

## **4. Methoden und Studienmedikamente**

### **4.1. Intra-gastrale pH-Metrie**

#### **4.1.1. Auswahl, Wertigkeit und diagnostische Anwendungsmöglichkeiten der intra-gastralen Langzeit-pH-Metrie**

Die 24-stündige intra-gastrale pH-Metrie ist ein standardisiertes Verfahren zur Messung der Magenazidität. Das pH-Metrie-Meßsystem besteht aus einer pH-Elektrode, einem tragbaren Festkörperspeicher und einem Auswertungssystem. Durch das sehr praktikable Meßsystem lassen sich intra-gastrale Messungen auch unter normalen Lebensbedingungen ohne großen Aufwand durchführen; das heißt, die intra-gastrale Langzeit-pH-Metrie mit Glas- oder Antimonelektroden stellt gegenüber der sehr aufwendigen Aspirationsmethode und der intra-gastralen Titrationsmethode die Methode der Wahl für den ambulanten Bereich dar (Dammann et al. 1990; Savarino et al. 1995). Sie ermöglicht eine frühzeitige Überwachung einer antisekretorischen Therapie zur Ermittlung des Effektes und der Compliance des Patienten, eine Optimierung der therapeutischen Dosis sowie die Diagnose von Therapieversagern (Wagner et al. 1988).

Mit dieser Methode werden sowohl Phasen mit überwiegend basaler Säuresekretion (z.B. nachts oder zwischen den Mahlzeiten) als auch Phasen mit stimulierter Säuresekretion (postprandial) erfaßt. Darüber hinaus besitzt sie eine sehr gute intraindividuelle Reproduzierbarkeit mit geringen Variationen von Tag zu Tag (Merki et al. 1988). Ulcus duodeni-Patienten weisen eine signifikant höhere Magenazidität auf als gesunde Kontrollpersonen (Merki et al. 1988; Savarino et al. 1988; Wagner et al. 1991). Da bei dieser Probandengruppe eine große intraindividuelle Schwankung bestand, können lediglich deskriptive Aussagen anhand eines bestimmten pH-Musters geäußert, jedoch keine diagnostischen Schlüsse gezogen werden. Aussagen über antisekretorisches Verhalten während des Tages und der Nacht, prä- und postprandiale Veränderungen und Vergleiche zwischen pH-Metrie-Mustern einer Placebo-Gruppe und einer Gruppe, die mit einem antisekretorischen Medikament behandelt wurde, können aber sehr wohl getroffen werden.

#### 4.1.2. Auswahl der intragastralen pH-Elektroden

Verschiedene Typen von Elektroden stehen heute zur Verfügung. Die kombinierte Glaselektrode und die unipolare, monokristalline Antimonelektrode haben bis jetzt breite Anwendung gefunden. Die Antimonelektroden eignen sich am besten für die Refluxdiagnostik, da sie im basischen Milieu eine gute Meßgenauigkeit aufweisen. Die Meßeigenschaften der Antimonsonde haben den Nachteil, daß sich ein höherer Drift und eine längere Ansprechzeit im sauren Milieu abzeichnen (Bauerfeind 1985; Emde et al. 1987; Mc Laughlan et al. 1987; Wagner 1991; Wagner et al. 1991).

Der intraindividuelle Drift zwischen den Glas- und den Antimonsonden ergab bei einer Studie von (Angerer et al. 1990) keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Autoren schlossen daraus, daß nach einer adäquaten Kalibrierung klinisch irrelevant ist, ob man Antimon- oder Glaselektroden verwendet. Der Vorteil der Glaselektrode ist aber, daß die Meßelektrode und die Referenzelektrode in einer Sonde enthalten sind und keine zusätzliche externe Referenzelektrode an der Haut angebracht werden muß. Die Studien von Cilluffo et al. (1991) und Mc Laughlan et al. (1989) dokumentieren die unterschiedliche Azidität im Antrum, Fundus und Korpusbereich und weisen auf die Notwendigkeit einer standardisierten Lokalisation der Elektrode hin. Die beste Reproduzierbarkeit in der Magen-pH-Metrie wurde im oberen Korpus gefunden; deshalb sollte die Elektrode 5 bis maximal 10 cm distal vom unteren Ösophagussphinkter plaziert werden.

#### 4.1.3. Darstellung der verwendeten intragastralen Elektrode zur Messung des intragastralen pH-Wertes

Für die Messung der intragastralen pH-Werte in der vorliegenden Studie wurde eine kombinierte Elektrode (Lot 440-Ingold Messtechnik, Urdorf, Switzerland) benutzt, deren Probenspitze eine sehr kleine, pH-sensitive Glaselektrode besitzt. Der an den Glaskörper anschließende Plastikschlauch ist mit der Elektrolytlösung der Bezugselektrode gefüllt. Als Elektrolyt dient die Frisolyt-Lösung, die einen sehr niedrigen Wasserdampfpartialdruck aufweist. Die eigentliche Referenzelektrode, ein Silber / Silberchloriddraht, beginnt ca. 3 cm hinter dem Diaphragma. Es wurde darauf

geachtet, daß im Raum zwischen dem Diaphragma und der Referenzelektrode keine Luftblasen vorhanden waren, da diese eine Unterbrechung im Elektrodensystem bewirken können. Um die Elektrode vor dem Austrocknen zu schützen wurde sie in einem mit Frisolyt gefüllten Schutzgefäß aufbewahrt.

#### 4.1.4. Kalibrierung der intragastralen pH-Elektroden

Vor Benutzung der Elektrode wurde diese aus dem Schutzgefäß genommen und die Magensonde gründlich mit destilliertem Wasser abgespült. Die Sonde wurde nie trockengerieben. Anschließend wurde die Elektrode in die Pufferlösung (Synectics Medical®, Nr.5001) mit einem pH-Wert von 7,01 getaucht. Über das Digitrappergerät wurden nach ca. zehn Minuten Stabilisierungszeit die pH-Werte für jede einzelne Elektrode abgelesen und dokumentiert. Anschließend wurde die Sonde mit destilliertem Wasser abgespült und dann in die Pufferlösung (Nr. 5002 Pufferlösung, Synectics Medical®) mit dem pH-Wert von 1,07 eingetaucht. Nach erfolgter Stabilisierung wurde auch dieser Wert registriert und über das Digitrappergerät wurde die Spreizung der Werte geeicht. Auf dem tragbaren Festspeicher (Digitrapper MK III, Synectics Medical AB, OS Version 2.30, Hardware 3.00, Messspanne: 0-9 pH, 9 V Alkalibatterie Größe: 120x65x25 mm, Gewicht: 300 g) ist ein Korrekturfaktor programmiert, der bei der Kalibrierung den Unterschied zwischen der Sondenmessung von Körpertemperatur und Raumtemperatur ausgleicht. Die kombinierte Glaselektrode (Lot 440 Ingold) zeigt 0-Werte (0 mV) im Bereich von pH 6,5. Nach erfolgreicher Kalibrierung wurde die intragastrale Sonde dem Probanden eingeführt. Wie im Versuchsablauf beschrieben, wurden die Sonden am Übergang Korpus/Fundusbereich ca. 5 cm distal der Kardia positioniert, um eine optimale Registrierung der pH-Werte zu gewährleisten. Nach jedem Gebrauch wurden die Sonden in ihrer ganzen Länge für 30–60 min in eine wässrige Desinfektionslösung (Cidex®) eingelegt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Es wurde darauf geachtet, daß es beim Abreiben der Elektrode oder des Plastikschauches nicht zu einer Zugbelastung auf die Verbindungsstelle Glas/Plastikschauch kommt. Dies hätte zu einer Rißbildung und somit zur irreparablen Zerstörung der Elektrode führen können. Nach Abschluß der pH-

Metriemessungen wurde die Sonde zur Überprüfung des Drifts nochmals in die Pufferlösungen pH 1,07 und pH 7,02 eingetaucht und die Kalibrierungswerte wurden dokumentiert.

