB Werte verringerte sich innerhalb von 30 Minuten deutlich und bleibt bis 60 Minuten konstant. Identische Kurvenverläufe und vergleichbare Einzelwerte wurden bei der Messung 2 bei identischem Testablauf festgestellt.

Die für jeden DOB Messwert berechneten Isotopenwiederfindungsraten analog zur LiMAx Berechnung für Messung 1 werden in Abbildung 15 dargestellt. Die LiMAx Werte lagen zwischen 362 und 914 μg/kg/h mit einem Median von 459 μg/kg/h. Der Median bei Messung 2 lag bei 457 μg/kg/h mit einer Spannweite von 322 bis 987 μg/kg/h. Die individuellen Kurvenverläufe waren mit der DOB Kurve identisch.

Unter körperlicher Belastung im Zeitraum Minute 50-60 (Messung 2) fielen die DOB Werte von 19,3 (13,2-24,7) ‰ innerhalb von 10 Minuten auf 11,0 (6,4-14,1) ‰ (siehe Abb. 15; p<0,001). Die DOB Werte 60 Minuten nach Testbeginn waren folglich deutlich geringer als bei Messung 1 ohne die körperliche Belastung (Wert siehe oben; p<0,001). Nach Ende der körperlichen Belastung stiegen dann die DOB Werte innerhalb von 10 Minuten wieder auf 16,7 (11,4-23) ‰ an (p<0,001) und liegen wieder innerhalb der normalen Abatmungskurve.

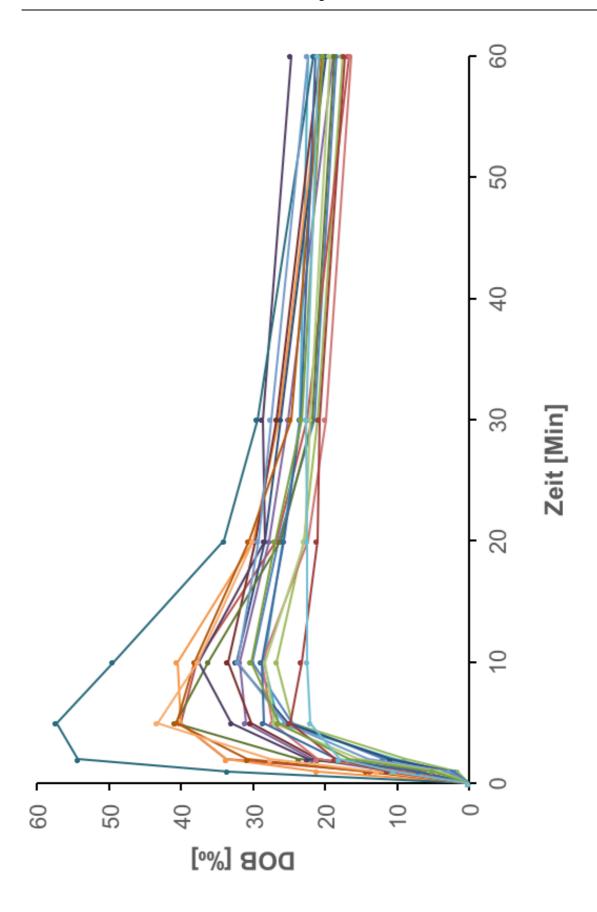


Abbildung 13: Individuelle DOB Kinetik von 20 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg $KG^{13}C$ -Methacetin (Messung 1).

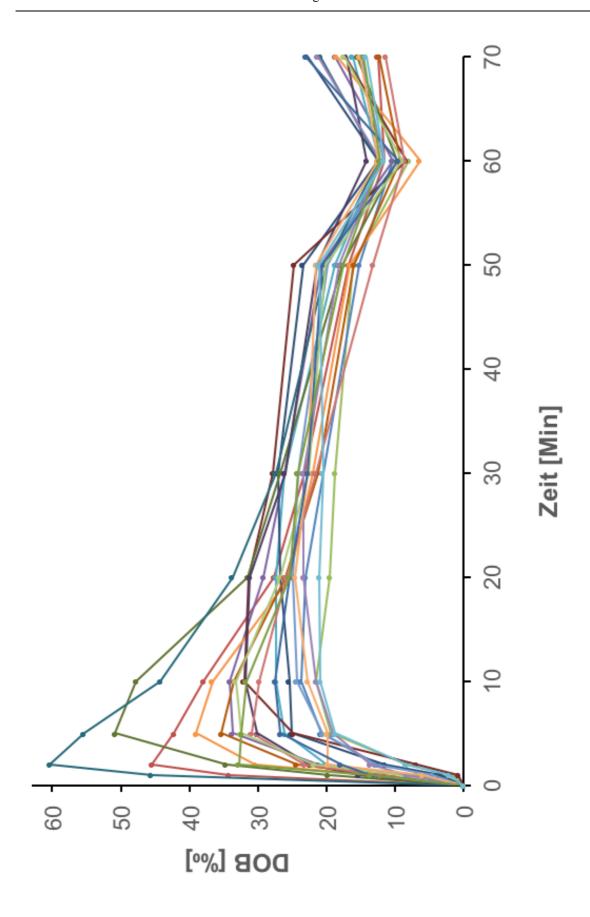


Abbildung 14: Individuelle DOB Kinetik von 20 Probanden nach Injektion von 4 mg/kg $KG^{13}C$ -Methacetin (Messung 3).

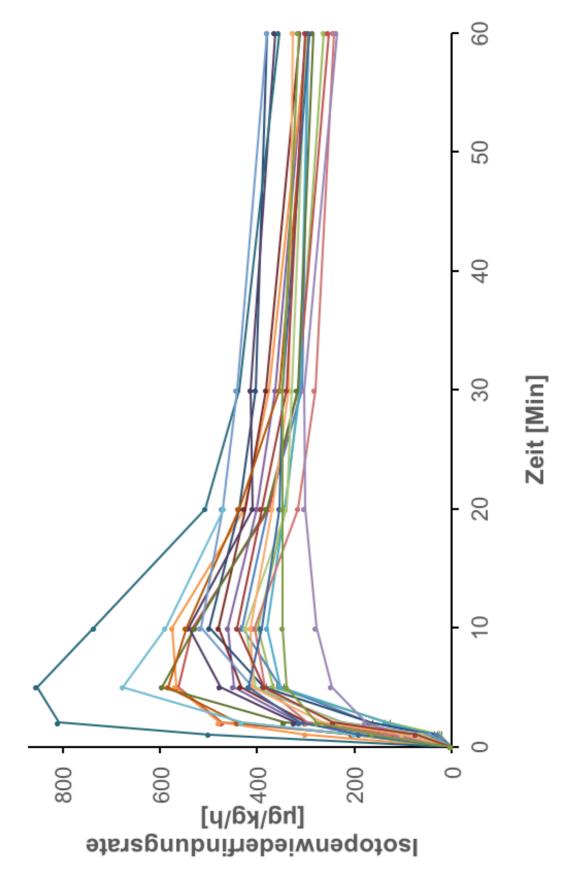


Abbildung 15: Individuelle Isotopenwiederfindungsraten von 20 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg KG ¹³C –Methacetin (Messung 1). Die Berechnung der einzelnen Kurvenwerte erfolgte analog zur LiMAx Berechnungsformel für jeden Messzeitpunkt.

6.1.2. Reproduzierbarkeit

In einem nächsten Schritt wurden die intraindividuellen Unterschiede ausgewählter Messparameter zwischen Messung 1 und 2 analysiert und somit die Reproduzierbarkeit des Tests untersucht. Aufgrund der o.g. fehlerhaften Messungen konnten nur 19 Probanden ausgewertet werden. In Abbildung 16 werden die medianen Kurven von Messung 1 und 2 im Vergleich dargestellt. Es zeigten sich nahezu identische Verläufe beider Kurven.

Für das DOB Maximum (DOBmax) errechnete sich ein linearer Korrelationskoeffizient von r=0,781 (p<0,001; siehe Abb. 17) und für den Zeitpunkt des Maximums (TMax) von r=0,878 (p<0,001, siehe Abb. 18).

Der Intraklassen-Korrelationskoeffizienten (ICC) betrug für DOBmax 0,874 (95% Konfidenzintervall 0,679 – 0,951) mit einem Variationskoeffizienten von 8,71%, für TMax 0,711 (95% Konfidenzintervall 0,283 – 0,887) mit einem Variationskoeffizienten von 11,43%.

Die intraindividuellen LiMAx Variabilität wurde zusätzlich in einem Bland-Altman-Plot dargestellt (siehe Abb. 19). Achtzehn der 19 ausgewerteten Probanden (95%) lagen hier innerhalb des 95% Konfidenz Intervalls. Die intraindividuellen Abweichungen betrugen bis maximal 100 μg/kg/h. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der intraindividuellen Abweichung und der Höhe der Messwerte. Der Intraklassen-Korrelationskoeffizienten (ICC) betrug für LiMAx 0,919 (95% Konfidenzintervall 0,789 – 0,969) mit einem Variationskoeffizienten von 7,47%.

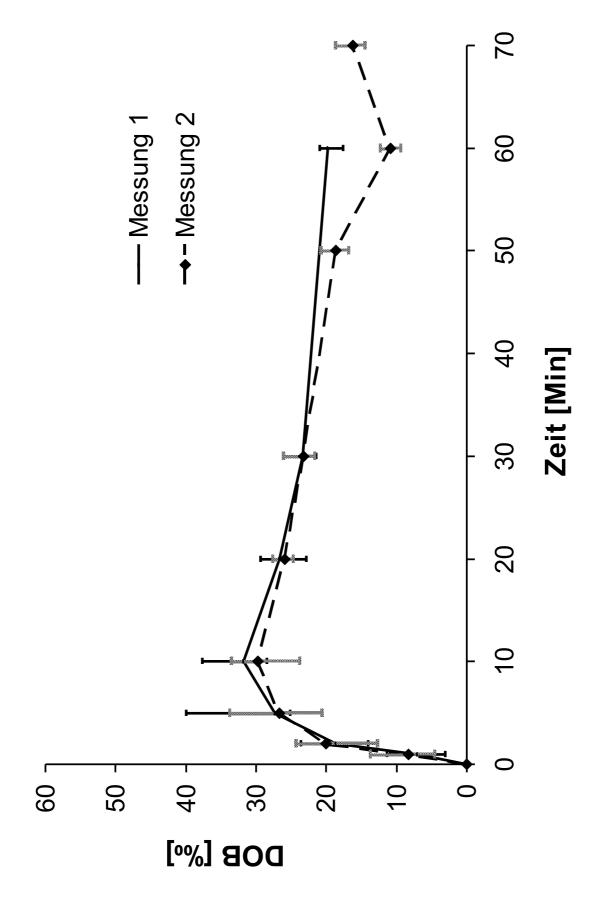


Abbildung 16: Vergleich der mittleren DOB Kinetik für identische Dosierungen von 2 mg/kg KG (Messung 1 und 2). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

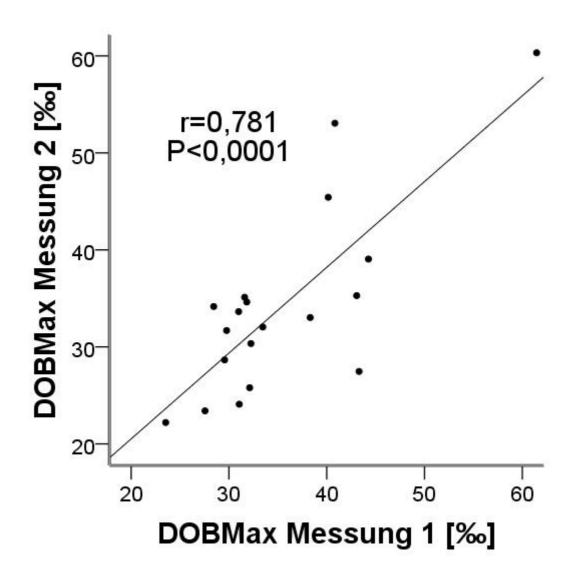


Abbildung 17: Korrelation von DOBmax zwischen Messung 1 und 2.

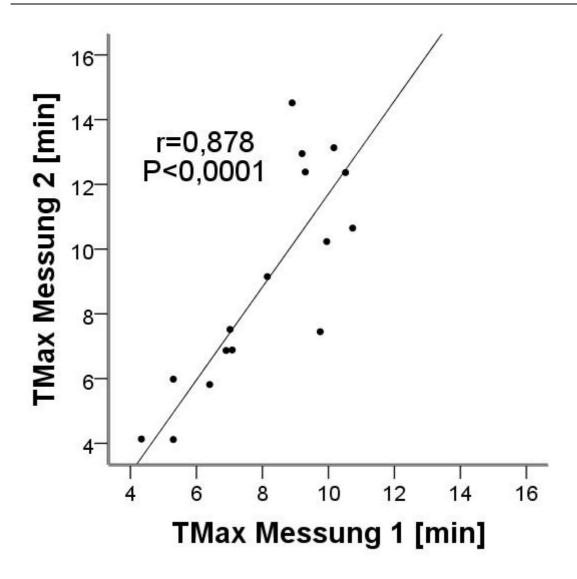


Abbildung 18: Korrelation von TMax zwischen Messung 1 und 2.

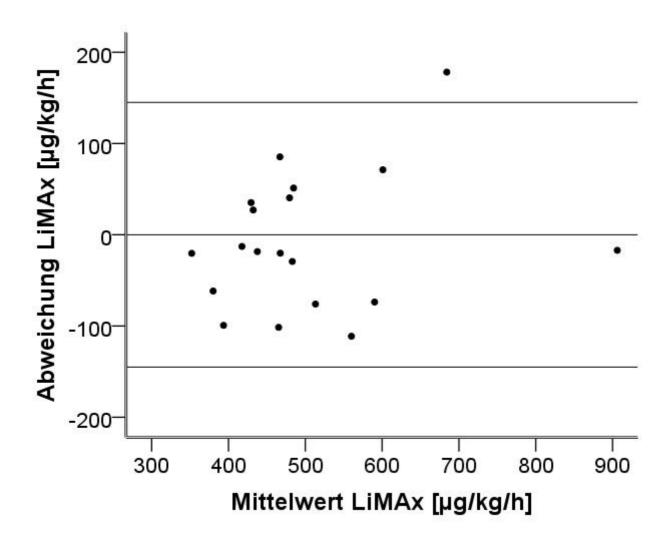


Abbildung 19: Bland-Altman-Plot für die Reproduzierbarkeit des LiMAx Wertes an Messung 1 und 2.

6.1.3. Dosisabhängigkeit

In Abbildung 20 werden die DOB Kurve der Messung 2 (2 mg/kg KG) und die der Messung 3 (4 mg/kg KG) im Vergleich dargestellt. Die Kurvenverläufe sind in ihrer Form identisch. Allerdings ergibt die doppelte Dosierung des Substrats eine ungefähre Verdoppelung der DOB Werte. Von einem maximalen DOB von 32,5 (22,2-60,3) ‰ bei 2 mg/kg KG auf 56,8 (32,0-113,3) ‰ bei 4 mg/kg KG. Die zeitliche Komponente der Kurve ist jedoch deutlich geringer verändert. Bei beiden Zeitpunkten wurde das DOB Maximum nach etwa 10 Minuten erreicht. Die DOB Werte gingen gleichartig innerhalb von 50 Minuten zurück bis auf 19,3 (13,2-24,7) ‰ für 2 mg/kg KG sowie 37,9 (26,3-47,1) ‰ für 4 mg/kg KG. Hieraus ergibt sich daraus eine Halbwertszeit des DOB für 4 mg/kg KG von t½= 62,4 (28,0-510) Minuten. Auch die DOBmax und TMax Werte für 2 bzw. 4 mg/kg KG korrelierten eng miteinander (r=0,763;

p<0,001 für DOBmax siehe Abb. 21; r=0,556; p=0,011 für TMax siehe Abb. 22). Des Weiteren zeigte sich eine Korrelation zwischen DOBmax und der Halbwertszeit (r=-0,46; p=0,022), jedoch nicht zwischen DOBmax und dem DOB Wert nach 60 Minuten (r=0,24; p=0,16).

Die körperliche Belastung bei der Dosierung von 4 mg/kg KG (Messung 3) auf die DOB Kinetik wirkte sich gleichsinnig wie bei 2 mg/kg KG aus: Unter der körperlicher Belastung im Zeitraum Minute 50-60 (Messung 3) fielen die DOB Werte von 37,9 (26,3-47,1) ‰ innerhalb von 10 Minuten auf 19,4 (13,4-27,5) ‰ (siehe Abb. 20; p<0,001). Nach Ende der körperlichen Belastung stiegen die DOB Werte dann innerhalb von 10 Minuten wieder auf 27,3 (14,2-32,8) ‰ an (p<0,001).

