

3. Probanden und Versuchsablauf

3.1. Rekrutierung der Probanden

Das Probandenkollektiv dieser randomisierten, doppelblind angelegten Studie setzte sich aus freiwilligen jungen, gesunden Männern mit positivem H.pylori-Status zusammen, die mit Hilfe von Informationsblättern rekrutiert wurden, die in verschiedenen Institutionen der Berliner Universitäten, in Vereinen und bei medizinischen Fortbildungsveranstaltungen in Berlin ausgelegt bzw. verteilt worden waren.

Durch ein nicht-invasives Screening-Verfahren wurden Interessenten mittels einer einfachen Blutabnahme auf ihren Antikörpertiter gegen H.pylori hin untersucht. Wenn sich durch das genannte Verfahren das Vorliegen einer H.pylori-Infektion bestätigte, wurde mit dem nicht-invasiven C¹³-Harnstoffatemtest eine Besiedlung des Magens mit H.pylori überprüft. Vor Beginn der Studienversuche wurden die als H.pylori-positiv identifizierten Probanden zur Dokumentation eines gesunden Körperstatus folgenden standardisierten Untersuchungen unterzogen: ärztliche Untersuchung, EKG, Gastroskopie und Laboruntersuchung mit den wichtigsten hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern.

Nach eingehender Aufklärung der Probanden über den Studienverlauf, über die Wirkungen und Nebenwirkungen der in der Studie verwendeten Medikamente sowie in Hinblick auf die Vertraulichkeit der Studiendaten unterzeichneten die freiwilligen Probanden eine schriftliche Einverständniserklärung. Die Probanden konnten ohne Nennung von Gründen ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie jederzeit zurückziehen. Schieden Probanden aus der Studie aus, wurden diese Fälle und die Gründe oder Probleme, die während der Behandlung auftraten, dokumentiert. Das Studienprotokoll vom 10.12.1993 wurde von der Ethikkommission der Freien Universität Berlin geprüft und mit Brief vom 25.02.1994 als unbedenklich bewertet. Für die Gesamtdauer der Studie waren die freiwilligen Probanden durch eine Vereinbarung mit dem Haftpflichtverband der Deutschen Industrie (Police-Nr.: 20-03245-03020-390 vom 03.01.1994) versichert.

Im Rahmen der Voruntersuchung wurden die Probanden in bezug auf ihre medizinische Anamnese und ihre medizinischen Befunde entsprechend den im

Studienprotokoll festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien überprüft, die im folgenden angegeben sind.

Einschlusskriterien

1. Positiver H.pylori-Status,
2. gesunde männliche Freiwillige,
3. Einverständniserklärung des Probanden zur Teilnahme an der Studie nach schriftlicher Information und der daran anschließenden verbalen Aufklärung über den Studienverlauf und die eventuell auftretenden Nebenwirkungen der Studienmedikamente.

Ausschlusskriterien

1. Alter unter 18 Jahren,
2. Allergie gegen Penicillin,
3. Reflux- oder peptische Ulkuserkrankung,
4. vorausgegangene Magenoperation (mit Ausnahme der Übernähung bei Magenperforation),
5. Anamnese einer schweren Herz-, Nieren- oder Lebererkrankung,
6. maligne Erkrankung des oberen gastrointestinalen Traktes, einschließlich Zollinger-Ellison-Syndrom,
7. bestehende Erkrankungen oder pathologische Befunde, die die Auswertung der Studie beeinflussen,
8. klinisch bedeutsame pathologische Befunde bei der Voruntersuchung oder bei den Laborparametern,
9. chronischer Alkoholabusus, Drogenabhängigkeit oder Bedingungen, die auf eine schlechte Compliance hinweisen,
10. innerhalb der letzten vier Wochen Behandlung mit einem Medikament, das in der Studie eingesetzt werden sollte und
11. parallele Behandlung mit Kortison, nichtsteroidalen Antiphlogistica oder Azetylsalizylsäure (> 100 mg/Tag).

3.2. Studiendesign

Die Studie wurde als randomisierte Doppelblindstudie unter Verwendung der „Double-dummy“-Technik zur Feststellung einer Wechselwirkung bei der kombinierten Anwendung von Amoxicillin und Omeprazol bei H.pylori-positiven männlichen Gesunden durchgeführt, wobei Amoxicillin und Omeprazol jeweils allein sowie in Kombination verabreicht wurden. Dafür wurde ein Dosierungsschema von 2x40 mg Omeprazol täglich über fünf Tage sowie von 2x750 mg Amoxicillin täglich über fünf Tage ausgewählt.