#### 4.1.5. Verwendete Speichergeräte zur Registrierung der intragastral gemessenen pH-Werte

Die oben genannte Meßelektrode wurde über ein Kabel und einen entsprechenden Konnektionsstecker an das Datenspeichergerät (Digitrapper MK III, Synectics Medical AB, OS Version 2.30, Hardware 3.00, 9 V Alkalibatterien, Größe: 120x65x25 mm, Gewicht: 300 g) angeschlossen und mit speziell dafür angefertigten Tragetaschen am Körper des Probanden befestigt. Der tragbare Digitrapper wurde mit wiederaufladbaren Nickel-Kadmium-Akkumulatoren bestückt. Gestartet wurde der Festspeicher durch Betätigung der „Enter“-Taste, wobei – wie oben beschrieben – eine vorherige Kalibrierung und korrekte Positionierung der Sonde gewährleistet sein musste. Nach Abschluß der pH-Metrie wurde das Digitrappergerät durch das gleichzeitige Drücken der „Enter“- und der „Escape“-Taste beendet. Durch ein Konnektionskabel konnten die gespeicherten Daten über einen Programmbefehl nun auf den PC transportiert und mit einem eigens dafür entwickelten statistischen Programm (statphacprogram 2.30) ausgewertet werden, so daß eine graphische Darstellung des pH-Medianprofils möglich war (pH-Werte alle 4sec, Medianberechnung nach 10 min.-Intervall).

#### 4.1.6. Mögliche Fehlerquellen bei der pH-Metrie

Fehlerquellen können auftreten, wenn während der 24-stündigen Registrierung versehentlich die Knöpfe der Digitrappergeräte betätigt werden. Fehlermöglichkeiten können ebenfalls auftreten, wenn die verwendete Sonde während des Meßtages einen starken Drift aufweist oder wenn sich das Verbindungskabel bei Bewegungen des Probanden löst. Artefakte in der pH-Metrie, die durch Diskonnektion des Kabels zum Festspeichergerät entstehen, können in der dargestellten Graphik erkannt werden. Ist das Ausmaß der Artefakte so groß, daß sie das Meßergebnis signifikant

beeinflussen, müssen die pH-Messungen gegebenenfalls wiederholt werden. Fehler können auch auftreten, falls es zu einer Dislokation der Sonde durch ein versehentliches Ziehen an ihr kommt und die Position der Elektrode z.B. nicht mehr am Fundus / Kardial - Übergang zu finden ist, sondern im Ösophagus. In einem solchen Fall wird die Sonde neu positioniert oder – falls notwendig – die pH-Metrie an einem neuen Studientermin wiederholt.

## **4.2. Nachweismethoden von *Helicobacter pylori***

### **4.2.1. Serum-Antikörper-Test**

#### **4.2.1.1. Testprinzip des Serumantikörper-Tests**

Der Pylori-EIA-G-Test von Orion Diagnostica (Espoo, Finland) ist ein Enzymimmunoassay, der auf der Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern im Serum gegen *H.pylori* beruht. Serumproben werden in Mikrotiter-Plattenvertiefungen gegeben, die mit spezifischen *H.pylori*-Antigenen beschichtet sind. Wenn Anti-*H.pylori*-IgG in der Probe vorliegt, reagiert es mit den an die Matrix gebundenen Antigenen. Ungebundenes Serum wird durch Waschen entfernt und mit alkalischer Phosphatase markiertes Antihuman-IgG hinzugefügt. Das Enzymkonjugat bindet an den Antigen-Antikörper-Komplex ungebundenes Konjugat. Es wird dann durch Waschen entfernt, und Substrat wird hinzugefügt. Nach Stoppen der Substratreaktion wird der Test photometrisch ausgewertet. Die Intensität der Farbe verhält sich proportional zur Konzentration (oder dem Titer) der spezifischen IgG-Antikörper gegen *H.pylori*. Zu den Reagenzien gehören ein Serumverdünnungspuffer (200 ml), ein Waschpuffer (200 ml), alkalische Phosphatase konjugiertes Antihuman-IgG vom Schwein (15 ml), Referenzserum 1–4 (je 1 ml), ein Substratpuffer (4x6 ml), Substratabletten (Paranitrophenylphosphat à 4 ml), eine Stopplösung (1 molare NaOH à 20 ml). In der Studie wurden Pipetten mit folgenden Größen 10 µl, 100 µl, und 1–2 ml verwandt. Das Substratreagens wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen. Für die Probenverdünnung wurden Polypropylenröhrchen benutzt. Die Reagenzien wurden vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur eingestellt werden. Die Mikrotiterplatte wurde

in 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen eingeteilt und es war möglich, 4 unabhängige Testserien mit den Reagenzien durchzuführen. Eine Substrattablette wurde 15–30 min vor Gebrauch in einem Fläschchen mit Substratpuffer gelöst und die Lösung vor Verwendung vorsichtig gemischt. Zur quantitativen Testung wurden alle vier Referenzseren mit den entsprechenden Titern zur Erstellung der Standardkurve eingesetzt. Der Absorptionswert von Referenzserum 2 dient als Cut-off-Wert (1:500).

#### 4.2.1.2. Testdurchführung

##### *- Serumvorverdünnung*

Die Serumproben wurden vor dem Verdünnen gut gemischt. Das Probandenserum wurde in einem Verhältnis von 1:201 mit Serumverdünnungspuffer (10 µl Serum + 2 ml Puffer) verdünnt und anschließend gut gemischt.

##### *- Inkubation der Patientenproben*

Je 100 µl von jedem Referenzserum wurden unverdünnt in zwei Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert (Referenzserum 1 in A1 und B1 usw). Anschließend wurden jeweils 100 µl der vorverdünnten Patientenseren in die weiteren Vertiefungen pipettiert. Die Streifen wurden mit Folie abgedeckt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich wurde die Folie wieder entfernt, das Serum absaugt und die Vertiefungen mit 3x200 µl Waschpuffer gewaschen. Die Vertiefungen wurden anschließend durch Ausklopfen der Streifen auf Filterpapier getrocknet.

##### *- Inkubation des Konjugats*

100 µl Konjugat wurde nun in jede Vertiefung pipettiert und die Streifen mit Folie abdeckt und danach 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubationszeit wurde die Folie erneut entfernt, das Konjugat absaugt und die Vertiefungen mit 2x200 µl Waschpuffer und 2 x mit 200 µl destilliertem Wasser gewaschen. Die Vertiefungen wurden durch Ausklopfen der Streifen auf Filterpapier getrocknet.

*-Inkubation des Substrats*

100 µl frisch hergestellte Substratlösung wurde in jede Vertiefung pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt 100 µl Stopplösung hinzugefügt.

*- Ablesen der Absorption*

Das Photometer wurde mit Luft (ohne Platte) „geblankt“ und anschließend wurden die Absorption jeder Vertiefung bei 405 nm gemessen.

*- Berechnung*

Der für die Doppelbestimmungen der Referenzseren notwendige Mittelwert wurde zunächst errechnet und die Standardkurve auf halblogarithmischem Millimeterpapier erstellt. Hierbei wurden die Titer der Referenzseren auf der x-Achse und die Absorptionswerte der Referenzseren auf der y-Achse eingetragen. Die Titer der Patientenseren konnten anhand dieser Standardkurve abgelesen werden.

*- Qualitätskontrolle*

Das einwandfreie Funktionieren des Tests konnte mit den Referenzseren 1 und 4 überprüft werden. Diese Kontrollen wurden bei jeder Testserie durchgeführt. Der Absorptionswert des Referenzserums 1 sollte unter 0,25 sein, der des Referenzserums 4 über 1,0 liegen.

*- Beurteilung der Ergebnisse*

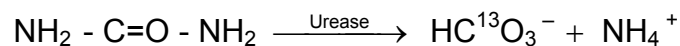
Ein Titer < 1:500 wurde als H.pylori-negativ gewertet; ein Titer > oder = 1:500 wird als H.pylori-positiv gewertet. Lag ein Absorptionswert eines Patientenserums oberhalb des höchsten Referenzserums, so konnte der Titer nicht anhand der Standardkurve abgelesen werden. In diesem Fall wird der Test mit einer Serumverdünnung im Verhältnis 1:400 wiederholt und das abgelesene Testergebnis mit 2 multipliziert. Eine eingeschränkte Beurteilbarkeit liegt bei hämolytischen, lipämischen oder ikterischen Seren vor.