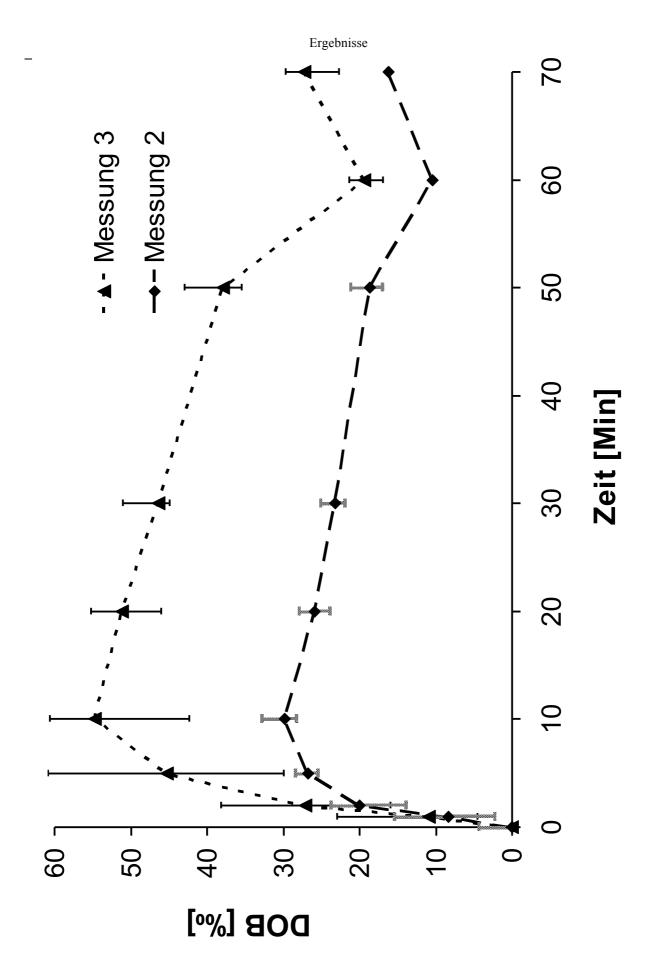


Abbildung 20: Vergleich der mittleren DOB Kinetik für unterschiedliche Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 2 und 3). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

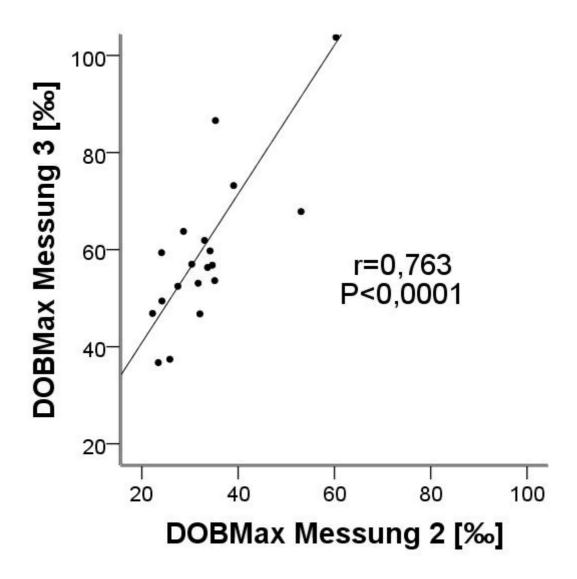


Abbildung 21: Korrelation von DOBmax zwischen Messung 2 und 3.

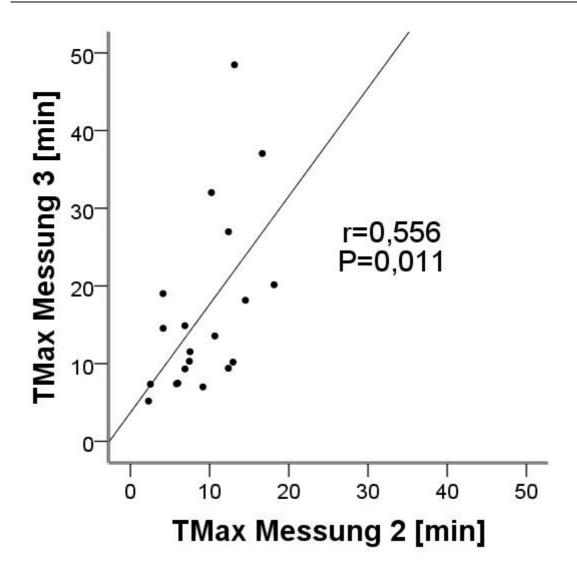


Abbildung 22: Korrelation von TMax zwischen Messung 2 und 3.

6.2. Substratpharmkokinetik von ¹³C-Methacetin im Serum

6.2.1. Kurvenverlauf

Der im Blut gemessene ¹³C-Methacetinspiegel bei einer Dosierung von 2 mg/kg KG lag 30 Sekunden nach Injektion bei 7,7 (2,1-27,1) mg/L. Eine Minute nach Injektion lag der Spiegel bei 9,8 (1,2-18,9) mg/L. Innerhalb von 10 Minuten kam es zu einem raschen Abfall der Blutspiegel auf 2,6 (1,7-4,3) mg/L. Im weiteren Verlauf gingen die Werte innerhalb von 60 Minuten nach Injektion kontinuierlich bis auf 0,8 (0,4-1,2) mg/L zurück (individuelle Kurven siehe Abb. 23). Hierbei nahm die interindividuelle Variabilität der Spiegel im Verlauf deutlich ab. Hieraus lässt sich eine Halbwertszeit von t½=29,2 (19,4-54,3) Minuten berechnen. Die Höhe der ¹³C-Methacetinspiegel nach Injektion hatte keinen Einfluss auf die DOBmax

und LiMAx Werte, sowohl unmittelbar nach Injektion (r=0,05 für DOBmax; r=-0,08 für LiMAx) als auch 1 Minute nach Injektion (r=0,05 für DOBmax; r=0,02 für LiMAx). Allerdings zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der individuellen Halbwertszeit und dem DOBmax (r=-0,46; p=0,021) und dem LiMAx (r=-0,40; p=0,041).

Bei der Messung 2 unter körperlicher Belastung zwischen der 50. und 60. Minute konnte kein Einfluss auf die ¹³C-Methacetin Kinetik festgestellt werden. Die Werte unterschieden sich nach 60 Minuten nicht von denen bei Messung 1 ohne Sport (0,8 vs. 0,9 mg/L; p=0,83).

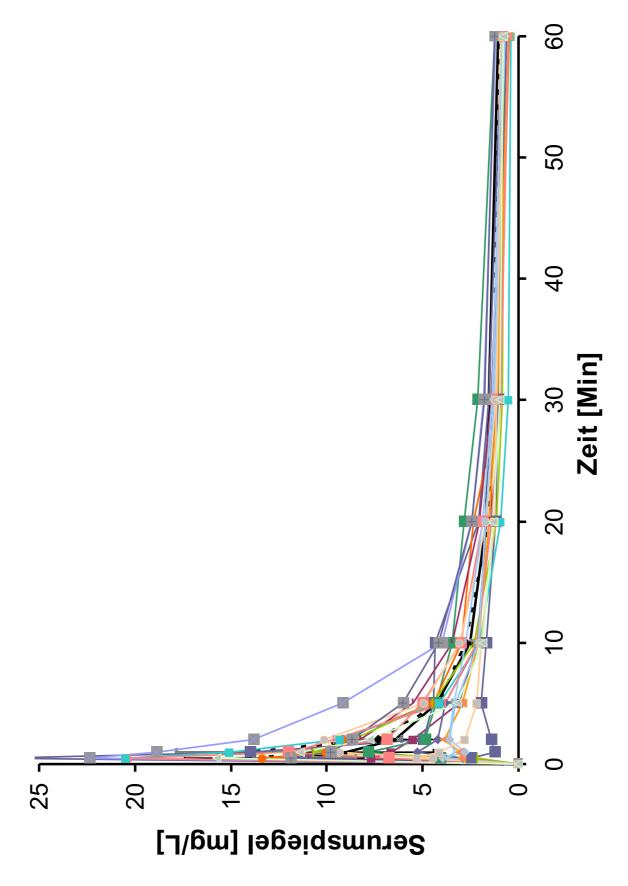


Abbildung 23: Individuelle Substratpharmakokinetik von ¹³C-Methacetin im Serum bei 21 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg KG (Messung 1).

6.2.2. Reproduzierbarkeit

Auch die intra- und interindividuelle Reproduzierbarkeit wurde für die Substratpharmakokinetik von ¹³C-Methacetin im Serum untersucht. Bei den initialen Spiegeln 30 Sekunden nach Injektion zeigte sich eine große intraindividuelle Variabilität (Korrelation r=-0,12). Allerdings ließen sich die Spiegel nach einer Minute bereits mittelgradig reproduzieren (ICC 0,488; 95% Konfidenzintervall 0 - 0,797; Variationskoeffizient 24,03%) und waren nach 60 Minuten sehr gut reproduzierbar (ICC 0,832; 95% Konfidenzintervall 0,571 - 0,934; Variationskoeffizient 13,64%)

Auch die berechneten Halbwertszeiten waren reproduzierbar mit 29,1 (19,4-54,3) Minuten bei Messung 1 und 32,1 (19,5-44,8) Minuten bei Messung 2 (ICC 0,566; 95% Konfidenzintervall 0 - 0,831; Variationskoeffizient 11,86%).

Die Kurvenverläufe der mittleren ¹³C-Methacetinspiegel im Serum waren sehr gut reproduzierbar (siehe Abb. 24): ¹³C-Methacetinspiegel nach einer Minute von 9,8 (1,22-18,9) mg/L bei Messung 1 und 9,2 (2,7-23,1) mg/L bei Messung 2, sowie nach 60 Minuten von 0,8 (0,4-1,2) mg/L und 0,9 (0-1,3) mg/L, entsprechend. Es zeigte sich kein Einfluss der wiederholten ¹³C-Methacetin Gabe innerhalb von 2 Tagen.

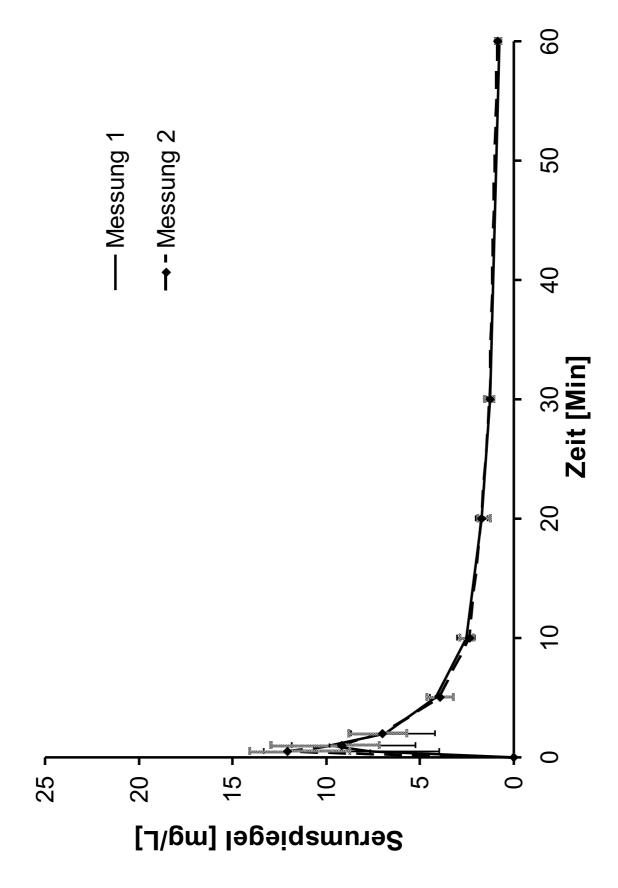


Abbildung 24: Reproduzierbarkeit der Substratpharmakokinetik von ¹³C-Methacetin im Serum 2 mg/kg KG (Messung 1 und 2). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

6.2.3. Dosisabhängigkeit

Nach Injektion von 4 mg/kg KG ergab sich eine identische ¹³C-Methacetin Kinetik wie bei 2 mg/kg KG: Die initialen Spiegel nach 30 Sekunden lagen bei 19,4 (5,5 -85,3) mg/L, nach einer Minute bei 17,6 (4,6-37,0) mg/L, und waren damit fast exakt doppelt so hoch wie nach 2 mg/kg KG. Ebenso rasch kam es zu einem Abfall auf 6,2 (3,1-10,9) mg/L innerhalb von 10 Minuten. Die interindividuelle Variabilität der Spiegel nahm im Verlauf der ersten Stunde nach Injektion deutlich ab (siehe Abb. 25). Nach 60 Minuten lagen die Spiegel schließlich bei 1,8 (0,7-3,4) mg/L und somit immer noch fast exakt doppelt so hoch wie bei halber Dosierung. Hieraus ließ sich eine Halbwertszeit von t_½=31,9 (22,5-61,3) Minuten berechnen, welche exakt mit der bei halber Dosierung übereinstimmt. Der maximal Spiegel nach 1 Minute korrelierten ebenfalls eng zwischen der Dosierung 2 und 4 mg/kg KG (r=0,70; p<0,001). Die mittlere Kinetik für 2 und 4 mg/kg KG ist in Abb. 26 dargestellt.

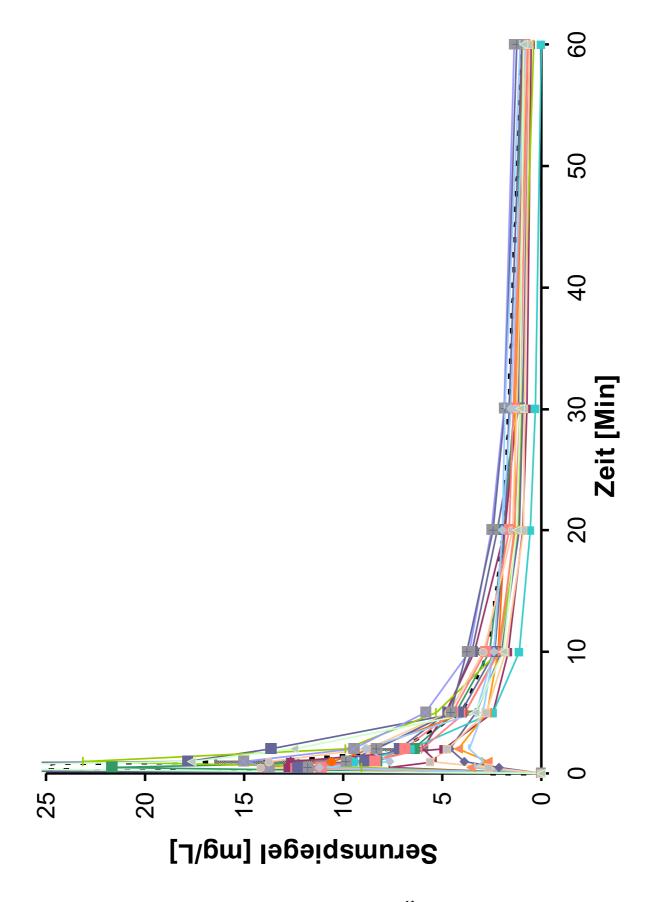


Abbildung 25: Individuelle Substratpharmakokinetik von ¹³C-Methacetin im Serum bei 21 Probanden nach Injektion von 4 mg/kg KG (Messung 3).

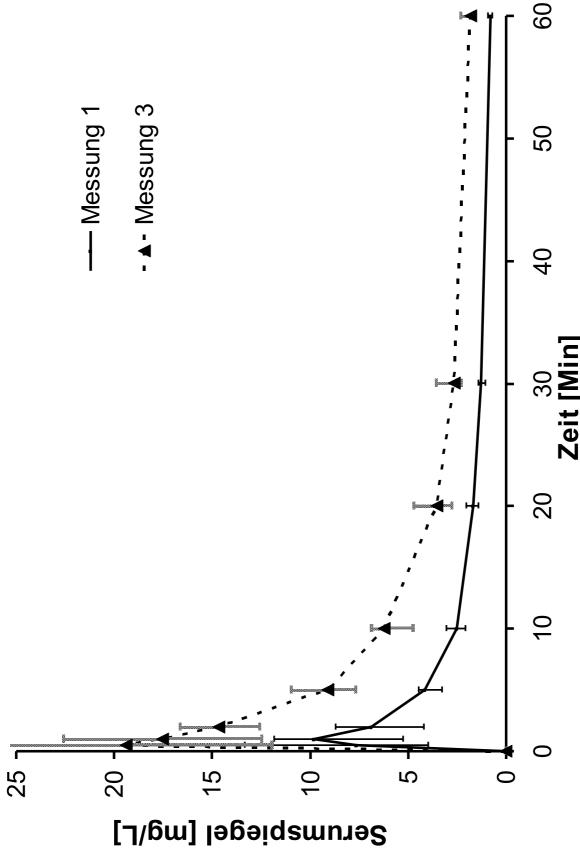


Abbildung 26: Vergleich der Substratpharmakokinetik von ¹³C-Methacetin im Serum für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 1 und 3). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

6.3. Produktpharmakokinetik von Paracetamol im Serum

6.3.1. Kurvenverlauf

Nach der Injektion von ¹³C-Methacetin war Paracetamol im Blut bei 2 Probanden (10%) nach einer Minute nachweisbar, bei insgesamt 14 Probanden (66%) nach 2 Minuten, bei insgesamt 20 Probanden (95%) nach 5 Minuten, nur bei einem Patienten wurde Paracetamol in der Blutentnahme nach 10 Minuten erstmals nachgewiesen. Allerdings wurde der Maximalspiegel bereits nach 10 (5-60) Minuten mit 1,5 (0,2-2,6) mg/L erreicht. Nach dem frühen Maximum kam es zu einem langsamen Rückgang der Spiegel bis auf 1,0 (0,5-1,6) mg/L nach 60 Minuten. Die individuellen Kinetiken waren in ihrer Form im Gegensatz zu DOB und ¹³C-Methacetin sehr unterschiedlich (Abb. 27): Bei den meisten untersuchten Probanden ähnelte die Kinetik stark der DOB Kinetik mit einem steilen Anstieg, einem frühen Maximum nach etwa 5-10 Minuten und danach einem langsamen Rückgang der Werte. Es gab jedoch 2 Probanden, bei denen das Maximum der Paracetamol Spiegel erst nach 30 Minuten und bei zwei weiteren, bei denen das Maximum erst nach 60 Minuten erreicht wurde. Allerdings ergab sich kein statistischer Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Maximum der Paracetamolspiegel und anderen Messparametern wie TMax und DOBmax.