Omeprazol entwickelt aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften sein optimales Wirkungsspektrum am dritten bis fünften Tag der Behandlung (Howden et al 1984). Aus diesem Grunde wurden die Messung der intragastralen pH-Werte und die simultanen Blutabnahmen am fünften Behandlungstag vorgenommen.

Eine Eradikation von H.pylori mit der angewandten Kombination ist innerhalb von fünf Tagen nicht zu erwarten (Daw et al. 1991). Eine Tagesdosis von 2x40 mg Omeprazol wurde ausgewählt, um eine konstante und ausgeprägte Säuresuppression über den Tag und die Nacht erreichen zu können.

Bei den Probanden, die insgesamt viermal (jeweils an einem Samstag oder Sonntag) zu pH-Metriem und Blutabnahmen erschienen, wurde (nach einer Run-in-Periode) am ersten Studientag, eine 22-stündige intragastrale pH-Metrie mit begleitenden Blutabnahmen zur Serumbestimmung der Pharmaka durchgeführt. Die weiteren Studientage folgten in einem Abstand von jeweils fünf Wochen, um innerhalb von vier Wochen ein ausreichendes „wash-out“ der Medikamente zu gewährleisten. Die Dauer der Studie umfaßte für die einzelnen Probanden somit einen Zeitraum von 16 Wochen, innerhalb dessen sie drei doppelblinde und randomisierte Behandlungszyklen mit 2x750 mg Amoxicillin, 2x40 mg Omeprazol und die Kombination von Amoxicillin und Omeprazol erhielten. Am Ende einer jeden „wash-out“-Phase wurde zur Kontrolle des H.pylori-Status ein C¹³-Harnstoffatemtest durchgeführt. Außerdem wurden die Nebenwirkungen nach jeder Behandlung dokumentiert.

3.3. Studienmedikamente

Die in der Studie verwendeten Medikamente waren:

1. Orale Einnahme von *40 mg Omeprazol* (magenresistente, dünndarmlösliche Kapseln) vor den Mahlzeiten, morgens um 8.00 Uhr und abends um 20.00 Uhr, mit mindestens 200 ml Flüssigkeit. Hergestellt wurden die Kapseln mit dem Handelsnamen Losec® von der Firma Astra AB, Mölndal, Schweden (Chargennummer: H-743/2/4/4 und H-761/2/3/3).
2. Orale Gabe von *750 mg Amoxicillin* (Tabletten) vor den Mahlzeiten, morgens um 8.00 Uhr und abends um 20.00 Uhr, mit mindestens 200 ml Flüssigkeit. Hergestellt wurden die Tabletten von der Firma Astra AB, Mölndal, Schweden mit dem Handelsnamen Imacillin® (Chargennummer: H-783/2/2/1 und H-783/2/2/2).

Alkohol oder die Studie beeinflussende Medikamente waren entsprechend den Ausschlusskriterien nicht erlaubt. Während der Studie eventuell notwendige medikamentöse Behandlungen wurden dokumentiert. Die Studienmedikation erfolgte nach einem Randomisierungscode, der erst nach Ende der Studie zugänglich war.

Für Notfälle, die möglicherweise im Zusammenhang mit den Versuchen an den Probanden hätten auftreten können, lag in unserem Labor ein Notfall-Randomisierungsplan in einem verschlossenen Briefumschlag bereit, der nach Beendigung der Versuchsreihe unversehrt an die Herstellerfirma zurückgegeben werden konnte. In Tabelle 3.1 ist diese Randomisierungsliste dargestellt:

Tabelle 3.1.: Randomisierungsplan für die placebokontrollierte, doppelblinde Studie

Proband	Visite 3	Visite 5	Visite 7	Sequenz
10002	O/P	A/P	O/A	1
10004	O/A	O/P	A/P	4
10005	A/P	O/A	O/P	5
10006	A/P	O/P	O/A	3
10007	O/P	A/P	O/A	1
10009	O/A	O/P	A/P	4
10011	O/A	O/P	A/P	6
10012	A/P	O/A	O/P	5
10013	A/P	O/A	O/P	5
10014	O/P	A/P	O/A	1
10016	O/A	A/P	O/P	6
10017	O/A	O/P	A/P	4
10019	O/P	A/P	O/A	1
10020	O/A	O/P	A/P	4
10021	O/P	O/A	A/P	2
10022	O/A	A/P	O/P	6
10026	O/A	O/P	O/A	4
10028	O/P	A/P	O/A	1
10029	A/P	O/P	O/A	3
10030	O/P	O/A	A/P	2
10032	A/P	O/P	O/A	3
10034	A/P	O/A	O/P	5
10035	O/P	O/A	A/P	2
10036	O/P	A/P	O/A	1

Anmerkung:

A = Amoxicillin; O = Omeprazol; P = Placebo; O/A = Omeprazol plus Amoxicillin

3.4. Versuchsablauf eines Studientages

Nach der Voruntersuchung, die in Abschnitt 3.1. beschrieben ist, gestaltete sich der Studienablauf im Rahmen des jeweiligen stationären Aufenthaltes wie nachstehend dargestellt.