#### 4.2.2. C<sup>13</sup>-Harnstoffatemtest

##### 4.2.2.1. Darstellung der Methode des C<sup>13</sup>-Harnstoffatemtests

Der in dieser Studie verwendete C<sup>13</sup>-Harnstoffatemtest wurde von Graham et al. (1987) als nichtinvasive Nachweismethode zuerst beschrieben und konzeptionell ausgearbeitet. Das Prinzip des C<sup>13</sup>-Harnstoffatemtests beruht auf der potenten

Urease-Enzymaktivität von *H.pylori*. Mit Ausnahme des Tuberkelbakteriums, das keine Ureaseaktivität hat, sind Magen-Darm-Bakterien im sauren Milieu des Magens nicht überlebensfähig. Auch geringe Mengen an Urease anderer im Magen vorkommender Bakterien werden durch die Magensäure denaturiert und haben daher keinen Einfluß auf den  $C^{13}$ -Harnstoffatemtest (Moblely et al. 1988). Somit bedeutet eine hohe Enzymaktivität von Urease im Magen die Anwesenheit von *H.pylori*. Dieser sehr wichtige Aspekt wurde von der Gruppe um Tygat, Langenberg und Schnipper (1984) eingehend untersucht. Eine Studie von Marshall und Langton (1986) zeigte den signifikanten Unterschied von Ureaseaktivität bei *H.pylori*-infizierten und nichtinfizierten Individuen. Die quantitative Ureaseaktivität wird über den indirekten Nachweis der  $CO_2$ -Konzentration, als Spaltprodukt des im Test angewandten Harnstoffs, gemessen. Durch die Urease wird Harnstoff in Bikarbonat und Ammoniak gespalten:



Das durch die Urease gespaltene Endprodukt (Bikarbonat =  $HC^{13}O_3^-$ ) wird nach Hydrolyse als  $C^{13}O_2$ -Gas in das Blutgefäßsystem aufgenommen, zum Lungenkreislauf transportiert und tritt dann über die ausgeatmete Luft in Erscheinung. In unserer Studie wurde der Harnstoffatemtest mit 100 mg  $C^{13}$ -markierter Harnstoff verwendet und als Testsubstrat oral verabreicht. Das Verhältnis von  $C^{13}/C^{12}$  in der Atemluft eines jeden Menschen variiert in Abhängigkeit von seinen Mahlzeiten und seiner körperlichen Aktivität (Schoeller et al. 1977), so daß in unserer Studie die Probanden nüchtern zum Atemtest zu erscheinen hatten. In der Atemluft kommen auf eine Million Moleküle  $C^{12}O_2$  ca. 11.238 Moleküle von  $C^{13}O_2$ . Der Basiswert des Vorkommens von  $C^{13}$  kann mit einer Genauigkeit von 3 auf 1 Mio., d.h. mit Abweichungen von 0,003 Prozent, über die Gas-Isotopen-Massen-Spektrometrie gemessen werden. Diese Ergebnisse wurden auch durch die Studie von Rathbone und Haety im Jahre 1992 bestätigt. In der Studie wurde das Vorkommen des  $C^{13}$  in einer Relation zum  $C^{12}$  in ‰ gemessen. Diese Meßart wurde aufgrund des natürlichen Vorkommens der beiden Isotope  $C^{13}/C^{12}$  ermittelt.



In unserer Studie wurde dieses Meßverfahren angewandt, um nach Dokumentation von zwei Basis-Werten von  $C^{13}/C^{12}$  den Anstieg dieses Verhältnisses (delta over baseline in ‰) nach Gabe der markierten Harnstoffprobe zu ermitteln.

Eine Studie von Braden et al. (1994) zeigte, daß der Harnstoffatemtest bei Meßwerten nach 20 min vom Zeitpunkt der Harnstoffgabe eine Spezifität von 100 Prozent und eine Sensitivität von 99 Prozent bei einem Cut-off-Wert von 5‰ („delta over baseline“) aufweist. In der hier dargestellten Arbeit wurden die Meßwerte nach Messung des Basiswertes (Zeitpunkt: 0 min) zweimal im Abstand von 20 min und 40 min ermittelt. Bei der Durchführung dieses Verfahrens stehen die Strohhalm-Methode oder die Atembeutelmethode zu Verfügung. In der hier dargestellten Disertation wurde die Strohhalm-Methode angewandt.

Eine 1994 durchgeführte Studie von Braden et al, in der die vereinfachte Strohhalm-Methode mit der Atembeutel-Methode verglichen wurde, zeigte keine signifikanten Unterschiede in ihren Testergebnissen ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,0001$ ).

Die  $C^{13}O_2$  Messung wurde in dieser Arbeit mit einer Isotopen-Massen-Spektrometrie („BA-238“) durchgeführt. Das analytische Meßverfahren wurde mit dem  $CO_2$ -Isotopen-GC-MS-Meßgerät (VG-IT Optima Microgas, Isotech VG, Fisons Instruments Nordic AB, Solna, Schweden) vorgenommen. Das Gerät wurde täglich über standardisierte Röhrchen mit bekanntem Delta-Wert geeicht, und bei jedem Untersuchungsdurchgang wurden die Standardwerte mit den neu gemessenen Werten ermittelt und für die Berechnung der Genauigkeit und Wiederholbarkeit der Methode herangezogen. Wie vielen anderen Studien lag der Grenzwert für einen positiven H.pylori-Status in dieser Studie bei 5‰ .

#### 4.2.2.2. Durchführung des $C^{13}$ -Harnstoffatemtests

Die Probanden wurden angehalten, morgens nüchtern zum Atemtest zu erscheinen. Das Zubehör des Harnstoffatemtests besteht aus sechs leeren Glasröhrchen, die mit einem Gummistreifen luftdicht verschließbar sind, sowie einem Röhrchen mit 4 g Zitronensäure, einem Röhrchen mit 100 mg  $C^{13}$ -markiertem Harnstoff, einem Strohhalm, einem Formblatt für die Probenentnahmen und Aufklebern für die Beschriftung. Zunächst wurden in der Vorbereitung die Aufkleber mit dem Studien-

Code, den Probandennummern, dem Datum der Probenentnahme und den Nummern der Untersuchung gekennzeichnet und auf die entsprechenden Röhrchen geklebt. Anschließend wurde die Zitronensäure in 200 ml Leitungswasser aufgelöst und jedem Probanden 3/4 (150 ml) der Lösung zu trinken gegeben. Zur Ermittlung der Basiswerte wurden die Probanden nach einer Wartezeit von 5 min aufgefordert, in die beiden Teströhrchen, die mit „Baseline 1 und 2“ gekennzeichnet waren, auszuatmen. Der Strohhalm wurde bis tief zum Boden des Glasröhrchens eingeführt, wobei darauf zu achten war, daß ein gleichmäßiger Flow von ca. 10 sec der Ausatemluft des Probanden aufgefangen wurde, bis am Glasrand des Röhrchens ein Niederschlag der Atemluft zu erkennen war. Während der letzten Sekunden wurde der Strohhalm langsam aus dem Teströhrchen herausgezogen. Danach war ein sorgfältiges und umgehendes Verschließen der Röhrchen mit dem Gummiverschluß wichtig.

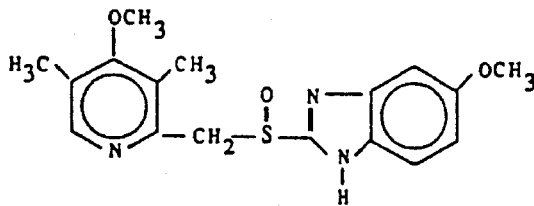
Der markierte Harnstoff wurde nun den verbliebenen 50 ml der Zitronensäurelösung hinzugefügt und dem Probanden zu trinken gegeben. Nach 20 min wurden die Probanden aufgefordert, in die nächsten zwei Röhrchen, die mit einer entsprechenden Kennzeichnung (20 min, Röhrchen Nr. 3 und Nr. 4) versehen waren, auszuatmen. Nach weiteren 20 min wurde die letzte Atemprobe in die dafür vorgesehenen Röhrchen mit der Kennzeichnung (40 min, Röhrchen Nr. 5 und Nr. 6) abgegeben. Die Atemproben wurden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend in einer lichtgeschützten Verpackung gelagert. Die ausgefüllten Testprotokolle mit den sechs Teströhrchen wurden zur Auswertung an das biochemische Labor der Firma Astra Hässle (Bioanalytical Chemistry von Astra Hässle AB, Mölndal, Sweden) geschickt. Alle Testergebnisse, also der Basis-Wert, der 20 min-Wert und der 40 min-Wert, wurden – wie oben beschrieben – zur Kontrolle jeweils zweimal abgenommen und dokumentiert und zur Bestimmung verschickt. Die häufigsten Fehlerquellen fanden sich bei der Durchführung des Testes. Das heißt, es war unbedingt notwendig, die einzelnen Testsubstanzen vollständig aufzulösen, sie dem Probanden in einem richtigen Zeitverhältnis zuzuführen und die Atemproben zur exakten Zeit abzunehmen.