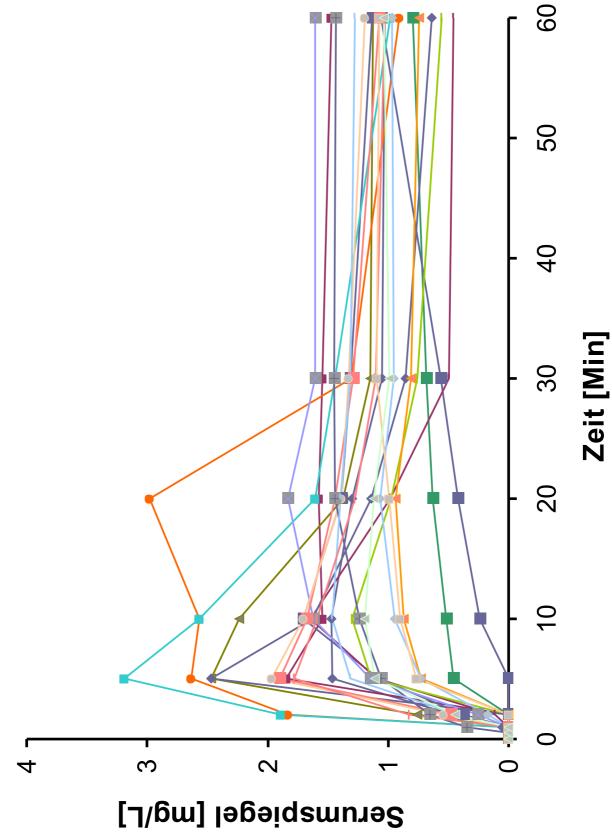


Abbildung 27: Individuelle Produktpharmakokinetik von Paracetamol im Serum bei 21 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg KG ¹³C-Methacetin (Messung 1).

6.3.2. Reproduzierbarkeit

Bei Messung 2 wurde ein Maximum von 1,3 (0,5-2,7) mg/L nach 10 Minuten erreicht. Die intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Paracetamol Serumspiegel war im Bereich des Maximums nach 5 sehr gut (ICC 0,923; 95% Konfidenzintervall 0,801 - 0,970; Variationskoeffizient 27,15%), nach 10 Minuten allerdings schon deutlich geringer (ICC 0,708; 95% Konfidenzintervall 0,232 - 0,888; Variationskoeffizient 27,63%).

Es zeigte sich kein Einfluss der wiederholten ¹³C-Methacetin Gabe innerhalb von 2 Tagen (Abb. 28).

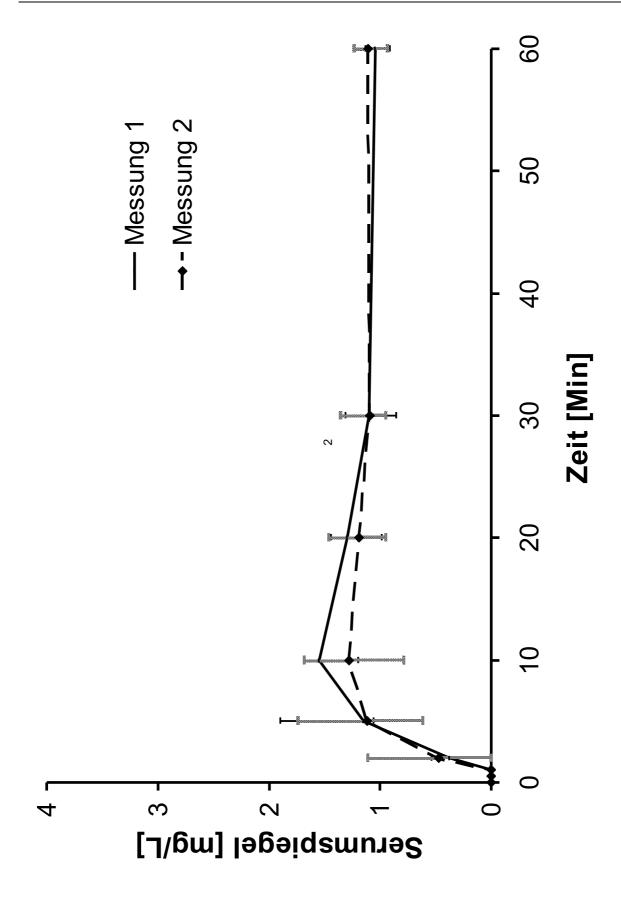


Abbildung 28: Reproduzierbarkeit der Produktpharmakokinetik von Paracetamol für die Dosierung von 2 mg/kg KG (Messung 1 und 2). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

6.3.3. Dosisabhängigkeit

Nach Injektion von 4 mg/kg KG ¹³C-Methacetin ergab sich vom Kurvenverlauf her eine identische Paracetamolkinetik wie bei 2 mg/kg KG: Es wurde ebenfalls nach 10 Minuten ein Maximum bestimmt, welches mit 2,6 (0,6-6,3) mg/L etwa doppelt so hoch war wie bei halber Dosierung. Die Maxima lagen ebenfalls zwischen 5 und 60 Minuten (Abb. 29). Nach 60 Minuten lagen die Paracetamol Spiegel noch bei 2,3 (1,3-2,8) mg/L (Abb. 30).

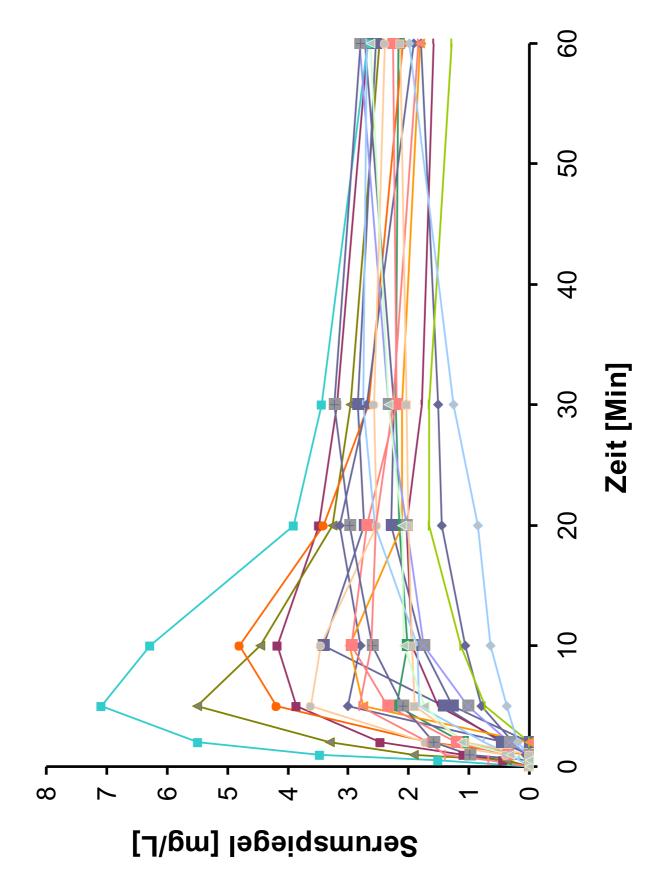


Abbildung 29: Individuelle Produktpharmakokinetik von Paracetamol bei 21 Probanden nach Injektion von 4 mg/kg KG 13 C-Methacetin (Messung 3).

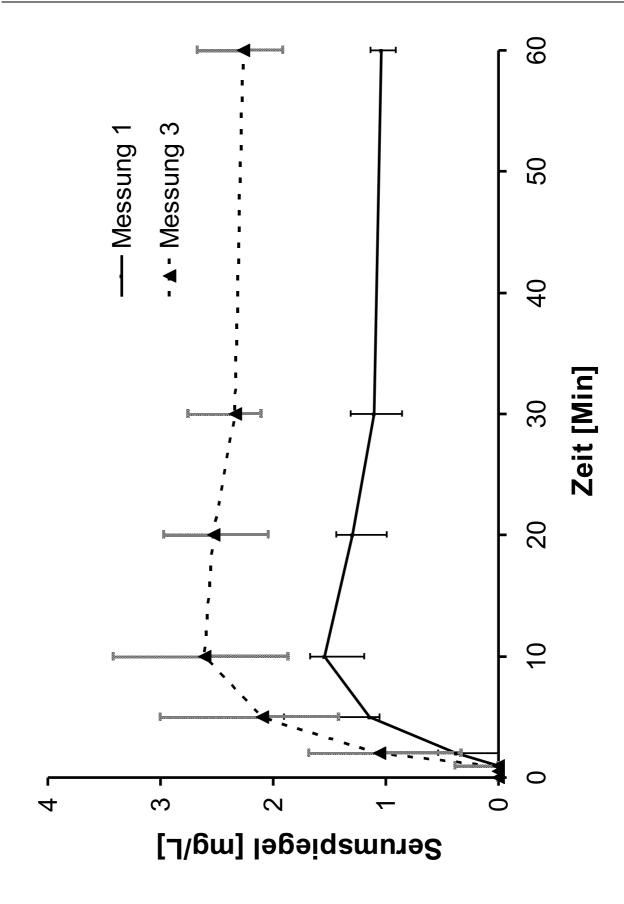


Abbildung 30: Vergleich der Produktpharmakokinetik von für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 1 und 3). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

6.4. Zusammenfassender Vergleich der Kinetiken

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten pharmakokinetischen Kenngrößen für das Substrat ¹³C-Methacetin und seine Abbauprodukte dargestellt. Es zeigt sich einerseits, dass die Maximalwerte und der Zeitpunkt der Maximalwerte bei gleicher Dosierung sehr gut reproduzierbar sind. Die Maximalwerte sind proportional dosisabhängig im verwendenten Dosierungsbereich. Die Halbwertszeiten sind unabhänigig von der Dosierung sehr gut reproduzierbar.

Tabelle 8: Vergleich der untersuchten Parameter über Messungen 1-3

Messung [Nr]	1	2	3			
Dosierung [mg/kg] KG	2	2	4			
Maximum Wert						
DOBmax [‰]	32,0 (23,5-61,5)	32,5 (22,2-60,3)	56,8 (32,0-113,3)			
Methacetin [mg/L]	9,8 (1,2-18,9)	9,2 (2,7-23,1)	17,6 (4,6-37,0)			
Paracetmol [mg/L]	1,5 (0,5-2,6)					
TMax [Minuten]						
DOBmax	7,1 (3,4-10,7)	8,3 (2,3-18,1)	13,6 (5,2-48,5)			
Methacetin	0,5-1	0,5-1	0,5-1			
Paracetmol	10 (5-60)	20 (5-60)	20 (5-60)			
Halbwertszeit [Minuten]						
DOB	72,2 (41,9-470)	62,2 (28,0-510)	61,1 (28,7-323)			
Methacetin	29,1 (19,4-54,3)	32,1 (19,5-44,8)	31,9 (22,5-61,3)			

Skaliert man die Kurvenverläufe der Abbauprodukte DOB (entspricht dem ¹³CO₂) und Paracetamol optimal, zeigt sich ein paralleler Kurvenverlauf über die gesamte Messdauer für beide untersuchten Dosierungen (siehe Abb. 31).

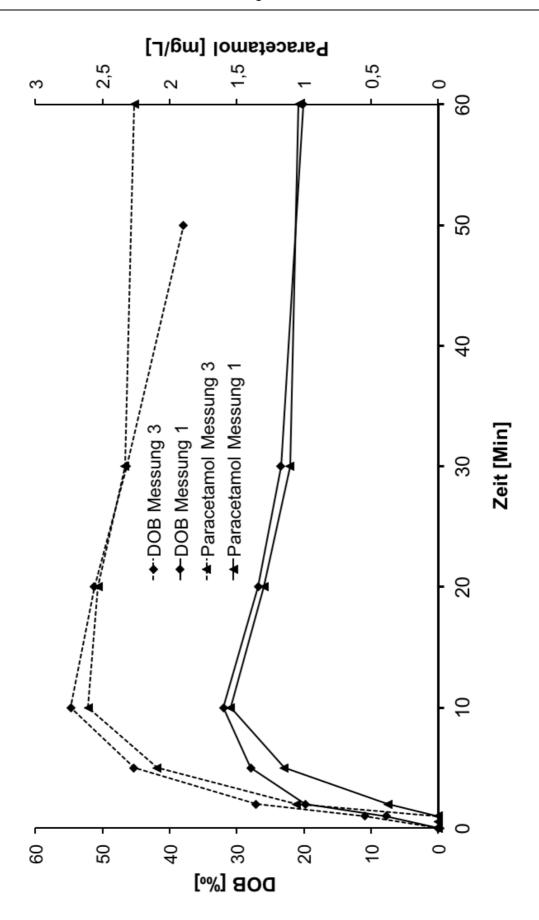


Abbildung 31: Vergleich der Metabolisierungsprodukte von ¹³C-Methacetin (DOB und Paracetamol) für Dosierung von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 1 und 3).

6.5. Einfluss von erhöhter CO₂ Produktion

Der Einfluss wurde zunächst im Zeitraum Minute 50-60 nach ¹³C-Methacetin Injektion untersucht (Messung 2 und 3). Hier konnte lediglich ein Effekt auf die DOB Kinetik festgestellt werden: Unter der körperlicher Belastung fielen die DOB Werte von 19,3 (13,2-24,7) ‰ (Messung 2) bzw. 37,9 (26,3 – 47,1) ‰ (Messung 3) innerhalb von 10 Minuten auf 11,0 (6,4-14,1) ‰ (p<0,001; Messung 2) bzw. 19,4 (13,4-27,5) ‰ (p<0,001; Messung 3). Nach Beendigung der körperlichen Belastung stiegen dann die DOB Werte innerhalb von 10 Minuten wieder auf das Niveau der normalen Abatmungskurve an (siehe Abschnitt 4.1).

Bei den Messungen unter kontinuierlicher körperlicher Belastung zeigte sich bei beiden Dosierungen eine vollständig andere DOB Kinetik als bei den vorangegangenen Messungen in Ruhe. Die DOB Werte stiegen innerhalb von 2 Minuten ebenfalls relativ steil an, wonach sich der Kurvenverlauf deutlich abflachte und nach 60 Minuten ein Maximum von 17,6 (14,5-20,8) ‰ bei 2 mg/kg KG, bzw. von 35,0 (28,4-44,3) ‰ bei 4 mg/kg KG erreicht wurde (Abb. 32). Die DOB Max erreichten somit nur etwa 60% der Maxima bei Messungen in Ruhe (Messung 1 vs. 4 P<0,001; Messung 3 vs. 5 P<0,001).

Die Kinetik des ¹³C-Methacetin unterschied sich vom Kurvenverlauf nicht zwischen Messungen in Ruhe und unter körperlicher Belastung (Abb. 33). Auch die Halbwertszeiten von ¹³C-Methacetin unterschieden sich bei der körperlichen Belastung nicht signifikant (siehe Tabelle unten; Messung 1 vs. 4 P=0,289; Messung 3 vs. 5 p=0,159). Allerdings lagen die Maximalspiegel nach Injektion deutlich niedriger mit Maximalwerten nach einer Minute von 5,8 (3,6-9,0) mg/L bei 2 mg/kg KG, bzw. von 11,8 (5,8-17,1) mg/L bei 4 mg/kg KG. Somit erreichten auch die Maxima der ¹³C-Methacetin Spiegel nur ca. 60% der Maxima bei Messungen in Ruhe (Messung 1 vs. 4 p=0,005; Messung 3 vs. 5 p=0,002).

Analog zur veränderten DOB Kinetik verhielt sich auch die Kinetik von Paracetamol unter körperlicher Belastung (Abb. 34). Auch hier wurden die Maxima erst nach 60 Minuten erreicht. Allerdings waren die Maxima Werte statistisch nicht signifikant niedriger als bei den Messungen in Ruhe (siehe Tabelle unten; Messung 1 vs. 4 p=0,59; Messung 3 vs. 5 p=0,274).