3.4.1. Kalibrierung der intragastralen Sonden

Die für jeden Probanden gekennzeichnete und registrierte intragastrale pH-Elektrode (Lot 440-Ingold Messtechnik, Urdorf, Switzerland) wurde vor Gebrauch aus dem Schutzgefäß genommen und gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die Elektroden bei Raumtemperatur für jeweils zehn Minuten in einem Puffer mit einem pH-Wert von 7,01 und anschließend in einer pH 1,07-Pufferlösung kalibriert und daraufhin die Sonden nach nochmaliger Spülung mit destilliertem Wasser dem Probanden transnasal appliziert.

3.4.2. Legen der intragastralen Sonden und Durchleuchtung der Probanden

Morgens um 7.00 Uhr wurden den nüchternen Probanden in einer sitzenden Position zunächst die Magenelektroden gelegt. Manchmal war es notwendig, die Nasenhöhle und den Rachen des Probanden mit einem Lokalanästhetikum einzusprühen, um ein eventuell auftretendes Würgen zu lindern und einen möglicherweise reflektorisch ausgelösten Husten- oder Brechreiz zu unterdrücken. Der Kopf des Patienten wurde leicht nach hinten geneigt und mit einer Hand gestützt. Mit der anderen Hand wurde die Sonde sorgfältig in die Nase eingeführt und der Kopf wurde dann nach vorn geneigt. Anschließend wurde die Sonde langsam über den Ösophagus in den Magen geschoben. Die Elektrode wurde 5 cm unterhalb der Kardie am Übergang Fundus/Korpus des Magens positioniert.

Da die Sonden durch Ringmarken gekennzeichnet waren, konnte zum einen die Sondenlänge abgeschätzt werden, zum anderen war es bei der ersten pH-Metrie (Run-in-Phase) möglich, den Übergang vom Ösophagus zum Magen am pH-Sprung (vom alkalischen zum sauren Bereich) zu erkennen. Die beim ersten Experiment ermittelte Sondenlänge wurde für jeden Probanden notiert und bei den

Folgeexperimenten berücksichtigt. Mit Hilfe einer radiologischen Durchleuchtung konnte die Lage der Sondenspitze festgestellt und gegebenenfalls korrigiert werden.

Die Durchleuchtung mit dem Röntgengerät (Siregraph B) wurde mit 70 KV und 250 A/s standardisiert und fand unter strikter Einhaltung der Bestimmungen des Strahlenschutzgesetzes in der Röntgenabteilung des Krankenhauses am Urban statt. Eine schriftliche Genehmigung zur Durchführung dieser Durchleuchtungen lag von der zuständigen Berliner Behörde vor. Die Durchleuchtungszeiten der einzelnen Visiten jedes Probanden sind dokumentiert worden (vgl. Tabelle 5.8.). Nach eventueller Korrektur der Sonde wurde diese mit einem Pflasterstreifen am Nasenrücken, an der Wange und an der Halsseite fixiert. Daraufhin wurde die Sonde am Festspeicher (Digitrapper MK III; Synectics Medical AB, Stockholm, Schweden) konnektiert und das pH-Metrie-Programm durch Einschalten des Digitrapper um 8.00 Uhr gestartet. Die ca. 20 cm x 15 cm großen Digitrapper konnten dabei in den dafür vorgesehenen Digitrappertaschen am Gürtel um die Hüfte getragen werden.

3.4.3. Legen eines venösen Zugangs und Tabletteneinnahme

Direkt nach dem Legen eines Venenkatheters (meist am lateralen Unterarm) wurde die erste Blutabnahme um 8.00 Uhr, also mit Beginn der intragastralen Magen-pH-Metrie, durchgeführt. Über die Kanüle wurde entsprechend den im Protokoll angegebenen Zeiten über den Tag und über die Nacht Blut entnommen (vgl. Tabelle 3.3.). Direkt im Anschluß an die erste Blutentnahme nahmen die noch nüchternen Probanden ihre morgendliche Studienmedikation per os ein. Am stationären Studientag wurde die Einnahme der Studienmedikation durch „mouth-check“ kontrolliert. Die Einnahmekompliance während der vorausgegangenen Tage wurde anhand der zurückgebrachten leeren Medikamentenschachteln dokumentiert (vgl. Tabelle 5.23.).