### 4.3. Verwendete Medikamente und deren Nachweismethode

#### 4.3.1. Omeprazol

##### 4.3.1.1. Chemische Struktur und Wirkung des Omeprazol

Abbildung 4.1.: Strukturformel des Omeprazol



Nach Andersson und Regardh (1990)

Omeprazol, mit einem Molekulargewicht von 345, ist chemisch gesehen im neutralen Milieu eine inaktive Form („prodrug“) und wird im sauren Milieu hydrolysiert (Wallmark et al. 1990). Das Omeprazol-Sulfonamid stellt die pharmakologisch aktive Form dar (Lindberg et al. 1986). Über eine Disulfidbrücke bindet sich Omeprazol irreversibel an die H/K-ATP-ase. Omeprazol ist durch den substituierten Pyrimidinring eine schwache Base und akkumuliert im sauren Milieu in den sekretorischen Tubulovesikeln der Parietalzelle. Es ist sehr lipophil und penetriert somit sehr leicht durch die Membranen der intestinalen Zellen und weist nur eine geringe Wasserlöslichkeit auf (Brandström et al. 1985). Omeprazol ist säurelabil und kann durch einen Bikarbonatpuffer vor der Ionisierung und somit vor einem beginnenden Metabolismus geschützt werden. Diese Erkenntnis schlug sich in der Entwicklung einer magensaftresistenten Kapsel mit „pellets“ für den klinischen Gebrauch nieder. Omeprazol stellt das erste Medikament der Substanzgruppe der Protonenpumpenblocker dar. Es wird zur Behandlung von Magen- und Duodenalulkuskrankheiten, Refluxösophagitis und beim Zollinger-Ellison-Syndrom eingesetzt. Die pharmakologische Blockierung (irreversible Bindung) der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP-ase durch das substituierte Benzimidazol ermöglicht eine Säuresuppression, die unabhängig vom stimulierten Rezeptorsystem ist (vgl. Fellenius et al. 1981). Die Wasserstoff / Kalium-ATP-ase wirkt als Enzym an der gemeinsamen Endstrecke der Säureproduktion in der Parietalzelle des Magens.

Bei einer oralen Applikation von 20 mg Omeprazol täglich zeigt sich in der Studie von Howden et al von 1984 eine rasche und effektive Säuresuppression mit einem Maximum am vierten Behandlungstag. Bei der Behandlung von Ulcus duodeni-Patienten mit 20 mg Omeprazol erwies sich eine Reduzierung der 24-stündigen intragastralen Azidität um 80 Prozent während der Behandlung aufrechterhalten werden (Sharma et al. 1984).

#### 4.3.1.2. Absorption und Verteilungsvolumen des Omeprazol

Die Absorption des Omeprazol findet im Dünndarm statt und ist innerhalb von ca. drei bis sechs Stunden vollständig abgeschlossen. Die Bioverfügbarkeit der magensäureresistenten Kapseln liegt bei einer einmaligen Dosierung von 40 mg Omeprazol bei 35 Prozent und bei einer zweifachen Dosierung bei 65 Prozent (Pilbrand und Cederberg 1985). Die Proteinbindung des Omeprazol liegt bei 95 Prozent (Regardh et al. 1988). Omeprazol ist bei Tieren plazentagängig und hat ein Verteilungsvolumen von 0,31 l/kg (ebenda). Bei der einmaligen Gabe von Omeprazol zeigt sich eine rasche Hemmung pentagastrinstimulierte Säuresekretion, die sich dosisabhängig verhält. Eine vollständige Inhibition wird bei einer intravenösen Gabe von 80 mg täglich erreicht (Lind et al. 1986). Dosierungen höher als 40 mg Omeprazol zeigen einen überproportionalen Anstieg der Plasmakonzentration im Serum (Londong et al. 1983; Regardh et al. 1988; Sharma et al. 1984). Der antisekretorische Effekt des Omeprazol verhält sich proportional der Serumkonzentrations-Zeitkurve (AUC), doch zeigt sich weder eine Proportionalität zur maximalen Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ) noch zur Höhe der Verordnungsdosis. Wenn  $C_{max}$  und AUC nach dem fünften Einnahmetag gemessen werden, erhöhen sich die Meßwerte bei zweifacher Dosierung wie nachfolgend angegeben (Andersson, T., Cederberg et al. 1991): 21% bei 10 mg, 69% bei 20 mg und 182% bei 40 mg. Eine Studie von Londong et al. 1983 zeigt bei einer Behandlung von 30 mg, 60 mg und 90 mg Omeprazol eine dosisabhängige Säureinhibition von 42%, 80% und 92%. Die Studien von Howden et al. (1984) und Müller et al. (1983, 1984) zeigen eine kontinuierlich zunehmende Hemmung der Säuresekretion nach dem ersten Einnahmetag, wobei nach ca. vier bis fünf Tagen ein „steady stay“ erreicht

wird. Die Absorption wird durch Einnahme von Nahrungsmitteln verzögert, wobei sich im antaziden Milieu keine Veränderung der Absorption des Omeprazol zeigt (Andersson/Andren et al. 1990; Andersson und Regardh 1990; Howden et al. 1984; 1984; Pilbrand und Cederberg 1985; Tuynman et al. 1987).

#### 4.3.1.3. Metabolismus und Elimination des Omeprazol

Die Plasmahalbwertszeit der Plasmakonzentrations-Zeitkurve liegt bei 40 min (Regardh et al. 1990). Der Metabolismus nimmt mit dem Alter ab (Regardh et al. 1986). Omeprazol wird hauptsächlich in der Leber metabolisiert. Sechs Metabolite wurden im Urin isoliert, wobei das Omeprazol-Sulfon, -Sulfid und -Hydroxyd die drei wichtigsten Metabolite darstellen. Bis auf das Omeprazolsulfid weisen die meisten Metabolite pharmakologisch keine Wirkung mehr auf (Renberg et al. 1989). Omeprazol zeigt eine Einschränkung der totalen Plasma-Clearance bei Lebererkrankungen (Andersson und Regardh 1990), wobei keine Einschränkung der renalen Elimination bei Nierenerkrankungen festzustellen ist (Naesdal et al. 1987, Howden et al. 1984 und Roggo et al. 1990).

#### 4.3.1.4. Verträglichkeit und Nebenwirkungen des Omeprazol

Omeprazol ist im allgemeinen sehr gut verträglich. Die im Anschluß dargestellten „Nebenwirkungen“ in der untersuchten Studie wurden von zahlreichen zuvor durchgeführten Studien bereits dokumentiert, und in den meisten Fällen konnte keine eindeutige Beziehung zwischen den Nebenwirkungen und der Einnahme von Omeprazol vermerkt werden. Die Inzidenz der Nebenwirkung liegt zwischen 2,5 – 5 Prozent.

Tabelle 4.1.: Nebenwirkung des Omeprazol (Brodgan et al. 1979)

Haut	selten auftretender flüchtiger Hautausschlag mit Juckreiz und Quaddelbildung
Zentrales und peripheres Nervensystem	Kopfschmerzen; seltener: Schwindel, Parästhesien, Somnolenz, Schlaflosigkeit, Gleichgewichtsstörungen
Gastrointestinaltrakt	Diarrhoe, Verstopfung, abdominale Schmerzen (Dyspepsie), Übelkeit/Erbrechen und Flatulenz
Leber	Isolierte Fälle von erhöhten Leberwerten mit und ohne Bilirubinerhöhung
Endokrinologie	Isolierte Fälle von Gynäkomastie
Hämatologie	Isolierte Fälle von Leukopenie und Thrombozytopenie

Bei an Ratten durchgeführten toxikologischen Studien wurden nach zweijähriger, hochdosierter Behandlung Karzinoide in der Magenmukosa gefunden, die von ECL-Zellen abstammen (Havu et al. 1986). Die Ursache liegt sehr wahrscheinlich in einer Hypergastrinämie, die als Folge der langandauernden, vollständigen Säurehemmung auftritt. Gastrin übt einen trophischen Effekt auf die ECL-Zellen des Magens aus (Larsson et al. 1986). Auch unter hochdosierter Dauertherapie mit Ranitidin konnte bei Ratten eine Hypergastrinämie sowie eine ECL-Zellhyperplasie induziert werden (Wallmark et al. 1990). Beim Menschen wurden bisher weder ähnlich stark erhöhte Gastrinspiegel noch eine deutliche Zunahme der ECL-Zelldichte oder das Auftreten von Karzinoiden unter mehrere Jahre andauernder Therapie mit 40–60 mg Omeprazol/Tag gefunden (Creutzfeld 1988).