Tabelle 9: Vergleich der untersuchten Parameter unter körperlicher Belastung

Messung [Nr]	1	4	3	5	
Dosierung [mg/kg] KG	2	2	4	4	
Messung in	Ruhe	Belastung	Ruhe	Belastung	
Maximum Wert					
DOB [‰]		19,0 (15,3-21,7)	56,8 (32,0-113,3)		
Methacetin [mg/L]	9,8 (1,2-18,9)	5,8 (3,6-9,0)	17,6 (4,6-37,0)	11,8 (5,8-17,1)	
Paracetmol [mg/L]	1,5 (0,5-2,6)	1,0 (0,5-1,5)	2,6 (0,6-6,3)	2,2 (1,5-3,0)	
TMax [Minuten]					
DOB	7,1 (3,4-10,7)	50,0 (25,3-59,1)	13,6 (5,2-48,5)	52,7 (5,3-59,2)	
Methacetin	0,5-1		0,5-1		
Paracetmol	10 (5-60)		20 (5-60)		
Halbwertszeit [Minuten]					
Methacetin		26,9 (19,3-38,1)	31,9 (22,5-61,3)	28,7 (20,0-40,1)	

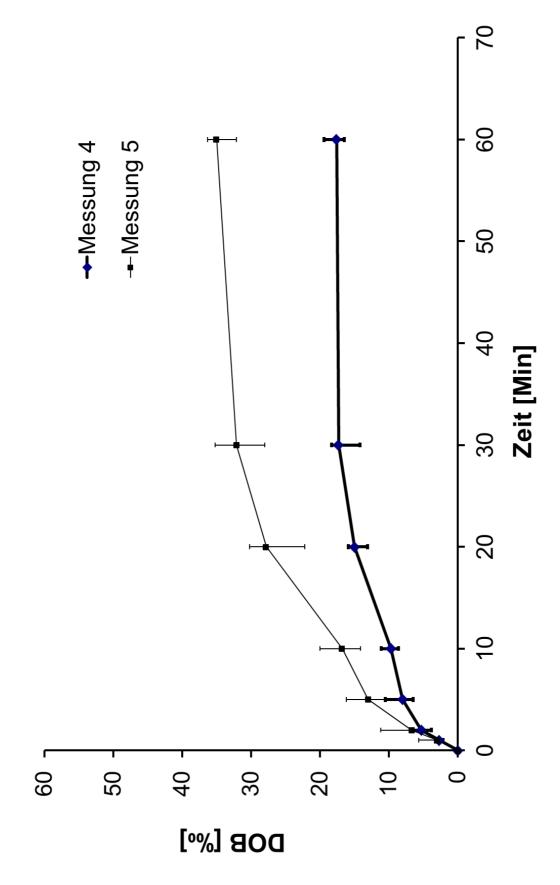


Abbildung 32:Vergleich der mittleren DOB Kinetik unter körperlicher Belastung für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 4& 5). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

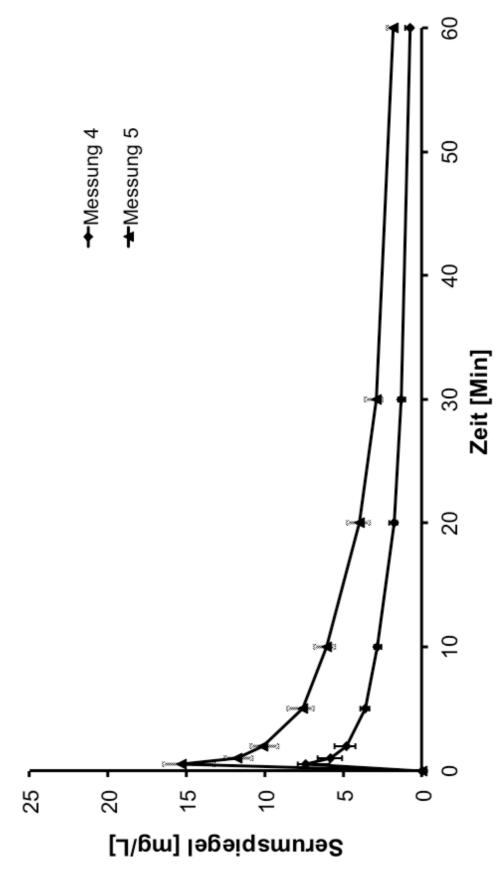


Abbildung 33: Vergleich der mittleren ¹³C-Methacetin Kinetik unter körperlicher Belastung für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 4& 5). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

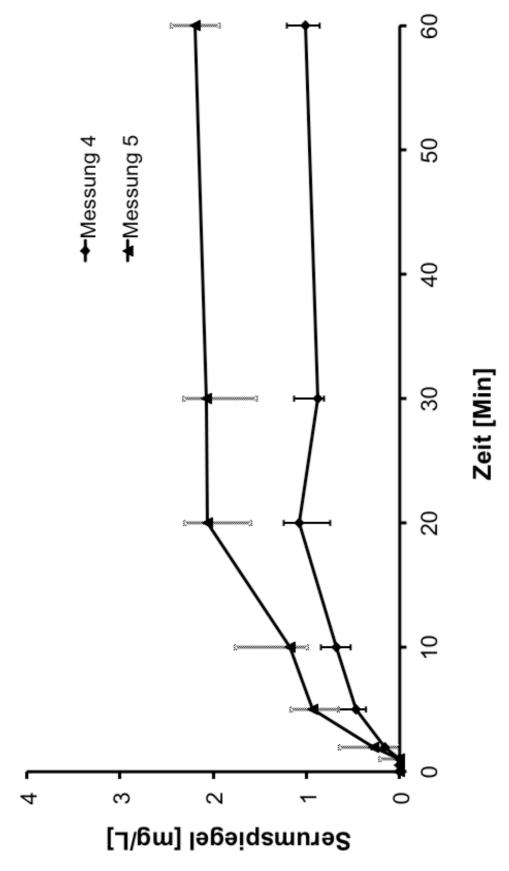


Abbildung 34: Vergleich der mittleren Paracetamol Kinetik unter körperlicher Belastung für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 4& 5). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.

7. Diskussion

Die vorliegende Studie konnte erstmals wichtige pharmakokinetische Charakteristika des intravenösen ¹³C-Methacetin Atemtests beschreiben. Es zeigte sich, dass die Maximaspiegel der Abbauprodukte eng mit dem schnellen Substratabbau korrelieren. Nach Erreichen des DOBmax ergibt sich im weiteren Kurvenverlauf jedoch kein sinnvoller Zusammenhang zwischen DOB- und Substratkinetik. Des Weiteren zeigte sich eine hohe intraindividuelle Reproduzierbarkeit des DOBmax. Außerdem konnte eine lineare Dosisabhängigkeit der DOB Werte gezeigt werden. Schließlich wurde der Einfluss von körperlicher Belastung auf die DOB Kinetik während des Tests eindrucksvoll gezeigt.

Durch die Messung der Substratpharmakokinetik von Methacetin im Blut konnte dargestellt werden, dass Methacetin in der Leber rasch abgebaut wird. Durch den Kurvenverlauf der Pharmakokinetik des Abbauproduktes Paracetamol wird diese Theorie unterstützt. Jedoch findet die Abatmung des ¹³CO₂ zeitversetzt statt. Somit ist der Einfluss des Transportmediums Bikarbonat hervorgehoben.(85) Da das Bikarbonat als Transportmedium ebenfalls ¹³CO₂ in die verschiedenen Kompartimente des Körpers abgibt, muss die Rolle des Kompartimentmodells bei der ausgerechneten Halbwertszeit des DOB in der endgültigen Bewertung berücksichtigt sein.(79) Die Ergebnisse des Tests unter erhöhter CO₂ Produktion bekräftigen die Bedeutung eines Kompartimentmodells.(96)

Durch den intraindividuellen Vergleich in den Messungen konnte die Reproduzierbarkeit des LiMAx-Testes bewiesen werden. Die nahezu identischen Kurvenverläufe zeigen auf, dass es ein verlässliches Werkzeug zur Messung der qualitativen Leberfunktion darstellt.(111, 112) Dies zeigt sich ebenfalls durch die Dosiserhöhung. Es wurden kongruente Kurvenverläufe bei doppelter Dosis im Vergleich zu der Ausgangsdosierung gemessen. Eine längere Sättigung des CYP1A2-Systems erfolgte unter den gegebenen Dosierungen nicht.(113)

Es kann erstmals sichergestellt werden, dass das abgeatmete ¹³CO₂/¹²CO₂ Verhältnis nicht den aktuellen Substratmetabolismus an jedem Punkt der Messung widerspiegelt.(114) Somit zeigt sich, dass Messmethoden zur korrekten Interpretation der nicht-invasiven Atemtests an die Substratpharmakokinetik anzulehnen sind. Dies bezieht sich vor allem auf die Zeitpunkte der Auswertung des ¹³CO₂/¹²CO₂ Verhältnisses in der Abatemluft. Falls die Werte der Substratpharmakokinetik nicht vorliegen, lässt sich anhand der durchgeführten Studie feststellen, dass eine kontinuierliche Analyse der Abatemluft bzw. eine hohe Rate an Probenentnahmen des ¹³CO₂/¹²CO₂ Verhältnisses diese ersetzen kann. Dementsprechend

müssen die Ergebnisse von Arbeitsgruppen mit einem anderen Ansatz kritisch beurteilt werden.(75)

7.1. Diskussion der Methode

Die Studie wurde als eine prospektive Beobachtungsstudie an gesunden Freiwilligen durchgeführt. Die ganze Reihe von unterschiedlichen Fragestellungen führte dazu, dass insgesamt 5 Messungen (davon 4 mit körperlicher Belastung durch Ergometrie) mit jedem Probanden vorgenommen werden mussten. Daher wurden ausschließlich junge, vollkommen gesunde Personen eingeschlossen. Sechs von 27 eingeschlossenen Probanden konnten nicht ausgewertet werden. (13, 86) Dies entspricht einer Dropout-Rate von 22%. Die Fallzahl von 21 ausgewerteten Probanden erscheint im Vergleich zu anderen Studien mit ähnlicher Fragestellung jedoch eher hoch. (13, 86) Die eigentliche Fragestellung dieser Arbeit bezieht sich auf die Abatmung des ¹³CO₂ und seinen Zusammenhang zur Pharmakokinetik des Substrat Methacetin. So wollen wir erstmalig bestimmte Abläufe untersuchen, um Rückschlüsse auf grundlegende Fragen bei den nicht invasiven Atemtests zu erhalten. Der Entschluss, nur gesunde Probanden in die Studie einzuschließen, basierte auf den erhöhten Belastbarkeiten während der Durchführung. Das Studiendesign mit der erhöhten CO2-Produktion ist bei einer Durchführung an kranken Patienten nicht nur unethisch. Sie wäre auch praktisch nur unter sehr inkonstanten Umständen durchführbar, und würde uns Werte liefern, die keine Vergleichbarkeit erlauben. (10, 61, 115) Dennoch haben Arbeiten mit Leberkranken Probanden aufzeigen können, dass der ¹³C-Methacetin Atemtest ein verlässliches Werkzeug zur Bestimmung der funktionellen Leberkapazität darstellt(67)

Studiendesign

Die hohe Anzahl an Messtagen in einem klar festgelegten Zeitraum erlaubte uns, an verschiedenen Tagen mit verschiedenen Dosierungen die Testreihe durchzuführen. Ohne dies könnten wir keine Aussage über die Reproduzierbarkeit und die Verlässlichkeit des Tests machen.(116, 117) So konnten wir multiple Fragestellungen zur CO₂-Abatmungskinetik und der Substratpharmakokinetik des Methacetins in Ruhe sowie unter verschiedenen Umständen der körperlichen Belastung beantworten. (91, 96)

Der Zeitrahmen wurde pro Proband auf zwei Wochen festgelegt. Damit wurde ausgeschlossen, dass zeitliche Unterschiede in der Studie die Pharmakologie des zu untersuchenden Substrates verändern könnten.(75)

Die Ungefährlichkeit des ¹³C-Methacetin Atemtests wurde durch Arbeiten von Shteyer et al. in der Neonatologie und Lifschitz et al. gezeigt.(53, 118) Die laborchemische Untersuchung, welche wir am ersten und letzten Tag der Messreihe durchführten, hat dies unter den oben genannten Bedingungen bestätigt. Damit konnte erneut bestätigt werden, dass die Gesundheit und Sicherheit des Patienten nicht gefährdet sind.

Der Belastungstest erfolgte unter ärztlicher Aufsicht und genauer Beobachtung der Vitalparameter des Probanden mittels Pulsmesser. So konnte der Patient zu jeder Zeit bei kardiopulmonalen Problemen die Versuchsreihe abbrechen. Dies geschah bei keinem der 27 Probanden. Die Messungen waren evident um den Einfluss der erhöhten CO₂-Produktion auf die Ausatmung des ¹³CO₂ und der Rolle des Bikarbonatpools zu unterstreichen.(85, 105)

Verträglichkeit

Die Blutentnahmen erfolgten zur Bestimmung der Substratpharmakokinetik des Methacetins. Dies wurde nach einem standardisierten System unter sekundengenauer Messung der Abnahmen durchgeführt. Dadurch war gewährleistet, dass keine zeitlichen Abnahmefehler erfolgten und so Verfälschungen in der Messung auftreten, wie bspw. Restblut in der Kanüle o.a.(119) In keinem der 27 Probanden wurde die Testreihe aufgrund Unverträglichkeit, allergischer Reaktion o.ä. abgebrochen.

Messung DOB

Alle Atemtests wurden mit einem kontinuierlichen Atemtest zur Beurteilung der ¹³CO₂/¹²CO₂ Verhältnisses über das modifizierte NDIRS–Gerät FANci 2db-16 (Fischer Analysen Instrumente, Leipzig) nach einem standardisierten Protokoll nach Stockmann et al. durchgeführt. Das bringt den Vorteil mit sich, dass viele Messpunkte in der Abatemkurve durchführbar sind. Diese Methode ist seit 2004 in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin-Campus Virchow etabliert sowie in vielen Studien dargestellt.(26, 69, 120, 121)

Messung HPLC

Für die Analyse der Serumproben wurde die HPLC Messmethode als besonders sensitive Methode ausgewählt. In Zusammenarbeit mit dem pharmakologischen Institut der Charité-Campus Mitte ist für diese Studie eine HPLC-Methode entwickelt worden, die für den notwendigen Konzentrationsbereich validiert ist und durch einen Pharmakologen aus deren Institut bestimmt wurde.(114, 122) Der Pharmakologe war gegenüber dem Testablauf und

dem Probanden aufgrund räumlicher und zeitlicher Differenz verblindet. Deshalb konnten keine Fehler durch menschliche Miteinflussnahme entstehen.(123)

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. **DOB**

In der Beurteilung von nicht-invasiven Atemtests bestimmt die Berechnung der abgeatmeten Luft und Ihres Anteiles an $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ eine zentrale Rolle. Da die DOB-Werte das Maximum in einer sehr frühen Phase des Testablaufes erreichen, und die zugleich abgenommene Substratpharmakokinetik des Methacetin innerhalb der ersten Minuten eine rasche Verstoffwechselung aufzeigt, ist eine Neubewertung der verschiedenen Parameter der Messreihen unumgänglich.

Zum einen bezieht es sich auf die Abstände der Messung: Wie Lalazar und Braden in Ihren Arbeiten die DOB Messung in kurzen und regelmäßigen Abständen durchführten, ist nun deutlich geworden, dass dadurch Messungenauigkeiten entstehen.(12, 73) Da die DOB Werte einen frühzeitigen Peak erreichen, sind frühe und schnell wiederholende Messungen für eine genaue Beurteilung entscheidend. Portincasa befolgte dies in dem von ihm vorgestellten Testprotokoll, jedoch zog es sich über einen Zeitraum von 120 min.(124) Dadurch entstehen Messergebnisse, die mit dem Abbau des Methacetins keinen Zusammenhang haben. Wie in unserer Messung erkennbar ist zu diesen späten Zeitpunkten das Methacetin abgebaut und die gemessenen Werte spiegeln eher die Abatmung des ¹³CO₂ aus dem Bikarbonatpool wieder.(114, 125) Schneider et al gingen in Ihrer Arbeit zwar ein verkürztes Protokoll mit einer 2-Punktmessung zu Beginn und der 15. Minute ein, jedoch ist dieses Testprotokoll aufgrund unserer Ergebnisse nicht aussagekräftig genug, um möglichst exakte Ergebnisse zu liefern.(75)

Zum anderen sind Berechnungsannahmen mit der "Area under the curve" (AUC) nicht mehr valide. Wie deutlich wird, ist beim Gesunden das Methacetin bereits innerhalb der ersten 90 Sekunden verstoffwechselt. Das DOB erreicht sein Maximum nach 10 Minuten. Da die Beurteilung der Leberfunktion im direkten Zusammenhang mit der Fähigkeit des CYP1A2-Systems steht, könnten AUC-Analysen die Genauigkeit der Testergebnisse verringern. So erscheinen die Parameter DOBmax und TMax als geeigneter.(114) Durch die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Testreihen 1-2 sowie 2-3 im Pearson's Korrelationstest ist die Validität von DOBmax und TMax verdeutlicht worden (s. Abb. 17-18). So müssen

diese Parameter gerade in Rücksicht der neuen Erkenntnisse der Pharmakokinetik als Bezugsgrößen herangezogen werden.(126)

Die Dosierung ist als ein weiterer Faktor in den verschiedenen Testreihen und Auswertungsalgorithmen nicht berücksichtigt worden. Wir konnten hierbei einen wesentlichen Punkt hervorheben: Eine Steigerung auf das doppelte an Substratmenge hat eine klare Auswirkung auf das DOB-Level. In den weiteren Versuchsreihen werden unterschiedliche Applikationswege genutzt. (63, 124, 127) Inwieweit sich eine Sättigung des Systems einstellt, kann weder durch die vorhergehenden Probeversuche der Vielfachinjektion (siehe Abb. 5), noch aus dem Versuchsaufbau sichergestellt werden. In keinen der Versuchsaufbauten kam es zu einer längeren Sättigung des CYP1A2-Systems. Wenn überhaupt ist das System für eine ganz kurze Zeit unter einer Minute beim Gesunden gesättigt. Die Variabilität der Messergebnisse ist demnach abhängig von der Injektion und Anflutung in der Leber, da keine längere Enzymsättigung erreicht worden ist. Dies erklärt die individuellen Unterschiede in der Abb. 18. Durch die Erkenntnisse über das Kompartimentsystem mit dem großen Reservoir an Fassungsvermögen, ist ein detailliertes Erfassen der genauen Mengen per herkömmlicher Messung nicht möglich. (1, 79) Nur mit der Erstellung einer mathematischen Systemformel kann dies näher erforscht werden.