3.4.4. Standardisierte Blutabnahmen

Am Studientag wurden den Probanden entsprechend den in Tabelle 3.2. vorgeschriebenen Zeiten jeweils 5 ml Blut für die Bestimmung der Omeprazol- und Amoxicillin-Serumkonzentration abgenommen. Innerhalb von 30 min wurden die abgenommenen Monovetten zentrifugiert, anschließend in die zuvor beschrifteten Serumröhrchen umgefüllt und bei -30°C eingefroren. Jedes Serumröhrchen wurde mit der entsprechenden Probanden- und Studiennummer, mit dem Datum, der Uhrzeit und der Röhrchennummer versehen. Alle Serumröhrchen wurden dann zur Bestimmung des Amoxicillin- und Omeprazolspiegels in Trockeneis an das Labor für bioanalytische Chemie der Firma Astra Hässle AB in Mölndal (Schweden) und an das Labor für Mikrobiologie in Solna (Schweden) geschickt. Tabelle 3.2. zeigt den Tagesablauf mit Blutabnahmen, pH-Metrie und Mahlzeiten.

Tabelle 3.2.: Versuchsablauf der 22-stündigen pH-Metrie mit Zeitangabe der Blutabnahmen und Mahlzeiten

Zeit	Blutabnahmen	Aktivitäten
07.00		Legen des venösen Zugangs, transnasale Applikation der pH-Elektrode
08.00	1	Referenzblutabnahme, Einnahme der Studienmedikation, Start der pH-Metrie, radiologische Lagekontrolle der pH-Elektrode
08.15		Standardisiertes Frühstück
08.30	2	
09.00	3	
10.00	4	
10.30	5	
11.00	6	
12.00	7	
13.00		Standardisiertes Mittagessen
14.00	8	
16.00	9	
18.00	10	
20.00	11	Einnahme der Studienmedikamente
20.15		Standardisiertes Abendessen
20.30	12	
21.00	13	
21.30	14	
22.00	15	
23.00	16	
24.00	17	
02.00	18	
04.00	19	
06.00	20	Ende der pH-Metrie-Aufzeichnung

In der Run-in-Phase wurden zum Nachweis fehlender Wirkspiegel von Omeprazol und Amoxicillin nur vier Blutabnahmen durchgeführt, und zwar um 8.00, 10.00, 12.00 und 14.00 Uhr.

Während des gesamten Studientages hielten sich die Probanden im Bereich des pH-Metrie-Labors auf, wo alle Versuchsabläufe inklusive pH-Metrien, Blutabnahmen sowie die Einnahme der standardisierten Mahlzeiten erfolgten. Für die Probanden waren sowohl Unterhaltungs- als auch Schlafmöglichkeiten bereitgestellt worden. Von 23.00 hr bis 6.00 Uhr schliefen die Probanden.

3.4.5. Standardisierte Mahlzeiten

Das Frühstück wurde um 8.15 Uhr, das Mittagessen um 13.00 Uhr und das Abendbrot um 20.15 Uhr eingenommen. Es ist davon auszugehen, daß eine proteinangereicherte Mahlzeit durch Säurestimulation den pH-Wert erniedrigt. Eine ausgewogene, standardisierte Diät mit festgelegten Zeiten ist notwendig, um eine angemessene Reproduzierbarkeit der pH-Metrien zu erreichen. Der folgende standardisierte Diätplan wurde in Zusammenarbeit mit einer Diätassistentin des Krankenhauses am Urban zusammengestellt und die Mahlzeiten entsprechend zubereitet. Den Probanden wurde im Verlauf eines Studientages Nahrung von insgesamt 2573 kcal (10.756 kJ) angeboten, wobei sich die Mahlzeiten aus 66 g Eiweiß (19%), 102 g Fett (19,7%), 317 g Kohlenhydrate (61,1%) zusetzten. Die folgende Tabelle 3.3 bietet einen Diätplan mit genauer Aufstellung der standardisierten Mahlzeiten zum Frühstück, Mittagessen und Abendessen unter Berücksichtigung von Angaben der Anteile an Eiweiß, Kohlenhydrate, Fett und deren Kalorienzahl.