#### 4.3.1.5. Interferenzen des Omeprazol

Omeprazol interferiert mit Enzymen im Cytochrom-P-450-System der Leber (Andersson et al. 1991) und hemmt den Metabolismus verschiedener Medikamente wie z.B. R-Isomer des Warfarin, Diazepam und Phenytoin (Andersson et al. 1990; Gugler und Jensen 1987; Prichard et al. 1987) und Propanolol (Henry et al. 1987). Die Fähigkeit des Omeprazol, mit anderen Medikamenten zu interferieren, ist jedoch begrenzt und hat für die klinische Anwendung nur geringe Relevanz (Andersson et

al. 1991). Keine Interferenzen des Omeprazol mit einer Dosierung von 20 mg/Tag zeigten sich mit Metoprolol, Theophyllin, Lidocain, Quinidine und Amoxicillin (Paulsen et al. 1989). Es kann davon ausgegangen werden, daß andere Medikamente, die über das Cytochrom-P-450-System metabolisiert werden, eine Interferenz aufweisen (Mc Tavish et al. 1991).

#### 4.3.1.6. Dosierung und Indikation

Die internationale Empfehlung in Bezug auf die Dosierung von Omeprazol bei Magen- und Duodenalulzera liegt bei 20 mg einmal täglich für die Dauer von zwei bis vier Wochen, bei Rezidiven bei 40 mg einmal täglich über vier bis acht Wochen (Mc Tavish et al. 1991). Bei Refluxösophagitis wird die gleiche Dosierung empfohlen, wie oben angegeben (Mc Tavish et al. 1991). Zur Langzeitbehandlung einer ausgeprägten Refluxösophagitis wird die Dosis mit 40 mg einmal täglich angegeben. Patienten mit einem Zollinger-Ellison-Syndrom werden nach internationaler Empfehlung mit 60 mg Omeprazol als Initialdosis behandelt, um die Säuresekretion auf einen Wert unter 10 mmol/h zu reduzieren. Bei einer H.pylori-assoziierten Ulkuserkrankung wurde nach Bayerdörffer et al. 1992 zur Eradikation des H.pylori die „Dualtherapie“ von 40 mg zweimal täglich in Kombination mit einem Antibiotikum (z.B. 1,5–3 g Amoxicillin/Tag) für zwei Wochen empfohlen. Bei der Tripletherapie wird Omeprazol zwei mal täglich 20–40 mg in Kombination mit Amoxicillin (zwei mal täglich 500 mg bis 1000 mg), Clarithromycin (zwei mal täglich 250 mg bis 500 mg) oder Metronidazol (zwei mal täglich 500 mg) in einer Dosierung von Amoxicillin verabreicht, vergl. die Studien von Delchier 1996 und Chu-KM 1998.

#### 4.3.1.7. Omeprazol und Helicobacter pylori

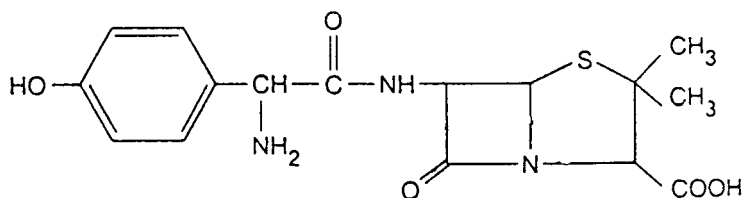
Omeprazol hat bei neutralem pH-Wert eine bakteriostatische Aktivität gegen H.pylori bei Invitro-Versuchen mit MIC-50-Werten von 8–32 mg/ml (Daw et al. 1991). Obwohl die klinische Relevanz dieses Ergebnisses noch ungewiß ist, hat Omeprazol bei der Behandlung von Ulkuserkrankheit das Potential für zwei Ansatzpunkte: Beeinflussung der Hyperazidität und die bakterizide Wirkung auf H.pylori. Die Priorität des H.pylori-Keimes bei der Kolonisation liegt in der Antrumschleimhaut des

Magens, wobei es unter einer Behandlung mit Omeprazol zu einer Reduzierung der Besiedlungsdichte des Keimes kommt. Omeprazol supprimiert den Keim. Nach einer Behandlungspause von einem Monat findet eine Rekolonisation durch den H.pylori statt (Daw et al. 1991; Goodwin et al. 1986).

#### 4.3.2. Amoxicillin

##### 4.3.2.1. Chemische Struktur

Abbildung 4.2.: Strukturformel des Amoxicillins



Nach Krauwinkel 1993

Die Grundstruktur aller Penicilline ist ein aus drei Komponenten zusammengesetzter Nukleus, bestehend aus dem Betalaktam- und dem Thiazolidin-Ring sowie einer Seitenkette. Amoxicillin ist chemisch D(-)- $\alpha$ -amino-p-Hydroxybenzylpenicillin mit der Sumelformel: C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S und dem Molekulargewicht von 419,46. Die Aminogruppe des Amoxicillins ist verantwortlich für das Wirkungsspektrum und die pharmakologischen Eigenschaften der verschiedenen Penicillinderivate. Es ist ein halbsynthetisch hergestelltes Antibiotikum, das – analog zum Ampicillin, das auch ein Aminobenzylpenicillin darstellt – keiner aufwendigen Isolierung aus den Fermentationslösungen der Schimmelpilze bedarf, sondern über eine enzymatische Abspaltung von Phenyllessigsäure aus Penicillin G unter Zuhilfenahme einer bakteriellen Acyltransferase gewonnen wird.

##### 4.3.2.2. Mikrobiologische Wirkung des Amoxicillin

Wie auch die anderen Penicilline wirkt Amoxicillin bakterizid und hemmt die Zellwandsynthese der in Proliferation befindlichen Mikroorganismen. Die Bakterizidie ist abhängig von der Dosis und der Länge der Behandlung. Amoxicillin hemmt die Biosynthese des Mukopolysaccharides (Peptidoglykan). Penicillinase produzierende



Bakterien, wie z.B. Staphylokokken, Pseudomonas und Klebsiellen sowie teilweise auch Enterokokken, zeigen gegen Amoxicillin eine Resistenz.

#### 4.3.2.3. Absorption und Verteilung, Metabolismus und Elimination

Als schwache Säure ist Amoxicillin relativ säurestabil und kann unabhängig von den Mahlzeiten eingenommen werden. Es wird vergleichsweise schnell nach oraler Einnahme resorbiert und diffundiert recht schnell in fast alle Körpergewebearten und flüssigen Kompartimente. Bei Veränderung der Gehirn/Blutsschranke - z.B. im Rahmen eines Infektes (Meningitis), penetriert Amoxicillin intracerebral. Es hat eine Proteinbindungskapazität von 17 Prozent (Brodgan et al. 1974). Bei einer einmaligen Gabe von 500 mg Amoxicillin liegt der Mittelwert der maximalen Serumkonzentration ( $C_{max}$ ) zwischen 5,9 und 10,8  $\mu\text{g/ml}$ ;  $t_{max}$  liegt bei ca. 1–2 h, und der Mittelwert der Urinkonzentration des Amoxicillin liegt nach 6 h zwischen 40 und 70 Prozent (ebenda). Bei einer Dosierung von zweimal 500 mg Amoxicillin lag die AUC im Mittel bei 30,1  $\text{mg} \cdot \text{h/l}$  und die Serumhalbwertszeit bei 1,2 h (Paulsen et al. 1989). Paintaud et al. (1992) fanden keine lineare Beziehung zwischen der Höhe der oralen Amoxicillingaben und der Höhe der Absorption des Amoxicillin. Ein Vergleich der Darreichungsformen bei einer oralen Einnahme von 500 mg Amoxicillin als Kapsel, Suspension und als Tablette ergab signifikant höhere Daten für  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ , AUC und der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  bei der Formulierung als Tablette und Suspension (Cortvriendt et al. 1987, S. 978). Die im Jahre 1994 durchgeführte Studie von Barr und Zola zeigt eine abnehmende Absorptionsquote entlang des Dünndarms (Duodenum, Jejunum, Ileum); das Absorptionsmaximum liegt im Duodenum. Amoxicillin wird überwiegend unverändert im Urin ausgeschieden. Die Ausscheidung im Harn beträgt nach oraler Gabe von Amoxicillin nach ca. sechs Stunden 60–80 Prozent. Eine parenterale Applikation des Amoxicillin besitzt keinen Vorteil im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit (Brodgan et al. 1974).