Diese Herausforderung konnte durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für mathematische Systembiochemie von Prof. Holzhütter am Institut für Biochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin zum Teil gemeistert werden.(125) (siehe Abb. 35)

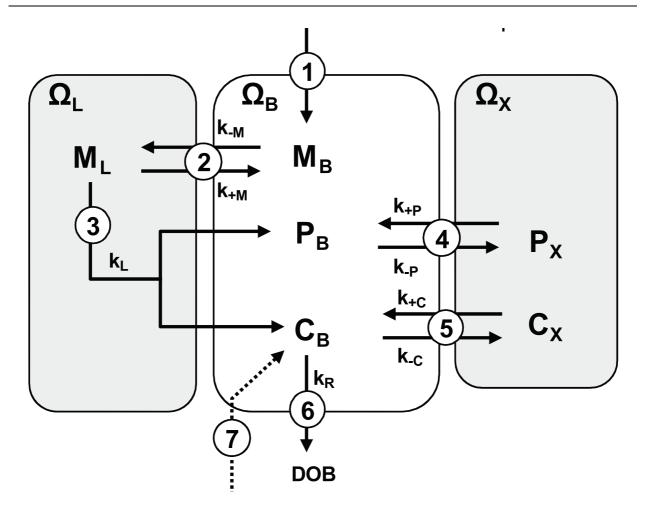


Abbildung 35: schematische Darstellung des Drei-Kompartment-Modells zur Beschreibung der Kinetik von ¹³C -Methacetin, Paracetamol und ¹³CO₂.(125)

Nach Injektion von. 13 C-Methacetin [1] erfolgt ein reversibler Austausch von 13 C-Methacetin zwischen Blut und Leber [2]. Daraufhin kommt es zur hepatischen Verstoffwechselung von 13 C-Methacetin zu Paracetamol und 13 CO₂ [3]. Erkennbar sind hier der reversible Austausch von Paracetamol zwischen Blut und anderen Kompartimenten [4] sowie der reversible Austausch von CO₂ zwischen Blut und anderen Kompartimenten [5]. Danach erfolgt die Abatmung von 13 CO₂ [6] Ω_L , Ω_B , und Ω_X beschreiben das Volumen der jeweiligen Kompartimente. Es wird vorgeschlagen, auf eine "2-DOB"-Messung im Testprotokoll einzugehen. Hierbei wir zunächst eine zusätzliche Injektion von 13 C-Bikarbonat vor der intravenösen Applikation des 13 C-Methacetin durchgeführt, um die interindividuellen Unterschiede des Bikarbonatpools sichtbar zu machen. Wir sehen darin die Verfeinerung unserer Hypothese, dass eine genauere und detailgetreuere Beurteilung der einzelnen Messparameter zur Validierung der nicht-invasiven Atemtests unumgänglich ist. Die praktische Durchführung dieses Testaufbaus muss in weiteren Studien bewiesen werden.

Da einerseits die Versuchstage mit jeweils 2 mg/kg KG und 4 mg/kg KG ¹³C-Methacetin den Ergebnissen zu Folge beim Gesunden keine längere Sättigung des Enzymsystems erreicht haben, wäre eine höhere Dosierung möglich.(113) Andererseits ist bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen bei der besagten Dosierung eine längere Sättigung durchaus möglich. so dass wiederum die Bedeutung der multiplen Messungen in kurzen Zeiträumen nach Applikation hervorzuheben ist. Diese spiegelt die tatsächliche Leberfunktion am ehesten wider.(126, 128) Des Weiteren widerspricht es der Annahme, dass lange Messungen eine tatsächliche Beurteilung der Leberfunktion darstellen.(124, 129) So muss aus dieser Arbeit geschlossen werden, dass die Messung des DOB nicht zu jeder Zeit den aktuellen Substratmetabolismus widerspiegelt. Eine hohe Probenentnahmerate zu Beginn der Testreihe ist daher wichtig, um die frühen Maxima korrekt zu bestimmen.

7.2.2. Methacetin-Kinetik

Durch die frühe Eliminierung des Methacetin wird die Wichtigkeit der schnellen und häufigen Abnahmen des DOB deutlich. Somit konnte erstmals die Arbeitshypothese durch valide Abnahmewerte unterstützt werden. Vergleichbare Arbeiten, die einen ähnlichen Aufbau aufzeigen, sind bisher nicht erschienen. Die Darstellung des Bikarbonatpools wurde jedoch ausführlich unter verschiedenen körperlichen Stresssituationen beschrieben.(84) Es wird deutlich, dass der Abbau deutlich früher als erwartet auftritt. Der Kurvenverlauf des Methacetin zeigt die Wichtigkeit des Bikarbonatpools auf. Trotz des raschen Abbaus erfolgt die messbare Abatmung ca. 9 Minuten nach dem Abfall des Methacetin. Die Verteilung des ¹³CO₂ muss somit in Kompartimente erfolgen, die außerhalb des auf diese Weise Messbaren liegen (Abb. 3). Dadurch werden zwei Dinge deutlich: Die Probenentnahme muss in den ersten 10 Minuten mit einer hohen Rate erfolgen bevor das ¹³CO₂ in relevanter Weise in den Bikarbonatpool zwischengespeichert wird, so dass eine zum raschen Methacetinabbau annähernde Erfassung der Leberfunktion erfolgen kann.(125) Dies ist insbesondere wichtig bei normaler Leberfunktion. Bei späteren Messzeitpunkten ist die Gefahr gegeben, dass die Ergebnisse keine tatsächliche Funktionsstärke darstellen. Dementsprechend müssen nichtinvasive Atemtests, die auf dem Isotop 13CO2 basieren, einen Auswertungsalgorithmus den tatsächlichen Substratmetabolismus erstellen, der widerspiegelt. In Arbeitsgruppen wie bspw. Braden und Festi wurde dies nicht berücksichtigt. Damit bestätigt sich die getätigte Annahme, dass deren Ergebnisse zwar mathematisch erklärbar und in sich schlüssig sind, jedoch nun mit den tatsächlichen Werten des Methacetinabbaus zu klinisch nicht relevanten Aussagen führen.(32, 63, 66)

7.2.3. Paracetamolkinetik

Der Anstieg von Paracetamol verläuft reziprok gegenüber dem Abbau des Methacetins. Es wird deutlich, dass Paracetamol ein konstantes Plateau nach 5 Minuten erreicht hat. (Abb. 29-32) Da es als weiteres Produkt aus dem enzymatischen Abbau von Methacetin zu ¹³CO₂ entsteht, festigt der Kurvenverlauf von Paracetamol die Hypothese des schnellen Metabolismus von Methacetin. Wir konnten bestätigen, dass die Menge an abgebauten Paracetamol die therapeutische Schwelle nicht überschreitet.(114) So kann die Nutzung von Methacetin von dieser Seite aus als ungefährlich eingeschätzt werden.(118)

Weiterhin ist in der Analyse der Ergebnisse ein Punkt aufgefallen: Multipliziert man die Kurve des Paracetamols mit einem beliebigen Faktor, um ihn in den Vergleich mit der Methacetin- und DOB Kurve zu stellen, so erkennt man, dass die Paracetamol Kurve im Serum mit der Kurve des DOB in der Abatemluft nahezu identisch verläuft. Dies werten wir als weitere Unterstützung für die Bedeutung des DOB in der Bestimmung von einheitlichen Formeln: Das Abbauprodukt des Methacetin verläuft im Serum nahezu identisch zum Abbauprodukt des Methacetin in der Abatemluft.

7.2.4. Einfluss CO₂-Produktion

Mit der erhöhten CO₂-Produktion zu Beginn des Testes wollten wir das Verhalten des ¹³CO₂ im Zusammenhang mit der Ausscheidungskinetik beurteilen. Dabei wird die entscheidende Tatsache deutlich, dass durch die Muskelaktivität ¹²CO₂ produziert wird und sich damit das ¹²CO₂/¹³CO₂ Verhältnis über den Bikarbonatpool ändert. Da v.a. gespeicherte Energie (bspw. Glykogen) abgebaut wird, ist der Gehalt an ¹²CO₂ in diesem Speichermedium ca. 99%.(96, 105) Zu Beginn der Aktivität ist die endogene CO₂-Produktion erhöht und führt zu einem niedrigen DOB Wert in den Messungen. Die Werte steigen jedoch kontinuierlich an und befinden sich zum Ende der Messung am höchsten Punkt.(84) Das endogen produzierte CO₂ wird zur Aufrechterhaltung der Muskelaktivität bevorzugt behandelt und der Abbau erfolgt zugleich.(96) Das im Bikarbonatpool gespeicherte ¹³CO₂ wird viel später an die Abatemluft gegeben. Wir erkennen, dass dadurch der Auswaschungseffekt aus dem Bikarbonatpool verdeutlicht wird. Nun gibt es vorherige Arbeiten, die die Rolle des Bikarbonatpools und des Auswaschungseffektes beschreiben.(1, 79) Jedoch ist in den vergleichsbaren

Auswertungsalgorithmen der nicht-invasiven Atemtests die Beurteilung des Pools nicht beschrieben. (32, 61) Im Zusammenhang mit der erstmalig beschriebenen Substratpharmakokinetik des Methacetins unterstützt dieser Aspekt unserer Versuchsreihe die Hypothese der schnellen und frühen Abnahmen der DOB Proben. Es ist daher umso wichtiger, den Test in Ruhe durchzuführen, so dass keine Muskelbewegung die Ergebnisse in der Abatemluft verfälscht. (91)

Die Konstellation bei kranken Patienten ist nunmehr eine andere, da hier eine erhöhte Anforderung an den Stoffwechsel besteht. Dennoch ist es auch bei kranken Patienten weitestgehend kompensierbar, so lange die Bedingungen vor, während und nach dem Test identisch sind.(26, 68, 128)

7.2.5. Limitationen der Studie

Gerade in diesem Zusammenhang weist die Studie auch diskutable Limitationen auf: Vor allem, dass in dieser Studie "nur" gesunde Probanden untersucht worden sind. Dabei kann kritisiert werden, dass die Serumkinetik bei Kranken anders verlaufen könne als bei Gesunden. veränderte Hämodynamik könne dementsprechend weitreichende Konsequenzen im Klinikalltag mit sich ziehen, die aus einem theoretischen Konstrukt heraus nicht zu beurteilen sind. Jedoch muss hierbei erwähnt werden, dass vermeintliche Unterschiede, die bei Leberkranken Patienten auftreten könnten nicht Gegenstand der Studie waren, sondern vielmehr dies eine Grundlagenstudie darstellt, auf dessen Basis mögliche Unterschiede in weiteren Studien gesondert beurteilt werden müssen. Die pharmakokinetische Bewertung, die Beurteilung der körperlichen Belastung und die geringere hepatische Metabolisierung werden anhand der weiterhin bestehenden Zusammenarbeit mit der AG Holzhütter/Mathematische Systembiochemie erfolgen; Hierbei sind aktuelle Ergebnisse durch Stockmann et al. und Holzhütter et al. Gegenstand der Forschung und noch nicht zur Veröffentlichung freigegeben. Diese Arbeit diente vor allem im Bereich Grundlagenforschung zur Bestimmung des Zusammenhanges zwischen Pharmakokinetik und Abatmungskinetik sowie der Reproduzierbarkeit, so dass die Parameter des Auswertungsalgorhitmus näher definiert werden können. Das selbige betrifft das Eingeben der Messwerte in ein pharmakokinetisches Modell. Hierfür ist die Zusammenarbeit zielführend und wird in Zukunft zu weiteren Publikationen führen.

7.3. Klinische Bedeutung der Ergebnisse

In der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin-Campus Virchow sowie in verschiedenen chirurgischen Zentren in Deutschland ist der LiMAx-Test im klinischen Alltag im Gebrauch und dient als Unterstützung in der Therapie von Lebererkrankungen. In der Arbeit von Rubin et al. konnte die FLIP-Methode ausführlich dargestellt werden.(25) Entsprechend der Ergebnisse ist der Test als sicher für den Patienten anzusehen und kann somit im Klinikalltag regelmäßig angewendet werden. In den initialen Arbeiten von Stockmann et al. zeigte sich dies schon in großer Fallzahl. (26, 120, 126, 130) Die Reproduzierbarkeit des LiMAx- Tests festigt seine Validität und seinen Anspruch, bei wiederholt gleichen Ergebnissen als verlässliches diagnostisches Mittel eingesetzt zu werden. Die Bedeutung der erhöhten CO₂ Produktion bei den Belastungstests zeigt, dass die Testdurchführung liegend und in Ruhe durchgeführt werden muss. Ansonsten kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Jara et al. zeigten den klinischen Nutzen in einer Übersichtsarbeit 2014. Bei der Risikoabschätzung vor leberchirurgischen Eingriffen, dem Therapiemonitoring bei chronischen Lebererkrankungen oder bei der funktionsadaptierten Gabe von Medikamenten kann die zusätzliche quantitative Bestimmung der hepatischen Funktion wichtige Erkenntnisse liefern und so zu einer Verbesserung des Patientenmanagements beitragen.(68) Besonders in dem Feld der präoperativen und postoperativen Beurteilung zeigte sich der LiMAx Test von grossem Nutzen: Jara et al. konnten 2015 in einer retrospektiven Studie mit 1170 Patienten die klinische Relevanz des LiMAx Testes in Bezug auf Morbidität und Mortalität nach Leberteilresektion aufzeigen: Trotz stetigem Anstieg der ausgedehnten Leberteilresektionen in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin-Campus Virchow von 29,1% auf 37,7% in der Zeit zwischen Januar 2006 und Dezember 2011 sank nach der Implementierung der präoperativen LiMAx Messungen die Inzidenz des postoperativen Leberversagens von 24,7% auf 9,0%.(130) Malinowski et al. haben in einer vergleichenden Arbeit von 347 Probanden mit Leberzirrhose zu 86 gesunden Probanden im Vergleich zu den gängigen Leberuntersuchungen des Child-Turcott-Pugh-Score (CTPS) und dem MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease) die Verlässlichkeit des Testes bei dem Monitoring chronischer Lebererkrankungen darstellen und deren Schweregrad im Verlauf beurteilen.(131) Bednarsch et al. zeigten in Ihrer Arbeit 2016 wie die kontinuierliche Beurteilung der Leberfunktion durch den LiMAx Test den postoperativen Austritt von Galle nach leberchirurgischen Eingriffen erkennen kann. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Überlebensrate wenn die Gallenleckage fünf Tage postoperativ erkannt wurde. Im Umkehrschluss zeigte sich, falls die Leberfunktion verlängert schlecht war, ist die erhöhte Wahrscheinlichkeit eines Gallenaustrittes.(132) Auch konnte durch Hoppe et al. die Auswirkung der nicht alkoholischen Fettleber (NAFLD) auf die Leberregeneration nach Leberteilresektion untersucht und beurteilt werden. Diese hat nach operativen Eingriffen langfristige Auswirkungen auf den Heilungsverlauf und den Erfolg der operativen Therapie. 31 Patienten wurden nach Leberteilresektion in ein engmaschiges postoperatives Studiendesign eingeschlossen, welches als Resultat bei 19 Patienten eine frühzeitige Erkennung und Behandlung der NAFLD hatte, da durch die funktionelle Leberbeurteilung erstmalig ein Rückkehrschluss auf die Erkrankung erfolgen konnte.(133) Lock et al. zeigten im Bereich der Lebertransplantation für die Akutphase (24 Stunden nach Transplantation) verlässliche Aussagen für das initiale Transplantatversagen durch die Mitbeurteilung mit dem LiMAx Test auf. So konnte eine Behandlung weit aus früher umgesetzt werden als es vorher durch die herkömmlichen Methoden möglich war.(121) Auch in dem seltenen, jedoch bedrohlichem Krankheitsbild des akuten Leberversagens konnte eine sensitive Differenzierung für die Indikation der Lebertransplantation untersucht werden. Durch die Beurteilung der maximalen Leberkapazität kann dies mit eine entscheidende Stütze sein.(120) In anderen Arbeiten wie der Arbeitsgruppe von Götze zeigten sich in einer followup Studie die Bedeutung des ¹³C-Methacetin Atemtests für mittel- bis langfristige Aussagen die zur Lebertransplantation oder zum Tod des Patienten führten.(134) Auch Stravitz et al. konnten im Vergleich zu anderen klinischen Tests die Bedeutung des ¹³C-Methacetin Atemtests in Bezug auf die Beurteilung des Verlaufes von Lebererkrankten Patienten hervorheben. (67)