Tabelle 3.3.: Detaillierte Zusammenstellung der standardisierten Mahlzeiten

Frühstück						
Lebensmittel	(in g)	kcal	kJ	Eiweiß (in g)	Fett (in g)	Kohlenhydrate (in g)
Weizenbrot	100	232,0	968,0	7,5	1,5	47,0
Butter	30	226,2	946,8	0,2	25,0	0,2
Erdbeermarmelade	25	58,5	244,8	0,1	0,0	14,6
Honig	25	81,3	340,3	0,1	0,0	20,3
Edamer (30 %)	30	75,3	315,6	7,9	4,9	0,0
Fruchtjoghurt	150	141,0	586,5	4,4	4,7	20,3
Orangensaft	200	94,0	390,0	1,4	0,4	2,1
Gesamt	560	908,3	3.792,0	21,6	36,4	123,3

Mittagessen						
Lebensmittel	(in g)	kcal	kJ	Eiweiß (in g)	Fett (in g)	Kohlenhydrate (in g)
Rindfleisch	180	313,2	1.312,2	37,1	18,4	0
Braune Sauce	100	95,0	400,0	3,0	7,0	7,0
Möhrengemüse	150	45,0	187,5	1,4	0,3	9,2
Margarine	10	72,2	302,3	0,1	8,0	0,1
Kartoffeln	200	140,0	528,0	4,0	0	30,8
Eisbergsalat	100	12,0	49,0	1,7	0,2	0,9
Joghurt (mager)	40	12,8	53,3	1,4	0,1	1,7
Grießpudding	150	151,5	636,0	4,1	5,1	23,4
Kirschsirup	40	109,6	458,4	0	0	27,4
Gesamt	970,0	951,3	3.980,7	52,6	39,0	100,3

Abendessen						
Lebensmittel	g	kcal	kJ	Eiweiß (in g)	Fett (in g)	Kohlenhydrate (in g)
Vollkornbrot	50	104,0	435,0	3,8	0,8	20,5
Mischbrot	100	232,0	968,0	7,5	1,5	47,0
Halbfettmargarine	30	110,4	462,0	0,5	12,0	0,1
Frischkäse/Kräuter (20 %)	20	20,4	85,6	2,5	0,8	0,7
Steppenkäse 30 %	30	75,3	315,6	8,0	4,9	0,0
Tomaten	150	25,5	109,5	1,5	0,3	4,3
Gurkensalat	200	26,0	108,0	1,2	0,4	4,4
Öl/Essig/Gemüse	5	44,9	187,9	0	4,9	0,0
Apfel	150	75,0	312,0	0,3	0,9	16,4
Gesamt	765	713,5	2.983,6	25,1	26,6	93,4

3.4.6. Ziehen der intragastralen Sonde und Speichern der Digitrapperdaten im Computer

Am Ende eines jeden Studienablaufes wurden die Probanden um 6.00 Uhr geweckt, um das Digitrappergerät (Digitrapper MK III; Synectics Medical AB, Stockholm, Schweden) auszuschalten. Anschließend wurde den Probanden die intragastrale Sonde gezogen. Die pH-Metrie-Daten (4 pH-Messungen pro sec) vom Digitrappergerät der einzelnen Probanden konnten nun auf den IBM-Computer (Caretta) übertragen, über das Statphac program (Version 2.30, Synectics Medical AB, Stockholm, Schweden) ausgewertet (Median im Intervall von 10 min) und über ein bildgebendes Verfahren in ein 22-stündiges pH-Profil transformiert und ausgedruckt werden.

3.4.7. Erneute Kalibrierung der intragastralen Sonden

Nach sachgerechter Reinigung der Glaselektroden mit Aqua dest. erfolgte nach Abschluß der pH-Metrie eine erneute Kalibrierung. Intragastrale Elektroden mit einem Sondendrift > 0,3 pH-Einheiten wurden ausgesondert.

3.4.8. Desinfektion der intragastralen Sonden

Nach Beendigung der pH-Metrie und Driftkontrolle werden die pH-Elektroden für 20–30 min in eine Desinfektionslösung (Cidex®, Instrumenten Desinfektionsmittel Lösung, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland) gelegt, um für den nächsten Gebrauch eine keimfreie Elektrode zu gewährleisten und somit eine Infektion oder Reinfektion der Probanden verhindern zu können. Nach ausreichender Desinfektion wurden die Elektroden mittels Aqua dest. vom Desinfektionsmittel gereinigt und zur Aufbewahrung in die mit Frisolylt-Lösung gefüllten Schutzgefäße wieder zurückgesteckt.