#### 4.3.2.4. Indikation für die Behandlung mit Amoxicillin

Mit einem erweiterten antibiotischen Spektrum zeigt Amoxicillin eine antibiotische Wirkung auf sowohl grampositive Bakterien – wie nicht penicillase-produzierender *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneum.* und *Streptococcus faecalis* – als auch auf gramnegative Bakterien – wie *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spec.*, *Enterobacter spec.*, *Serratia spec.*, *Helicobacter pylori* (Brodgan et al. 1979). Die Indikation für Amoxicillin besteht bei Infektionen der Lunge und Atemwege, der Harn- und Geschlechtsorgane, des Magen-Darm-Trakts und bei Typhuserkrankung.

#### 4.3.2.5. Kontraindikation und Vorsichtsmaßnahmen bei der Behandlung mit Amoxicillin

Bei bekannter Anamnese von allergischen Reaktionen auf Penicillin ist die Anwendung von Amoxicillin kontraindiziert. Vorsicht ist daher bei Patienten mit allergischer Disposition geboten. Der Möglichkeit einer Superinfektion durch Pilze oder durch andere Bakterien sollte während der antibiotischen Behandlung Rechnung getragen werden. Die häufigsten Superinfektionen treten mit *Enterobacter*, *Pseudomonas* oder *Candida* auf. In einem solchen Falle ist ein Therapieschemawechsel notwendig. Dokumentationen über die Behandlung während der Schwangerschaft liegen bisher in zu geringer Zahl vor, als daß von keinem Nachweis teratogene Schäden oder andere Nebenwirkungen auf den Fötus gesprochen werden kann (Brodgan et al. 1979).

#### 4.3.2.6. Nebenwirkungen von Amoxicillin

Die oben schon erwähnten allergischen Reaktionen treten mit einer Häufigkeit von < 5 Prozent auf, wobei allergische anaphylaktische Reaktionen mit einer Häufigkeit von 0,0015–0,04 Prozent (davon 10 Prozent letal) vorkommen. Diese Reaktionen – z.B. Asthma bronchiale, allergische Rhinitis, Urtikaria – sind besonders bei Patienten festzustellen, die eine Hypersensitivität hinsichtlich verschiedener Allergene aufweisen.

*Tabelle 4.2.. Nebenwirkungen des Amoxicillins nach Simon und Toeller 1974*

Haut	Selten auftretender flüchtiger Hautausschlag mit Juckreiz und Quaddelbildung
Zentrales und peripheres Nervensystem	Kopfschmerzen, seltener Schwindel, Parästhesien, Somnolenz, Schlaflosigkeit, Gleichgewichtsstörungen
Gastroinestinaltrakt	Diarrhoe, Verstopfung, abdominale Schmerzen (Dyspepsie), Übelkeit/Erbrechen und Flatulenz
Leber	Isolierte Fälle von erhöhten Leberwerten mit und ohne Bilirubinerhöhung
Endokrinologie	Isolierte Fälle von Gynäkomastie
Hämotologie	Isolierte Fälle von Leukopenie und Thrombozytopenie

#### 4.3.2.7. Dosierung und Darreichungsform von Amoxicillin

Die orale Dosierung von Amoxicillin ist abhängig von der Erregerempfindlichkeit. Das Spektrum liegt zwischen 1–3 g/Tag für Erwachsene (bei Kleinkindern zwischen 50–100 mg/kg) auf drei bis vier Gaben über den Tag verteilt. Bei schweren Infektionen sind höhere Dosierungen durch intravenöse Applikation möglich, sowie durch intravenöse Injektionen oder Kurzinfusionen (1 g alle 6–8 h) zur Einleitung der Behandlung, bei Erbrechen oder Bewußtlosigkeit (Simon und Toeller 1974).

#### 4.3.2.8. Amoxicillin und Helicobacter pylori

Die In-vitro- und In-vivo-Eradikationsergebnisse, bezogen auf die Sensibilität des Amoxicillin auf den H.pylori-Keim, zeigen äußerst divergente Werte. Dennoch beweisen die In-vitro-Versuche eine bakterizide Wirkung des Amoxicillin auf H.pylori. Etliche Studien haben ergeben, daß die minimale Hemmkonzentration und die minimale bakterizide Konzentration sehr niedrig liegen. Die MIC 50 (mg/l) 0,06 und die MIC 90 (mg/l) 0,12 sowie MBC 50 betragen 0,12, und MBC 90 beträgt 0,25 (vgl. Daw et al. 1991). Klinische Studien haben hingegen bei einer Monotherapie gegen H.pylori eine Eradikationsrate von < 20 Prozent erreicht (Malfertheiner 1994).

#### 4.3.3. Omeprazol und Amoxicillin in Kombination als Therapiekonzept für *Helicobacter pylori*-assoziierte Ulkuserkrankungen

Verschiedene Studien über die kombinierte Anwendung von Amoxicillin und Omeprazol in unterschiedlichen Verabreichungsformen und unterschiedlichen Dosierungen sind seit 1990 publiziert worden. Entsprechend diesen Studien konnten Eradikationsraten zwischen 6 und 90 Prozent erhoben werden (Malfertheiner, 1994). In einer großen kontrollierten, doppelblind-randomisierten und multizentrischen Studie (Unge et al. 1992) wurden 248 an Duodenalulcus erkrankte *H.pylori*-positive Patienten behandelt. Den Patienten wurden randomisiert entweder 40 mg Omeprazol einmal täglich oder 40 mg in Kombination mit 750 mg Amoxicillin zweimal täglich zwei und vier Wochen lang verordnet. Die Eradikationsrate in der Omeprazol/Amoxicillin-Gruppe lag bei 54 Prozent, verglichen mit 4 Prozent in der Gruppe einer Monotherapie mit Omeprazol. Sechs Monate nach der Behandlung waren 70 Prozent der Probanden in der Omeprazol/Amoxicillin-Gruppe weiterhin in Remission, verglichen mit 36 Prozent bei den Patienten, die ausschließlich mit Omeprazol behandelt wurden. Nebenwirkungen zeigten sich in der Omeprazol/Amoxicillin-Gruppe lediglich in geringfügigen Hauteffloreszenzen (Unge et al. 1992). Eine weitere randomisierte und kontrollierte Studie mit einer kleinen Fallzahl konnte wiederum bei einer Dosierung von einer zweimal täglichen Gabe von 40 mg Omeprazol und zweimal 1 g Amoxicillin über einen Zeitraum von zehn Tagen eine Eradikationsrate von 82 Prozent erreichen (Bayerdörffer et al. 1992). Eine weitere Studie von Bayerdörffer et al. (1993) ergab bei einer Behandlung mit dreimal 40 mg Omeprazol und dreimal 750 mg Amoxicillin eine Eradikationsrate von > 90 Prozent.

#### 4.3.4. Omeprazol- und Amoxicillin-Serumbestimmung

##### 4.3.4.1. Omeprazol-Serumbestimmung über das HPLC-Verfahren

Die Analysen zur Bestimmung des Omeprazolspiegels wurden im bioanalytischen Labor der Firma Astra Hässle AB, Mölndal, Schweden, durchgeführt. Die Methode zur Bestimmung des Omeprazol war die „*High Performance Liquid Chromatography*“ (HPLC) – eine hochleistungs-flüssigkeitschromatographische Methode, die seit 1970 bekannt ist. Bis zu diesem Zeitpunkt war eine derartige Leistungsfähigkeit nur in der Gaschromatographie möglich. Mit der Flüssigkeitschromatographie in Säulen dauerten Trennungen nicht selten stundenlang. Obwohl die Dünnschichtchromatographie die benötigte Analysenzeit auf weniger als eine Stunde reduziert, sind ihre unmittelbaren Resultate qualitativer – bestenfalls halbquantitativer – Art. Um jedoch eine quantitative Aussage zu erhalten, ist bereits ein ziemlicher Aufwand nötig; das Problem scheint bis heute aber noch nicht gelöst zu sein. Dagegen liefert ein Hochleistungs-Flüssigkeitschromatogramm (HPLC) unmittelbar eine sowohl qualitative als auch quantitative Aussage. Die Elutionszeit (die Zeit, nach der das Signal auf dem Schreiber erscheint) ist unter den gewählten Bedingungen für jeden Stoff des Gemisches charakteristisch, wobei die Fläche eines jeden Signals proportional zur Menge des entsprechenden Stoffes ist.