Auch die medikamentöse Therapie sowohl bei invasiven Maßnahmen als auch bei chronischen Lebererkrankungen konnte durch Arbeiten in Bezug auf den LiMAx-Test genutzt werden. Im Zusammenhang der Chemotherapie mit Oxaliplatin bei Lebermetatasen von kolorektalen Karzinomen bestanden Zweifel für eine erfolgreiche leberchirurgische Behandlung. Hierfür gab es keinen Leitfaden für den richtigen Zeitpunkt des operativen Eingriffes. In einer Arbeit von Jara et al. konnte der LiMAx Test 20 Patienten über einen Zeitraum von 8 Wochen begleiten. Hierbei zeigten sich intraindividuelle Unterschiede bzgl. des Heilungsverlaufes der maximalen Leberfunktion. Als Resultat konnte der Zeitpunkt eines operativen Eingriffes auf den Patienten zugeschnitten werden, so dass das Outcome der Operation verbessert wurde.(135) Raschzok et al. zeigten in ihrer Arbeit bzgl. direkt

wirkender Virostatika nach Lebertransplantation bei Hepatitis C die Wirkung auf die enzymatische Leberfunktion. Über den Zeitraum von drei Monaten konnten so die zusammenhängende positive Wirkung auf die Leberfunktion bei gleichzeitiger Therapie des HCV gezeigt werden. (136) Bei generalisierter Sepsis konnte durch Kaffarnik et al. die Rolle der hepatischen Funktion und ihrer prognostischen Wirkung auf die Überlebensrate mit Hilfe eines engmaschig angelegten Studiendesigns besser dargestellt werden. Der Umfang an Beeinträchtigung des LiMAx ist mit ein entscheidender Prädiktor für Morbidität und Mortalität und ist dabei dem vergleichenden Test des Indocyanin-grün-Retentionstests (ICG-Test) überlegen.(137) Die Wirkung der CT-gestützten, hochdosierten Brachytherapie dient zur Behandlung nicht resezierbarer Lebertumoren. Vor der durch Brinkhaus et al. durchgeführten Studie gab es keinerlei Daten bzgl. der Auswirkung der Therapie auf die Leberfunktion. Danach konnte durch diese prospektive Studie mit 69 Patienten mit Hilfe des LiMAx-Testes aufgezeigt werden, dass langfristig keine Verschlechterung der Leberfunktion besteht. Die als bisher gute Option für nicht operable Patienten bestehende Therapie wurde so bestätigt.(138) Auch in anderen chirurgischen Eingriffen kommt der LiMAx-Test zur Geltung. In einigen Arbeiten konnten histologische Proben die Verbesserung der nichtalkoholischen Fettleber (NAFLD) beschrieben werden.(139, 140) Alizai et al. beurteilten nach bariatrischer Chirurgie die Verbesserung der Leberfunktion mit Hilfe des LiMAx-Tests. Hierbei konnten positive Ergebnisse die bisherige Annahme unterstützen, dass der chirurgische Eingriff zu einer signifikanten Verbesserung der Leberfunktion führt.(141)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der LiMAx Test in unterschiedlichen klinischen Situation einen hohen diagnostischen Mehrwert erbringen kann und von zunehmender klinischer Bedeutung ist.

Nun ist diese Arbeit nur ein kleiner Beitrag, um die nicht-invasiven Atemtests vom klinischen Forschungsgegenstand hin zum standardisierten, diagnostischen Mittel zu führen. Da jedoch die nicht-invasiven Atemtests vor den elementaren Fragestellungen wie der Definition des Ablaufprotokolles stehen, können diese Ergebnisse die Weiterentwicklung vorantreiben.

7.4. Abschließende Schlussfolgerungen

Diese Studie konnte erstmals die Pharmakokinetik von ¹³C-Methacetin und seiner Abbauprodukte im Rahmen eines nicht-invasiven Leberfunktionstests genau darstellen und charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Untersuchung der Leberfunktion durch

¹³C-Methacetin reproduzierbare Ergebnisse liefert. Hierbei ist insbesondere die Messung des DOB innerhalb der ersten 10 Minuten nach Injektion von Bedeutung, da in diesem Zeitraum der größte Substratumsatz innerhalb der Leber stattfindet, wie sich an der Serumkonzentration des Paracetamol bestätigt. Die späteren DOB Messwerte werden deutlich stärker durch die Pharmakokinetik von Bikarbonat beeinflusst. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung und Sinnhaftigkeit von nicht-invasiven Atemtests zu begründen und zu unterstreichen. Ihre Zuverlässigkeit lässt sich nur durch weitere Studien erforschen. Eine einheitliche Berechnungsformel lässt die gesamtmedizinische Darstellung leichter fallen. Mit dieser Arbeit sind wir bemüht, dies hervorzuheben.

Was sagt uns dies nun für den klinischen Alltag und die Nutzung der nicht-invasiven Atemtests? Wichtig ist vor allem zu erwähnen, dass die Serumkinetik bisher keine große Relevanz Beurteilung der Atemtests aufweist. Die verschiedensten Auswertungsalgorithmen haben den eigentlichen Abbau des zugeführten Produktes nicht berücksichtigt. Durch die erneute Verdeutlichung des Bikarbonatpools ist die Situation nun eine neue: Bei Betrachtung und Messung der Werte in der Abatemluft, wie sie bisher in verschiedensten Variationen aufgetreten ist, kann man nicht mehr von detaillierten Werten ausgehen. Die Beurteilung der Abatemluft anhand der AUC oder auch der PDR u.a. gibt verfälschte Werte wieder, die nicht die eigentliche Leistungsfähigkeit der Leber darstellen. Vielmehr misst man in späten Messungen, wie sie auch in Bezug zu Methacetin vorgekommen sind, die Rolle des Bikarbonatpools und ihrer Abgabe des ¹³CO₂ an die Abatemluft als die eigentlich zu messende Leistungsfähigkeit der Hepatozyten, bzw. des CYP1A2-Systems. Folglich ist die Aussagekraft dieser Werte in Frage zu stellen. Um die klinische Bedeutung und den wahren Wert der nicht-invasiven Atemtests darstellen zu können, muss ein Konsens gefunden werden, der auf der Wissenschaft basiert. Anhand der vorgelegten Ergebnisse ist die Bedeutung des DOBmax zur Beurteilung der Abatemkinetik, die Substratpharmakokinetik zur Beurteilung der eigentlichen Leberfunktion sowie die Rolle des Bikarbonatpools nicht mehr von der Hand zuweisen um ein Umdenken zu forcieren. Die neue Methodik des LiMAx-Tests, der als zentralen Parameter DOBmax benutzt, ist daher der richtige Weg, um vom methodischen Standpunkt her zuverlässige Messwerte der Leberfunktionskapazität zu erhalten.

8. Zusammenfassung

8.1. Einleitung

Die nicht-invasiven Atemtests beruhen darauf, dem Patienten ein Substrat zu verabreichen, welches mit einem Isotop markiert ist. Der bisherige Goldstandard in der Leberdiagnostik, die Leberbiopsie, gibt neben dem invasiven Charakter nicht exakte Abschätzungen wieder. Deshalb besteht der Bedarf an dynamischen Leberfunktionstests. Methodische Probleme haben die klinische Applikation dieser Tests bisher verhindert. Die große Herausforderung von nicht-invasiven Atemtests ist die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beweisen. Um dies zu meistern, benötigt es einem besseren Verständnis der Abatmungsund Subtratpharmakokinetik während des Testablaufes.

8.2. Methoden

In einer prospektiven klinischen Studie wurden freiwillige, gesunde Probanden untersucht. Insgesamt wurden pro Proband fünf Messungen in einem festgelegtem Zeitraum durchgeführt, um vergleichbare Untersuchungsbedingungen sicherzustellen. Für den Test wurde den Probanden ¹³C-Methacetin in unterschiedlichen Mengen intravenös injiziert, und die ¹³CO₂-Konzentration der Ausatemluft in definierten Zeitabständen mit Hilfe des LiMAx-Tests analysiert. Blutentnahmen zur Bestimmung der Methacetin- und Paracetamol-Konzentration erfolgten in kontinuierlichen Abständen. Eine Belastung auf dem Fahrradergometer simulierte in einer weiteren Untersuchungsreihe körperliche Aktivität. Die Serumpharmakokinetik wurde mittels HPLC analysiert. An Tag 1 und 5 wurden den Probanden zur Bestimmung der Laborwerte Blut abgenommen.

8.3. Ergebnisse

Im Zeitraum von Oktober bis Dezember 2008 wurden insgesamt 27 freiwillige Probanden in die Studie eingeschlossen. In die Auswertung wurden letztlich 21 Probanden aufgenommen. Die laborchemische Untersuchung der Probanden bei den Messungen 1 und 5 ergaben fast ausschließlich Werte im Normbereich. Eine Minute nach Injektion von 2 mg/kg ¹³C-Methacetin kam es bei allen Probanden zu einem steilen Anstieg der DOB-Kurve. Vergleicht man die Kurven der einzelnen Probanden miteinander, so sind diese in ihrer Form nahezu identisch. Das Maximum der DOB Kurve wird bei 19 der 21 Probanden nach 4-11 Minuten erreicht. Es ergab sich eine schwache aber signifikante Korrelation zwischen dem Zeitpunkt und dem Wert des Maximums (r=0,522; p=0,015). Identische Kurvenverläufe und

vergleichbare Einzelwerte wurden bei der Messung 2 bei identischem Testablauf festgestellt. Bezüglich der Reproduzierbarkeit des Tests zeigen sich nahezu identische Verläufe der vergleichbaren Messtage. 20 der 21 Probanden (95%) lagen für die intraindividuelle LiMAx Variabilität im Bland Altmann Plot innerhalb des 95% Konfidenz Intervalls. Bezüglich der Dosisabhängigkeit sind die Kurvenverläufe in ihrer Form identisch. Die doppelte Dosierung des Substrats ergab eine ungefähre Verdoppelung der DOB Werte. Die körperliche Belastung bei der Dosierung von 4 mg/kg KG auf die DOB Kinetik wirkte sich gleichsinnig wie bei 2 mg/kg KG aus. Der ¹³C-Methacetinspiegel bei einer Dosierung von 2 mg/kg KG zeigte innerhalb von 10 Minuten einen raschen Abfall. Es zeigte sich kein Einfluss der wiederholten ¹³C-Methacetin Gabe innerhalb von 2 Tagen. Nach Injektion von 4 mg/kg KG ergab sich eine identische ¹³C-Methacetin Kinetik wie bei 2 mg/kg KG. Paracetamol zeigte einen raschen Nachweis innerhalb der ersten Minuten bis zum Erreichen eines konstanten Plateaus, welches für den raschen Abbau des Methacetins spricht. Der Einfluss von körperlicher Belastung im Zeitraum 50.-60. Minute hat lediglich einen Effekt auf die DOB Kinetik als Zeichen für den wichtigen Effekt des Bikarbonatpool. Bei den Messungen unter kontinuierlicher körperlicher Belastung zeigte sich bei beiden Dosierungen eine vollständig andere DOB Kinetik als bei den vorangegangen Messungen in Ruhe.

8.4. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie konnte erstmals wichtige pharmakokinetische Charakteristika des ¹³C-Methacetin Atemtests beschreiben. Die Maximaspiegel der Abbauprodukte (DOBmax) korrelieren eng mit dem schnellen Substratabbau und sind ein zuverlässiger und reproduzierbarer Parameter. Abatmungskinetik und Substratpharmakokinetik zeigen einen signifikanten Unterschied über den Zeitraum von 60 Minuten. Durch die Messung der Substratpharmakokinetik von Methacetin ist der rasche Abbau von Methacetin in der Leber bewiesen. Durch den Kurvenverlauf der Pharmakokinetik des Abbauproduktes Paracetamol wird diese Theorie unterstützt. Jedoch findet die Abatmung des ¹³CO₂ zeitversetzt statt. Somit ist der Einfluss des Transportmediums Bikarbonat hervorgehoben. Die Abatmung des vom Methacetin abgespaltenen ¹³CO₂-Isotops ist aufgrund des Bikarbonatpools im späten Verlauf der Kinetik signifikant verlangsamt. Diese Effekte müssen bei der Entstehung von Ablaufprotokollen der nicht-invasiven Atemtests berücksichtigt werden. Die neue Methodik des LiMAx-Tests, der als zentralen Parameter DOBmax benutzt, erscheint als grundsätzlich geeignete Methode, um zuverlässige Messwerte der Leberfunktionskapazität zu erhalten.

9. Literaturverzeichnis

- 1. Modak AS. Stable Isotope breath tests in clinical medicin: a review. Journal of Breath research 2007;1:R1-R13.
- 2. Goetze O. Validierung des 13C-Methacetin-Atemtestes zur quantitativen Beurteilung der Leberfunktion : prospektive Untersuchung mit der isotopenselektiven nicht-dispersiven Infrarotspektroskopie. . Bochum: Ruhr Universität Bochum; 1998.
- 3. Dodds EC. Variations in alveolar carbon dioxide pressure in relation to meals. J Physiol 1921;54:342-348.
- 4. Schwabe AD, Cozzetto FJ, Bennettlr, Mellinkoff SM. Estimation of fat absorption by monitoring of expired radio-active carbon dioxide after feeding a radioactive fat. Gastroenterology 1962;42:285-291.
- 5. Von Schuching SL, Abt AF. Carbon-14 fat oxidation test: a new method of measuring fat utilization in the human. Adv Tracer Methodol 1965;2:293-302.
- 6. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. Proc Natl Acad Sci U S A 1971;68:2374-2376.
- 7. Phillips N, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo R. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999;729:75-88.
- 8. Klein PD. 13C breath tests: visions and realities. J Nutr 2001;131:1637S-1642S.
- 9. Schoeller DA, Schneider JF, Solomons NW, Watkins JB, Klein PD. Clinical diagnosis with the stable isotope 13C in CO2 breath tests: methodology and fundamental considerations. J Lab Clin Med 1977;90:412-421.
- 10. Klein PD. Clinical applications of 13CO2 measurements. Fed Proc 1982;41:2698-2701.
- 11. Wood HG, C.H. Werkman, A. Hemingway, A.O. Nier. Heavy Carbon as a Tracer in bacterial Fixation of carbon dioxide. J. Biol. Chem. 1940:798-790.
- 12. Braden B, Lembcke B, Kuker W, Caspary WF. 13C-breath tests: current state of the art and future directions. Dig Liver Dis 2007;39:795-805.
- 13. Meineke I, De Mey C, Eggers R, Bauer FE. Evaluation of the 13CO2 kinetics in humans after oral application of sodium bicarbonate as a model for breath testing. Eur J Clin Invest 1993;23:91-96.
- 14. Lacroix M, Mosora F, Pontus M, Lefebvre P, Luyckz A, Lopez-Habib G. Glucose naturally labeled with carbon-13: use for metabolic studies in man. Science 1973;181:445-446.

- 15. Lane EA, Parashos I. Drug pharmacokinetics and the carbon dioxide breath test. J Pharmacokinet Biopharm 1986;14:29-49.
- 16. Fahl J, Wong W, Klein P, Watkins JB. 13CO2-Methacetin breath test (MBT) for hepatic function- a noninvasive approach. Hepatology 1984;4:1094.
- 17. Iikura Y, Iwasaki A, Tsubaki T, Akasawa A, Onda T, Katsunuma T, Miura K, et al. Study of liver function in infants with atopic dermatitis using the 13C-methacetin breath test. Int Arch Allergy Immunol 1995;107:189-193.
- 18. Braden B, Haisch M, Duan LP, Lembcke B, Caspary WF, Hering P. Clinically feasible stable isotope technique at a reasonable price: analysis of 13CO2/12CO2-abundance in breath samples with a new isotope selective-nondispersive infrared spectrometer. Z Gastroenterol 1994;32:675-678.
- 19. Goetze O, Selzner N, Fruehauf H, Fried M, Gerlach T, Mullhaupt B. 13C-methacetin breath test as a quantitative liver function test in patients with chronic hepatitis C infection: continuous automatic molecular correlation spectroscopy compared to isotopic ratio mass spectrometry. Aliment Pharmacol Ther 2007;26:305-311.
- 20. Braden B, Caspary WF, Lembcke B. Nondispersive infrared spectrometry for 13CO2/12CO2-measurements: a clinically feasible analyzer for stable isotope breath tests in gastroenterology. Z Gastroenterol 1999;37:477-481.
- 21. Koletzko S, Haisch M, Seeboth I, Braden B, Hengels K, Koletzko B, Hering P. Isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of Helicobacter pylori infection with 13C-urea breath test. Lancet 1995;345:961-962.
- 22. Schadewaldt P, Schommartz B, Wienrich G, Brosicke H, Piolot R, Ziegler D. Application of isotope-selective nondispersive infrared spectrometry (IRIS) for evaluation of [13C]octanoic acid gastric-emptying breath tests: comparison with isotope ratio-mass spectrometry (IRMS). Clin Chem 1997;43:518-522.
- 23. Adamek RJ, Goetze O, Boedeker C, Pfaffenbach B, Luypaerts A, Geypens B. 13C-methacetin breath test: isotope-selective nondispersive infrared spectrometry in comparison to isotope ratio mass spectrometry in volunteers and patients with liver cirrhosis. Z Gastroenterol 1999;37:1139-1143.
- 24. Rubin T, von Haimberger T, Helmke A, Heyne K. Quantitative determination of metabolization dynamics by a real-time 13CO2 breath test. J Breath Res 2011;5:027102.
- 25. Rubin T, von Haimberger, T., Helmke, A., Lock, J., Stockmann, M., Heyne, K. Liver Status Assessment by Spectrally and Time Resolved IR Detection of Drug Induced Breath Gas Changes. photonics 2016;3:31.
- 26. Stockmann M, Lock JF, Riecke B, Heyne C, Martus P, Fricke M, Lehmann S, et al. Prediction of Postoperative Outcome after Hepatectomy With a New Bedside Test for Maximal Liver Function Capacity. Ann Surg 2009;250:119-125.
- 27. Braden B. [13C-Breath Tests: a Non-Invasive Diagnostic Procedure]. Dt Ärzteblatt 2003;100:3376-3381.

- 28. Ilan Y. Review article: the assessment of liver function using breath tests. Aliment Pharmacol Ther 2007;26:1293-1302.
- 29. Graham DY, Klein PD, Evans DJ, Jr., Evans DG, Alpert LC, Opekun AR, Boutton TW. Campylobacter pylori detected noninvasively by the 13C-urea breath test. Lancet 1987;1:1174-1177.
- 30. Wutzke KD, Glasenapp B. The use of 13C-labelled glycosyl ureides for evaluation of orocaecal transit time. Eur J Clin Nutr 2004;58:568-572.
- 31. Watkins JB, Klein PD, Schoeller DA, Kirschner BS, Park R, Perman JA. Diagnosis and differentiation of fat malabsorption in children using 13C-labeled lipids: trioctanoin, triolein, and palmitic acid breath tests. Gastroenterology 1982;82:911-917.
- 32. Braden B, Faust D, Sarrazin U, Zeuzem S, Dietrich CF, Caspary WF, Sarrazin C. 13C-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis C virus infection. Aliment Pharmacol Ther 2005;21:179-185.
- 33. Giannini EG, Testa R. 13C-breath tests and liver fibrosis. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004;8:51-54.
- 34. Ellenrieder V, Glasbrenner B, Stoffels C, Weiler S, Bode G, Moller P, Adler G. Qualitative and semi-quantitative value of a modified 13C-urea breath test for identification of Helicobacter pylori infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 1997;9:1085-1089.
- 35. Graham DY, Malaty HM, Cole RA, Martin RF, Klein PD. Simplified 13C-urea breath test for detection of Helicobacter pylori infection. Am J Gastroenterol 2001;96:1741-1745.
- 36. Klein PD, Graham DY. Minimum analysis requirements for the detection of Helicobacter pylori infection by the 13C-urea breath test. Am J Gastroenterol 1993;88:1865-1869.
- 37. Barnett C, Snel A, Omari T, Davidson G, Haslam R, Butler R. Reproducibility of the 13C-octanoic acid breath test for assessment of gastric emptying in healthy preterm infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999;29:26-30.
- 38. Braden B, Adams S, Duan LP, Orth KH, Maul FD, Lembcke B, Hor G, et al. The [13C]acetate breath test accurately reflects gastric emptying of liquids in both liquid and semisolid test meals. Gastroenterology 1995;108:1048-1055.
- 39. Braden B, Enghofer M, Schaub M, Usadel KH, Caspary WF, Lembcke B. Long-term cisapride treatment improves diabetic gastroparesis but not glycaemic control. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:1341-1346.
- 40. Duan LP, Braden B, Caspary WF, Lembcke B. Influence of cisapride on gastric emptying of solids and liquids monitored by 13C breath tests. Dig Dis Sci 1995;40:2200-2206.
- 41. Armuzzi A, Marcoccia S, Zocco MA, De Lorenzo A, Grieco A, Tondi P, Pola P, et al. Non-Invasive assessment of human hepatic mitochondrial function through the 13C-methionine breath test. Scand J Gastroenterol 2000;35:650-653.

- 42. Caubet MS, Elbast W, Dubuc MC, Brazier JL. Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: the use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity. J Pharm Biomed Anal 2002;27:261-270.
- 43. Giannini E, Fasoli A, Chiarbonello B, Malfatti F, Romagnoli P, Botta F, Testa E, et al. 13C-aminopyrine breath test to evaluate severity of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:717-725.
- 44. Irving CS, Schoeller DA, Nakamura KI, Baker AL, Klein PD. The aminopyrine breath test as a measure of liver function. A quantitative description of its metabolic basis in normal subjects. J Lab Clin Med 1982;100:356-373.
- 45. Klatt S, Taut C, Mayer D, Adler G, Beckh K. Evaluation of the 13C-methacetin breath test for quantitative liver function testing. Z Gastroenterol 1997;35:609-614.
- 46. Adamek RJ, Bodeker C, Szymanski C, Hagemann D, Pfaffenbach B. [13C-mixed triglyceride CO2 exhalation test. Investigation with an isotope selective, non dispersive infrared spectrophotometer of indirect function of the exocrine pancreas]. Dtsch Med Wochenschr 1999;124:103-108.
- 47. Amarri S, Harding M, Coward WA, Evans TJ, Weaver LT. 13Carbon mixed triglyceride breath test and pancreatic enzyme supplementation in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1997;76:349-351.
- 48. Cole SG, Rossi S, Stern A, Hofmann AF. Cholesteryl octanoate breath test. Preliminary studies on a new noninvasive test of human pancreatic exocrine function. Gastroenterology 1987;93:1372-1380.
- 49. Evenepoel P, Hiele M, Geypens B, Geboes KP, Rutgeerts P, Ghoos Y. 13C-egg white breath test: a non-invasive test of pancreatic trypsin activity in the small intestine. Gut 2000;46:52-57.
- 50. Hiele M, Ghoos Y, Rutgeerts P, Vantrappen G. Measurement of the rate of assimilation of oligo- and polysaccharides by 13CO2 breath tests and isotope ratio mass spectrometry. Biomed Environ Mass Spectrom 1988;16:133-135.
- 51. Jones PJ, Pencharz PB, Clandinin MT. Absorption of 13C-labeled stearic, oleic, and linoleic acids in humans: application to breath tests. J Lab Clin Med 1985;105:647-652.
- 52. Geypens B, Bennink R, Peeters M, Evenepoel P, Mortelmans L, Maes B, Ghoos Y, et al. Validation of the lactose-[13C]ureide breath test for determination of orocecal transit time by scintigraphy. J Nucl Med 1999;40:1451-1455.
- 53. Lifschitz CH, Boutton TW, Carrazza F, Beyreiss K, Schmitz J, Ricour C, Shulman R, et al. A carbon-13 breath test to characterize glucose absorption and utilization in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1988;7:842-847.
- 54. Robertson MD, Livesey G, Mathers JC. Quantitative kinetics of glucose appearance and disposal following a 13C-labelled starch-rich meal: comparison of male and female subjects. Br J Nutr 2002;87:569-577.

- 55. Vonk RJ, Lin Y, Koetse HA, Huang C, Zeng G, Elzinga H, Antoine J, et al. Lactose (mal)digestion evaluated by the 13C-lactose digestion test. Eur J Clin Invest 2000;30:140-146.
- 56. King CE, Toskes PP, Guilarte TR, Lorenz E, Welkos SL. Comparison of the one-gram d-[14C]xylose breath test to the [14C]bile acid breath test in patients with small-intestine bacterial overgrowth. Dig Dis Sci 1980;25:53-58.
- 57. Perri F, Marras RM, Ricciardi R, Quitadamo M, Andriulli A. 13C-breath tests in hepatology (cytosolic liver function). Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004;8:47-49.
- 58. Nista EC, Fini L, Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Cazzato IA, Merra G, et al. 13C-breath tests in the study of microsomal liver function. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004;8:33-46.
- 59. Candelli M, Cazzato IA, Zocco MA, Nista EC, Fini L, Armuzzi A, Camise V, et al. 13C-breath tests in the study of mitochondrial liver function. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004;8:23-31.
- 60. Festi D, Capodicasa S, Vestito A, Mazzella G, Roda E, Vitacolonna E, Petrolati A, et al. Breath tests with stable isotopes: have they a role in liver transplantation? Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004;8:55-58.
- 61. Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Andreoli A, De Lorenzo A, Nista EC, Miele L, et al. Review article: breath testing for human liver function assessment. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:1977-1996.
- 62. Lara Baruque S, Razquin M, Jimenez I, Vazquez A, Gisbert JP, Pajares JM. 13C-phenylalanine and 13C-methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. Dig Liver Dis 2000;32:226-232.
- 63. Festi D, Capodicasa S, Sandri L, Colaiocco-Ferrante L, Staniscia T, Vitacolonna E, Vestito A, et al. Measurement of hepatic functional mass by means of 13C-methacetin and 13C-phenylalanine breath tests in chronic liver disease: comparison with Child-Pugh score and serum bile acid levels. World J Gastroenterol 2005;11:142-148.
- 64. Di Campli C, Angelini G, Armuzzi A, Nardo B, Zocco MA, Candelli M, Santoliquido A, et al. Quantitative evaluation of liver function by the methionine and aminopyrine breath tests in the early stages of liver transplantation. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003;15:727-732.
- 65. Degre D, Bourgeois N, Boon N, Le Moine O, Louis H, Donckier V, El Nakadi I, et al. Aminopyrine breath test compared to the MELD and Child-Pugh scores for predicting mortality among cirrhotic patients awaiting liver transplantation. Transpl Int 2004;17:31-38.
- 66. Holtmeier J, Leuschner M, Schneider A, Leuschner U, Caspary WF, Braden B. 13C-methacetin and 13C-galactose breath tests can assess restricted liver function even in early stages of primary biliary cirrhosis. Scand J Gastroenterol 2006;41:1336-1341.
- 67. Stravitz RT, Reuben A, Mizrahi M, Lalazar G, Brown K, Gordon SC, Ilan Y, et al. Use of the methacetin breath test to classify the risk of cirrhotic complications and mortality in patients evaluated/listed for liver transplantation. J Hepatol 2015;63:1345-1351.

- 68. Jara M, Bednarsch J, Lock JF, Malinowski M, Schulz A, Seehofer D, Stockmann M. [Enhancing safety in liver surgery using a new diagnostic tool for evaluation of actual liver function capacity The LiMAx test]. Dtsch Med Wochenschr 2014;139:387-391.
- 69. Jara M, Malinowski M, Luttgert K, Schott E, Neuhaus P, Stockmann M. Prognostic value of enzymatic liver function for the estimation of short-term survival of liver transplant candidates: a prospective study with the LiMAx test. Transpl Int 2015;28:52-58.
- 70. Oliveira AC, Reber M, Lanzoni V, Ferraz ML, Parise ER. [13C-methacetin breath test in chronic hepatitis C liver disease]. Arq Gastroenterol 2006;43:41-44.
- 71. Lock JF, Reinhold T, Malinowski M, Pratschke J, Neuhaus P, Stockmann M. The costs of postoperative liver failure and the economic impact of liver function capacity after extended liver resection-a single-center experience. Langenbecks Arch Surg 2009:Epub ahead of print.
- 72. Candelli M, Armuzzi A, Nista EC, Fini L, Gasbarrini G, Gasbarrini A. 13C-methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. Aliment Pharmacol Ther 2004;19:243.
- 73. Lalazar G. Follow-up Of Patients With Severe Acute Liver Diseases Using An On-Line 13C-Methacetin Breath Test: A New Tool For Decision Making In Clinical Hepatology. AASLD 2007.
- 74. Petrolati A, Festi D, De Berardinis G, Colaiocco-Ferrante L, Di Paolo D, Tisone G, Angelico M. 13C-methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. Aliment Pharmacol Ther 2003;18:785-790.
- 75. Schneider A, Caspary WF, Saich R, Dietrich CF, Sarrazin C, Kuker W, Braden B. 13C-methacetin breath test shortened: 2-point-measurements after 15 minutes reliably indicate the presence of liver cirrhosis. J Clin Gastroenterol 2007;41:33-37.
- 76. Cozza KL, Armstrong SC, Oesterheld JR. Drug Interaction Principles for Medical Practice Cytochrome P450s. Second Edition ed: American Psychiatric Publishing Inc., 2003.
- 77. Miller FA, Hemingway A, Nier AO, Knight RT, Brown EB, Jr., Varco RL. The development of, and certain clinical applications for, a portable mass spectrometer. J Thorac Surg 1950;20:714-728.
- 78. Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH. Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children, and adults. J Pediatr 1978;93:62-66.
- 79. Irving CS, Wong WW, Shulman RJ, Smith EO, Klein PD. [13C]bicarbonate kinetics in humans: intra- vs. interindividual variations. Am J Physiol 1983;245:R190-202.
- 80. Pfaffenbach B, Gotze O, Szymanski C, Hagemann D, Adamek RJ. [The 13C-methacetin breath test for quantitative noninvasive liver function analysis with an isotope-specific nondispersive infrared spectrometer in liver cirrhosis]. Dtsch Med Wochenschr 1998;123:1467-1471.

- 81. Haisch M. Biomedical application of an isotope selective nondispersive infrared spectrometer for 13CO2 and 12CO2 concentration measurements in breath samples. Isotopenpraxis 1994;30:253-257.
- 82. Wahl E. Applications of cavity ring-down spectroscopy to high precision isotoperatio measurement of 13C/12 C in carbon dioxide Isot. Environ. Health Stud. 2006;1:21-35.
- 83. Slater C, Preston T, Weaver LT. Comparison of accuracy and precision of heart rate calibration methods to estimate total carbon dioxide production during 13C-breath tests. Eur J Clin Nutr 2006;60:69-76.
- 84. Roecker K, Landaw E, Striegel H, Mayer F, Dickhuth HH. First-pass effect of an intravenous bolus of [13C]bicarbonate displayed breath-by-breath. J Appl Physiol 2001;90:2181-2187.
- 85. Pallikarakis N, Sphiris N, Lefebvre P. Influence of the bicarbonate pool and on the occurrence of 13CO2 in exhaled air. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1991;63:179-183.
- 86. Leese GP, Nicoll AE, Varnier M, Thompson J, Scrimgeour CM, Rennie MJ. Kinetics of 13CO2 elimination after ingestion of 13C bicarbonate: the effects of exercise and acid base balance. Eur J Clin Invest 1994;24:818-823.
- 87. Barstow TJ, Cooper DM, Epstein S, Wasserman K. Changes in breath 13CO2/12CO2 consequent to exercise and hypoxia. J Appl Physiol (1985) 1989;66:936-942.
- 88. Marino PL, Sutin KM. The ICU book. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: xvii, 1065 p.
- 89. Maren TH. The kinetics of HCO3- synthesis related to fluid secretion, pH control, and CO2 elimination. Annu Rev Physiol 1988;50:695-717.
- 90. Crandall ED, Bidani A. Effects of red blood cell HCO3(-)/Cl- exchange kinetics on lung CO2 transfer: theory. J Appl Physiol 1981;50:265-271.
- 91. Barstow TJ, Cooper DM, Epstein S, Wasserman K. Changes in breath 13CO2/12CO2 consequent to exercise and hypoxia. J Appl Physiol 1989;66:936-942.
- 92. Wolfe R, Chinkes D. Isotope Tracers in Metabolic Research- Principles and Practice of Kinetic Analysis, 2nd Edition. Wiley- Liss 2005.
- 93. Barstow TJ, Cooper DM, Sobel EM, Landaw EM, Epstein S. Influence of increased metabolic rate on [13C]bicarbonate washout kinetics. Am J Physiol 1990;259:R163-171.
- 94. Hughson RL, Inman MD. Gas exchange analysis of immediate CO2 storage at onset of exercise. Respir Physiol 1985;59:265-278.
- 95. Linnarsson D. Dynamics of pulmonary gas exchange and heart rate changes at start and end of exercise. Acta Physiol Scand Suppl 1974;415:1-68.
- 96. Yunoki T, Horiuchi M, Yano T. Kinetics of excess CO2 output during and after intensive exercise. Jpn J Physiol 1999;49:139-144.

- 97. Coppoolse R, Barstow TJ, Stringer WW, Carithers E, Casaburi R. Effect of acute bicarbonate administration on exercise responses of COPD patients. Med Sci Sports Exerc 1997;29:725-732.
- 98. Schneider JF, Schoeller DA, Nemchausky B, Boyer JL, Klein P. Validation of 13CO2 breath analysis as a measurement of demethylation of stable isotope labeled aminopyrine in man. Clin Chim Acta 1978;84:153-162.
- 99. Ko JW, Sukhova N, Thacker D, Chen P, Flockhart DA. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. Drug Metab Dispos 1997;25:853-862.
- 100. Braden B, Schafer F, Caspary WF, Lembcke B. Nondispersive isotope-selective infrared spectroscopy: a new analytical method for 13C-urea breath tests. Scand J Gastroenterol 1996;31:442-445.
- 101. Irving CS, Klein PD, Navratil PR, Boutton TW. Measurement of 13CO2/12CO2 abundance by nondispersive infrared heterodyne ratiometry as an alternative to gas isotope ratio mass spectrometry. Anal Chem 1986;58:2172-2178.
- 102. Lehmann S. Perioperatives Monitoring der Klatskin-Tumore mittels LiMAx-Test. Berlin: Charité Universitätsmedizin Berlin; 2014.
- 103. Ghoos Y, Beaufrere B. 13C protein breath tests. Gut 1998;43 Suppl 3:S23-24.
- 104. Schoeller DA, Klein PD, Watkins JB, Heim T, MacLean WC, Jr. 13C abundances of nutrients and the effect of variations in 13C isotopic abundances of test meals formulated for 13CO2 breath tests. Am J Clin Nutr 1980;33:2375-2385.
- 105. Peronnet F, Massicotte D, Brisson G, Hillaire-Marcel C. Use of 13C substrates for metabolic studies in exercise: methodological considerations. J Appl Physiol (1985) 1990;69:1047-1052.
- 106. Linnarsson D, Lindborg B. Breath-by-breath measurement of respiratory gas exchange using on-line analog computation. Scand J Clin Lab Invest 1974;34:219-224.
- 107. Barstow TJ, Landaw EM, Springer C, Cooper DM. Increase in bicarbonate stores with exercise. Respir Physiol 1992;87:231-242.
- 108. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. Psychol Bull 1979;86:420-428.
- 109. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;1:307-310.
- 110. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. Stat Methods Med Res 1999;8:135-160.
- 111. Kasicka-Jonderko A, Nita A, Jonderko K, Kaminska M, Blonska-Fajfrowska B. C-methacetin breath test reproducibility study reveals persistent CYP1A2 stimulation on repeat examinations. World J Gastroenterol 2011;17:4979-4986.