Das Prinzip der HPLC ist aus der klassischen Säulenchromatographie oder der Dünnschichtchromatographie bekannt: Als stationäre Phase dient ein relativ polares Material mit hoher spezifischer Oberfläche (meistens Silicagel (Kieselgel)), aber auch Aluminiumoxid oder Magnesiumoxid. Die mobile Phase ist relativ apolar (Heptan bis Tetrahydrofuran). Die Trennung erfolgt durch unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Molekülsorten im Gemisch an der stationären Phase. Ein apolares Lösungsmittel (z.B. Hexan) eluiert langsamer als ein stärker polares (z.B. Chloroform). Das heißt, das Prinzip der HPLC könnte auf eine Faustregel reduziert dargestellt werden: Polare Stoffe werden später eluiert als apolare.

Die in dieser Arbeit angewandte Methode wird als Normalphasen-Flüssigkeitschromatographie bezeichnet. Omeprazol und zwei Standards werden bei einem pH-Wert von 6,5-7 Dichlormethan herausgelöst. Jeweils eine standardisierte Menge an gelöster Flüssigkeit wird auf die HPLC-flüssigkeitschromatographische

Säule aufgetragen, und die jeweiligen chemischen Verbindungen, mit ihren unterschiedlichen Liganden, werden isoliert und über die Normalphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit UV-Bestimmung sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmt. Folgende Apparaturen wurden verwendet: Pumpe: LC-Pumpe, Kontron 420. Injektor: autosampler Kontron 465. Detector: UV-Detektor mit verschiedenen Wellenlängen, Kratos 783. Integrations- System: Spectra-Physics SP 4270, VG Multichrom. Das chromatographische System bestand aus: Säulen, Superspher SI-60, 4 µm (Trennungssäulen, 120x4,0 mm) und Browlee aquapore Si, 7 µm (Haupt-Säulen: 15x3,2 mm) mit einer mobilen Phase mit 1,75 ml einer konzentrierten NH<sub>4</sub>OH, 10,0 ml Methanol und 50,0 ml einer 2-Propanal Lösung werden gemischt und auf 1000 ml mit Dichlormethan verdünnt. Die mobile Phase konnte gegebenenfalls leicht modifiziert werden um eine passende Retentionszeit zu erhalten. Die mobile Phase wird durch die Säule gepumpt bis eine konstante Retentionszeit und ein kontinuierlicher „peak“-Ausschlag erreicht wird. Um eine Flußrate von 1,5 ml/min zu erreichen, wird in der Retentionszeit von 3 min, 4 min, und 5 min für den Standard (H168/66), Omeprazol und deren Standard (H 153/52) vorgegeben. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 302 µm durchgeführt. Die Quantifizierung der zu untersuchenden Röhren erfolgte automatisch über ein integratives System (VG Multichrom). Der Mittelwert der peak-Ausschläge verhält sich für jede Verbindung wie die der internen Standardlösung im Plasmastandard.

Die Wiederfindungsrate der gemessenen Werte lag in der hier vorgestellten Arbeit bei 3.000 nmol/l um 99,9 Prozent, bei 600 nmol/l um 97,7 Prozent und bei 25 nmol/l um 97,0 Prozent. Die minimal meßbare Konzentration lag bei 25 nmol/l. Die Linearität der Serumbestimmungen für Omeprazol lag in unserer Studie in einer Spanne von 25 bis 26.000 nmol/l. Die Abweichung von der Nominalkonzentration lag bei 15 Prozent. Die Reproduzierbarkeit der Daten dieser Methode in der hier dargestellten Studie zeigte sich in den täglich gemessenen interindividuellen Werten der Varianzkoeffizienten, die über tägliche Kontrollwerte des mittleren Bereiches von 100,3 Prozent der Nominalwerte von 95,4–107,7 Prozent berechnet wurden. Der mittlere Varianzkoeffizient der Serumstandards des Omeprazols für 2991, 3040 und 2960 nmol/l betrug 0,9 Prozent mit einer Varianzbreite von 0,3-3,0.

#### 4.3.4.2. Serum-Amoxicillin-Bestimmung über das Agardiffusionsverfahren

Im Labor von AB-Biodisk in Solna (Schweden) wurden die Serumkonzentrationen des Amoxicillin mit Hilfe des Agardiffusionsverfahrens untersucht. Dieses mikrobiologische Verfahren basiert auf einer Standardkurve von im Serum vorhandenem Amoxicillin (Konzentrationen von 0,5–16 µg/ml), die vorweg als Referenzkurve ermittelt und validiert worden war. Die eingefrorenen Serumröhrchen wurden aufgetaut und ihr Inhalt unmittelbar danach analysiert.

##### *Amoxicillin-Standardkurve*

Eine Serie von sechs standardisierten Testscheiben, die mit Amoxicillin-Serumkonzentrationen von 0,5, 1, 2, 4, 8 und 16 µg/ml bestückt worden waren, wurden für die zu berechnende Standardkurve vorbereitet. Eine Agartestplatte („Nunc Screening Plate“ von Nunc, Roskilde, Dänemark) mit einer Größe von 24,5x24,5x2,5 cm und einer Tiefe von 2,5 +/-0,2 mm wurde mit 120 ml eines standardisierten Agarmediums („PDM-Antibiotic Sensitive Medium“ von AB-Biodisk) gefüllt. Der Test-Keim, der bei der Gabe von Amoxicillin gehemmt wird, ist *Sarcina lutea* (ATCC 9341). Eine Suspension der Bakterienkolonien mit 0,85 prozentigem NaCl (entsprechend dem Mc Farland-Standard 0,5) wurde über Nacht angesetzt. Bei einer Verdünnung von 1:5 wurden anschließend 12 ml davon über die standardisierten Testplatten aufgetragen; überflüssige Suspension wurde abgesaugt. Im folgenden wurden die Platten bei 37°C über 20 min inkubiert und zwei Standardserien über die Agarfläche aufgetragen. Entsprechend den aufgetragenen Standardseren wurden Probandenserens dann auf dieselbe Platte appliziert. Ein Zeitraum von 30 min Prädiffusionszeit wurde eingehalten, um anschließend die Testplatte bei 37°C für 18–24 h zu inkubieren.

##### *Verarbeitung des Probandenserums*

Je 10 µl des eingefrorenen Patientenserums wurden auf die Testplatte pipettiert (unter Verwendung von jeweils zwei Testscheiben pro Proband). Dafür wurden „Biohit Proline“-Pipetten (Labassco, Schweden) benutzt, die eine Genauigkeit, bezogen auf 10 µl, von ±1,5 Prozent aufwiesen. Die Testscheiben wurden vor Gebrauch über eine Stunde lang an der Luft getrocknet.

#### *AbleSEN und Analysieren der Resultate*

Nach einer Inkubation der Testplatten über einen Zeitraum von ca. 18–24 h (bei 37°C) wurden am nächsten Morgen die Durchmesser der Hemmhöfe mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,05$  mm mit einem Kaliberrechenschieber gemessen, wobei jeweils einem bestimmten Hemmhofdurchmesser eine bestimmte Amoxicillinkonzentration entsprach. Die Daten der durch die Standard- und Probandenserien verursachten Hemmhofdurchmesser konnten dann über ein Computerprogramm für die Regressionsanalyse eingegeben und berechnet werden. Die untere Grenze der Quantifizierung für Amoxicillin liegt bei 1,19  $\mu\text{mol/l}$  und die obere Grenze bei 38,15  $\text{mol/l}$ .

#### **4.4. Radioimmunologische Gastrinbestimmung im Serum**

Der Test beruht auf der Konkurrenz zwischen radioaktivem Gastrin (Jod 125) und dem in den Patientenserien vorhandenen Gastrin um die Bindung an spezifische Gastrin-Antikörper. Die nach der Inkubationszeit an den Antikörper gebundenen Komponenten werden durch Fällung mit einer Präzipitationslösung (Gemisch aus 2 Antikörpern und Polyethylenglykol) von den freien Komponenten getrennt. Nach dem Zentrifugieren und dem Abgießen oder Absaugen des Überstandes wird die Radioaktivität im Präzipitat gemessen. Es wurde folgende Testpackung verwendet: Gastrin - RIA von Herrmann Biermann GmbH, Bad Nauheim. Der Referenzbereich liegt bei  $< 300$  pg/ml, die Nachweisgrenze bei  $> 4,5$  pg/ml.



#### 4.5. Bestimmung der Laborparameter

Tabelle 4.3.: Klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen des Serums und des Urins

<b>Serumuntersuchung</b>	<b>Methoden</b>
<i>Hämoglobin</i> Referenzbereich:	Impedanzwandel mit Coulter-Elektronik-STKS;automatische Zählung (Cyanhämoglobin-Methode) 14,0–18,0 g/dl
<i>Leukozyten</i> Referenzbereich:	Impedanzwandel mit Coulter-Elektronik-STKS;automatische Zählung 4,0–10,0 /nl
<i>Thrombozyten</i> Referenzbereich:	Impedanzwandel mit Coulter-Elektronik-STKS;automatische Zählung 140–440 /nl
<i>GOT</i> Referenzbereich:	Optische Standardmethode bei 25°C DGKCH < 18 U/l
<i>GPT</i> Referenzbereich:	Optische Standardmethode bei 25°C DGKCH 5–22 U/l
<i>Alkalische Phosphatase</i> Referenzbereich:	Enzymatische Methode, nach optischer Standardmethode bei 25°C DGKCH 60–200 U/l
<i>Bilirubin gesamt</i> Referenzbereich:	Methode nach Jenrassik-Graf (DPD-Methode), photometrische Bestimmung über eine enzymatische Diazon-Verbindung < 1,0 mg/dl
<i>Natrium</i> Referenzbereich:	Flammen-Emissionsphotometrie 135–149 mmol/l
<i>Kalium</i> Referenzbereich:	Flammen-Emissionsphotometrie 3,6–5,5 mmol/l
<i>Kreatinin</i> Referenzbereich:	Methode nach Jaffe ohne Enteiweißung 0,6–1,1 mg/dl
<b>Urinuntersuchungen</b>	<b>Methoden</b>
<i>Glukose</i> Referenzbereich:	Glukoseoxidase/Peroxidase-Farbindikator-test, Streifentest nach Boehringer negativ
<i>Eiweiß</i> Referenzbereich:	Teststreifenmethode, Indikatormethode < 165 mg
<i>Opiate</i> Referenzbereich:	Homogenes Enzym-Immunoassay (Emit) negativ
<i>Kokain</i> Referenzbereich:	Homogenes Enzym-Immunoassay (Emit) negativ

## 4.6. Statistische Methoden

### 4.6.1. Statistische Software

Die Daten für die Varianzanalyse wurden mit folgenden Programmen ermittelt:  
proc CORR, proc GLM and proc MIXED in SAS 6.08 unter VAX/VMS.

### 4.6.2. Berechnung pharmakokinetischer Parameter

$AUC_{0-t_n}$  (nmol x h/l):

„Area under the curve“ bezeichnet die Fläche unterhalb der Serumkonzentrations-Zeitkurve bis zur letzten meßbaren Konzentration der zu untersuchenden Substanz (0– $t_n$ ). Das heißt, die Fläche wird durch Integration der Serumspiegelkurve über die Zeitachse gewonnen und korreliert eng mit der Substanzmenge, die die systemische Zirkulation erreicht. Rechnerisch hat sich bei der Bestimmung der AUC die Interpolation der Fläche bis zum virtuellen Schnittpunkt der Serumspiegelkurve mit der Abszisse bewährt, wobei eine ausreichend lange Messung der Serumspiegel zur vollständigen Erfassung der resorbierten Menge sehr wichtig ist.

→  $C_{max}$  (nmol/l)      maximale Serumkonzentration innerhalb der 24 h-Untersuchung  
→  $t_{max}$  (h)            die Zeit, in der zum ersten Mal ein Maximum der Konzentration  
                                 der zu untersuchenden Substanz erreicht wird

Eine Varianzanalyse wurde mit Hilfe der Daten der  $AUC_{0-t_n}$ ,  $C_{max}$  und  $t_{max}$  von Omeprazol und Amoxicillin getrennt berechnet, wobei vorweg die Daten in eine logarithmische Darstellungsform umgerechnet worden waren. Die logarithmierten Daten lassen dabei ein lineares Modell mit einem konstanten Faktor für die Behandlung, Periode und Sequenz sowie mit einem Zufallsanteil für die Probanden innerhalb der Sequenz vermuten.

Die Schätzung, die mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate in einem 95-prozentigen Vertrauensbereich lag, wurde für den Mittelwert der Behandlungswerte berechnet. Das Konfidenzintervall wurde ermittelt, indem der 2,5-prozentige Perzentilenwert der Student-t-Verteilung mit dem Standardfehler des geschätzten Wertes multipliziert wurde.

Schätzungen mit der Methode der kleinsten Quadrate innerhalb eines 90-prozentigen Konfidenzintervalls wurden für den Mittelwert der Behandlung berechnet. Das Konfidenzintervall wurde ermittelt, indem der 5-prozentige Perzentilenwert der Student-t-Verteilung mit dem Standardfehler des geschätzten Wertes multipliziert wurde.

Nimmt man die exponenzierten Werte der Schätzwerte und die Konfidenzgrenzen, so erhält man die Konfidenzintervalle für den Mittelwert der Behandlungsquotienten. Bioäquivalenz wurde dann festgelegt, wenn das Konfidenzintervall des Behandlungsmittelwertes im Konfidenzintervall des Behandlungsquotienten zu liegen kam.

#### 4.6.3. Statistische Analyse der $C_{\max}$ und der AUC für Omeprazol und Amoxicillin

Die Varianzanalyse wurde bei dem oben dargestellten Modell mit logarithmisch-transformierten Variablen durchgeführt. Der Effekt der Behandlung und der Behandlungsperiode wurde über das Quadrat des Fehlers festgestellt. Dies wurde als Fehlerdeterminante im Modell eingesetzt. Die Schätzung, die mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate in einem 95-prozentigen Vertrauensbereich lag, wurde für den wirklichen Behandlungseffekt berechnet.

Der Vertrauensbereich wurde über den Schätzwert ( $\pm 0,025$  t-Quantilen) multipliziert und über den Standardfehler des Schätzwertes ermittelt. Mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate wurden Schätzungen ermittelt, die Aussagen darüber treffen, ob Unterschiede in der Behandlung mit Omeprazol oder Amoxicillin und in der kombinierten Behandlung mit beiden Medikamenten vorliegen. Dieser Unterschied zeigt sich rechnerisch in der Differenz der logarithmischen Daten von  $C_{\max}$  und  $AUC_{0-t_n}$ . Vertrauensintervalle auf einem Vertrauensniveau von 90 Prozent wurden ermittelt als Schätzwerte  $\pm 0,05$  t-Quantilen multipliziert mit dem Standardfehler des Schätzwertes.

Nimmt man den exponentiellen Wert der Schätzwerte und die der Konfidenzgrenzen, so erhält man einen 90-prozentigen Vertrauensbereich für das wahre mittlere Verhältnis der Behandlungswerte und einen 95-prozentigen Vertrauensbereich für den Effekt der Behandlungswerte. Liegt der Vertrauensbereich

für das wahre Verhältnis der Behandlungswerte im Bereich von 0,8–1,25, kann von einer Bioäquivalenz für die Monotherapie und die kombinierte Behandlung ausgegangen werden. Zur Ergänzung wurde darüber hinaus ein Student-t-Test erstellt, um die Hypothese der Bioäquivalenz zu verifizieren. Errechnet sich bei einem Vertrauensbereich von 95 Prozent - ein p-Wert  $> 0,05$ , wird die Null-Hypothese bestätigt. Ist der p-Wert hingegen  $< 0,05$ , liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen vor.

#### 4.6.4. Statistisches Modell für die Berechnungen der Unterschiede der intragastralen pH-Mediane

Für den Vergleich des pH-Medians der Run-in-Phase mit dem pH-Median bei der Behandlung mit Amoxicillin (sowie zum Vergleich von Omeprazol und der kombinierten Behandlung mit Amoxicillin) wurde ein gemischt-lineares Modell mit konstantem Behandlungseffekt und Randomisierungseffekt des Probanden eingesetzt. Der Unterschied zwischen einer Placebo- und einer Amoxicillin-Behandlung bezüglich des pH-Medians wurde über ein lineares Kontrastmodell ermittelt und das Konfidenzintervall über den mittleren quadratischen Fehler der ANOVA-Tabelle unter der Voraussetzung einer Student-t-Verteilung berechnet. Ein signifikanter Unterschied liegt dann vor, wenn  $p < 0,05$  ist.