- 112. Kasicka-Jonderko A, Chabior E, Blonska-Fajfrowska B. Kinetics of 13CO2 recovery in breath air after peroral administration of 13C-methacetin in two groups of different age. Exp Clin Hep 2006.
- 113. Kasicka-Jonderko A, Jonderko K, Budniok M, Krusiec-Swidergol B, Blonska-Fajfrowska B. Search for an optimum dosage regimen of the substrate for the 13C-methacetin breath. Exp Clin Hep 2006;2:17.
- 114. Lock JF, Taheri P, Bauer S, Holzhutter HG, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Interpretation of non-invasive breath tests using (13)C-labeled substrates--a preliminary report with (13)C-methacetin. Eur J Med Res 2009;14:547-550.
- 115. Ciccocioppo R, Candelli M, Di Francesco D, Ciocca F, Taglieri G, Armuzzi A, Gasbarrini G, et al. Study of liver function in healthy elderly subjects using the 13C-methacetin breath test. Aliment Pharmacol Ther 2003;17:271-277.
- 116. Kasicka-Jonderko A, Jonderko K, Nita A, Blonska-Fajfrowska B. Short- and medium-term reproducibility of 13C-methacetin breath test. Exp Clin Hep 2006;2.
- 117. Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Blonska-Fajfrowska B. The reproducibility of 13CO2 measurement. Aliment Pharmacol Ther 2004;19:142-144.
- 118. Shteyer E, Lalazar G, Hemed N, Pappo O, Granot E, Yerushalmi B, Gross E. Continuous 13C-methacetin breath test differentiates biliary atresia from other causes of neonatal cholestasis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2013;56:60-65.
- 119. Romero A, Cobos A, Lopez-Leon A, Ortega G, Munoz M. Preanalytical mistakes in samples from primary care patients. Clin Chem Lab Med 2009;47:1549-1552.
- 120. Lock JF, Kotobi AN, Malinowski M, Schulz A, Jara M, Neuhaus P, Stockmann M. Predicting the prognosis in acute liver failure: results from a retrospective pilot study using the LiMAx test. Ann Hepatol 2013;12:556-562.
- 121. Lock JF, Schwabauer E, Martus P, Videv N, Pratschke J, Malinowski M, Neuhaus P, et al. Early diagnosis of primary nonfunction and indication for reoperation after liver transplantation. Liver Transpl 2010;16:172-180.
- 122. Isokawa M, Kanamori T, Funatsu T, Tsunoda M. Analytical methods involving separation techniques for determination of low-molecular-weight biothiols in human plasma and blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2014.
- 123. Boutron I, Estellat C, Guittet L, Dechartres A, Sackett DL, Hrobjartsson A, Ravaud P. Methods of blinding in reports of randomized controlled trials assessing pharmacologic treatments: a systematic review. PLoS Med 2006;3:e425.
- 124. Portincasa P, Grattagliano I, Lauterburg BH, Palmieri VO, Palasciano G, Stellaard F. Liver breath tests non-invasively predict higher stages of non-alcoholic steatohepatitis. Clin Sci (Lond) 2006.
- 125. Holzhutter HG, Lock JF, Taheri P, Bulik S, Goede A, Stockmann M. Assessment of hepatic detoxification activity: proposal of an improved variant of the (13)c-methacetin breath test. PLoS One 2013;8:e70780.

- 126. Stockmann M, Lock JF, Malinowski M, Niehues SM, Seehofer D, Neuhaus P. The LiMAx test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery. HPB (Oxford) 2010;12:139-146.
- 127. Dinesen L, Caspary WF, Chapman RW, Dietrich CF, Sarrazin C, Braden B. 13C-methacetin-breath test compared to also noninvasive biochemical blood tests in predicting hepatic fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis C. Dig Liver Dis 2008;40:743-748.
- 128. Stockmann M, Lock JF. How far is the development of 13C-liver-function breath tests? Dig Dis Sci 2013;58:1804-1805.
- 129. Braden B. Methods and functions: Breath tests. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2009;23:337-352.
- 130. Jara M, Reese T, Malinowski M, Valle E, Seehofer D, Puhl G, Neuhaus P, et al. Reductions in post-hepatectomy liver failure and related mortality after implementation of the LiMAx algorithm in preoperative work-up: a single-centre analysis of 1170 hepatectomies of one or more segments. HPB (Oxford) 2015;17:651-658.
- 131. Malinowski M, Jara M, Luttgert K, Orr J, Lock JF, Schott E, Stockmann M. Enzymatic liver function capacity correlates with disease severity of patients with liver cirrhosis: a study with the LiMAx test. Dig Dis Sci 2014;59:2983-2991.
- 132. Bednarsch J, Bluthner E, Malinowski M, Seehofer D, Pratschke J, Stockmann M. Regeneration of Liver Function Capacity After Partial Liver Resection is Impaired in Case of Postoperative Bile Leakage. World J Surg 2016;40:2221-2228.
- 133. Hoppe S, von Loeffelholz C, Lock JF, Doecke S, Sinn BV, Rieger A, Malinowski M, et al. Nonalcoholic steatohepatits and liver steatosis modify partial hepatectomy recovery. J Invest Surg 2015;28:24-31.
- 134. Goetze O. The predictive value of 13C-Methacetin breath test (MBT) for Liver transplantation (LT) and death: a seven year follow-up study of 206 chronic hepatitis C patients hepatology 2015;62:231A.
- 135. Jara M, Bednarsch J, Malinowski M, Pratschke J, Stockmann M. Effects of oxaliplatin-based chemotherapy on liver function--an analysis of impact and functional recovery using the LiMAx test. Langenbecks Arch Surg 2016;401:33-41.
- 136. Raschzok N, Schott E, Reutzel-Selke A, Damrah I, Gul-Klein S, Strucker B, Sauer IM, et al. The impact of directly acting antivirals on the enzymatic liver function of liver transplant recipients with recurrent hepatitis C. Transpl Infect Dis 2016;18:896-903.
- 137. Kaffarnik MF, Lock JF, Vetter H, Ahmadi N, Lojewski C, Malinowski M, Neuhaus P, et al. Early diagnosis of sepsis-related hepatic dysfunction and its prognostic impact on survival: a prospective study with the LiMAx test. Crit Care 2013;17:R259.
- 138. Brinkhaus G, Lock JF, Malinowski M, Denecke T, Neuhaus P, Hamm B, Gebauer B, et al. CT-guided high-dose-rate brachytherapy of liver tumours does not impair hepatic function and shows high overall safety and favourable survival rates. Ann Surg Oncol 2014;21:4284-4292.

- 139. Hafeez S, Ahmed MH. Bariatric surgery as potential treatment for nonalcoholic fatty liver disease: a future treatment by choice or by chance? J Obes 2013;2013:839275.
- 140. Strassburg CP, Manns MP. Approaches to liver biopsy techniques--revisited. Semin Liver Dis 2006;26:318-327.
- 141. Alizai PH, Wendl J, Roeth AA, Klink CD, Luedde T, Steinhoff I, Neumann UP, et al. Functional Liver Recovery After Bariatric Surgery--a Prospective Cohort Study with the LiMAx Test. Obes Surg 2015;25:2047-2053.

10. Abbildungsverzeichnis

und in der Lunge (rechts)
Abbildung 2: Beziehung zwischen dem pH-Wert und der Bikarbonatkonzentration21
Abbildung 3: Kompartmentmodell zur Verteilung des CO2.(79)
Abbildung 4: Semilog-Plot der Kinetik des ¹³ CO ₂ nach intravenöser Injektion von ¹³ C-markiertem Bikarbonat in Ruhe, leichter und schwerer körperlicher Belastung.(93)24
Abbildung 5: Prinzip des Atemtests.(2, 10)
Abbildung 6: Umwandlung ¹³ C–Methacetin in Paracetamol und ¹³ CO ₂ 31
Abbildung 7: ¹³ C-Methacetin- Flasche Abbildung 8: Injektionssystem
Abbildung 9: NDIRS FANci 2db16–Messgerät
Abbildung 10: Levetirazetam- Messmethodik Chromsystem
Abbildung 11: ¹³ C-Methacetin und Paracetamol auf Levetirazetam Methode36
Abbildung 12: Verhalten der Herzfrequenz bei Probanden durchschnittlicher Leistungsfähigkeit während leichter und schwerer dynamischer Arbeit mit konstanter Leistung (rot: Erholungssumme).
Abbildung 13: Individuelle DOB Kinetik von 20 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg KG 13C-Methacetin (Messung 1)
Abbildung 14: Individuelle DOB Kinetik von 20 Probanden nach Injektion von 4 mg/kg KG 13C-Methacetin (Messung 3)44
Abbildung 15: Individuelle Isotopenwiederfindungsraten von 20 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg KG ¹³ C –Methacetin (Messung 1). Die Berechnung der einzelnen Kurvenwerte erfolgte analog zur LiMAx Berechnungsformel für jeden Messzeitpunkt. 45
Abbildung 16: Vergleich der mittleren DOB Kinetik für identische Dosierungen von 2 mg/kg KG (Messung 1 und 2). Median mit Quartilen als Fehlerbalken
Abbildung 17: Korrelation von DOBmax zwischen Messung 1 und 2
Abbildung 18: Korrelation von TMax zwischen Messung 1 und 2

Abbildung 19: Bland-Altman-Plot für die Reproduzierbarkeit des LiMAx Wertes an Messung 1 und 2
Abbildung 20: Vergleich der mittleren DOB Kinetik für unterschiedliche Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 2 und 3). Median mit Quartilen als Fehlerbalken
Abbildung 21: Korrelation von DOBmax zwischen Messung 2 und 3
Abbildung 22: Korrelation von TMax zwischen Messung 2 und 3
Abbildung 23: Individuelle Substratpharmakokinetik von ¹³ C-Methacetin im Serum bei 21 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg KG (Messung 1)
Abbildung 24: Reproduzierbarkeit der Substratpharmakokinetik von ¹³ C-Methacetin im Serum 2 mg/kg KG (Messung 1 und 2). Median mit Quartilen als Fehlerbalken58
Abbildung 25: Individuelle Substratpharmakokinetik von ¹³ C-Methacetin im Serum bei 21 Probanden nach Injektion von 4 mg/kg KG (Messung 3)
Abbildung 26: Vergleich der Substratpharmakokinetik von ¹³ C-Methacetin im Serum für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 1 und 3). Median mit Quartilen als Fehlerbalken
Abbildung 27: Individuelle Produktpharmakokinetik von Paracetamol im Serum bei 21 Probanden nach Injektion von 2 mg/kg KG ¹³ C-Methacetin (Messung 1)63
Abbildung 28: Reproduzierbarkeit der Produktpharmakokinetik von Paracetamol für die Dosierung von 2 mg/kg KG (Messung 1 und 2). Median mit Quartilen als Fehlerbalken.
Abbildung 29: Individuelle Produktpharmakokinetik von Paracetamol bei 21 Probanden nach Injektion von 4 mg/kg KG ¹³ C-Methacetin (Messung 3)
Abbildung 30: Vergleich der Produktpharmakokinetik von für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 1 und 3). Median mit Quartilen als Fehlerbalken
Abbildung 31: Vergleich der Metabolisierungsprodukte von ¹³ C-Methacetin (DOB und Paracetamol) für Dosierung von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 1 und 3)70
Abbildung 32:Vergleich der mittleren DOB Kinetik unter körperlicher Belastung für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 4& 5). Median mit Quartilen als Fehlerbalken

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 33: Vergleich der mittleren ¹³ C-Methacetin Kinetik unter körperlicher Belastun
für Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 4& 5). Median mit Quartilen a
Fehlerbalken
Abbildung 34: Vergleich der mittleren Paracetamol Kinetik unter körperlicher Belastung fü
Dosierungen von 2 und 4 mg/kg KG (Messung 4& 5). Median mit Quartilen a
Fehlerbalken7
Abbildung 35: schematische Darstellung des Drei-Kompartment-Modells zur Beschreibun
der Kinetik von ¹³ C -Methacetin, Paracetamol und ¹³ CO ₂ .(125)8

Tabellenverzeichnis

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der nichtinvasiven ¹³ C-Atemtests				
Tabelle 2: Statische und dynamische Tests in der klinischen Diagnostik.	14			
Tabelle 3: In der Literatur beschriebene Auswertungsparameter	16			
Tabelle 4: Normalwerte von CO ₂ in arteriellem und venösem Blut	19			
Tabelle 5: Übersicht zum Ablauf der Kinetikstudie	29			
Tabelle 6: Probandencharakteristika	40			
Tabelle 7: Laborwerte der Probanden zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe	41			
Tabelle 8: Vergleich der untersuchten Parameter über Messungen 1-3	69			
Tabelle 9: Vergleich der untersuchten Parameter unter körperlicher Belastung	72			

4		_	-		1		•
ı	2.		Λh	en		പ	118
ı	<i>Z</i> -	1	CU			1	uı

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Publikationen

- Taheri P, Lock JF, Bauer S, Neuhaus P, Stockmann M. The Influence of Bicarbonate
 Kinetics on Non-Invasive Breath Tests with ¹³C-Labelled Substrates Results from
 the ¹³C-Methacetin Breath Test. 3rd International Conference on Breath Gas
 Analysis for Medical Diagnostics, Dortmund 2009.
- 2. Lock JF, Taheri P, Bauer S, Holzhütter HG, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M. Interpretation of non- invasive Breath Tests using 13C- labeled Substrates- a preliminary Report with 13C- Methacetin, Eur J Med Res. (2009)14: 547-550.
- 3. Holzhütter HG, Lock JF, Taheri P, Bulik S, Goede A, Stockmann M. Assessment of hepatic detoxification activity: proposal of an improved variant of the (13)c-methacetin breath test, PLoS One. (2013)15; 8(8).

14. Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Pouria Taheri, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchung von ¹³CO₂ Entstehung, Verteilung und Ausscheidung zur verbesserten Interpretation der Ergebnisse beim ¹³C-Methacetin Atemtest zur Messung der enzymatischen Leberfunktion" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Pouria Taheri hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Kongressteilnahme:

Taheri P, Lock JF, Bauer S, Neuhaus P, Stockmann M.

The Influence of Bicarbonate Kinetics on Non-Invasive Breath Tests with ¹³C-Labelled Substrates-Results from the ¹³C-Methacetin Breath Test. 3rd International Conference on Breath Gas Analysis for Medical Diagnostics, Dortmund 2009.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Erstellung der Arbeit und der Präsentation sowie Vortrag auf dem Kongress.

Publikation 1:

Lock JF, Taheri P, Bauer S, Holzhütter HG, Malinowski M, Neuhaus P, Stockmann M.

Interpretation of non-invasive Breath Tests using ¹³C-labeled Substrates- a preliminary Report with ¹³C-Methacetin, Eur J Med Res. (2009)14: 547-550.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Mitarbeit an den Ergebnissen und am Manuskript sowie am Veröffentlichungsprozess.

Publikation 2:

Holzhütter HG, Lock JF, Taheri P, Bulik S, Goede A, Stockmann M.

Assessment of hepatic detoxification activity: proposal of an improved variant of the (13)c-methacetin breath test, PLoS One. (2013)15; 8(8).

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Erstellen der Ergebnisse sowie Kooperation bei offenen Fragen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

15. Danksagung

Ich danke...

- ... meinen Eltern, Dr. med Seyed-Abbas Taheri und Dr. med. Soudabeh Safavi, für Ihren unerschüttlichen Willen und Ihre bedingungslose Unterstützung, ohne denen Ich nie meinen Weg hätte gehen können sowie für das stetige Vorbild, dass sie mir und meinen Geschwistern sind.
- ... Herrn Prof. Dr. med. Peter Neuhaus für die Möglichkeit, diese Studie und Doktorarbeit an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité durchzuführen.
- ... ganz besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Stockmann für die freundliche Überlassung dieses Doktorarbeitsthemas, die Unterstützung während der Durchführung sowie die stets geduldige und versierte Betreuung.
- ... Dr. med. Johan Friso Lock für Hilfe und Beratung bei allen klinischen und statistischen Fragestellungen, für die unermüdlich positive Zuwendung und Geduld mit dem Entwicklungsprozess dieser Arbeit.
- ... Hr. Dr. med. Stefan Bauer, der sich in intensiver Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe die Zusammensetzung der HPLC Messung überlegt und erstellt hat.
- ... den Pflegenden und Ärzten der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Virchow Klinikums, die die Durchführung dieser klinischen Studie erst möglich gemacht haben.
- ... den Studienprobanden, die sich dazu bereit erklärt haben, an dieser Studie teilzunehmen.
- ... von ganzem Herzen: meiner Ehefrau Bilge, die mich immer unterstützend und liebevoll begleitet und meinen Kindern Ava und Mavi, mit denen ich das Leben von Neuem beginne.