



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Ausarbeitung einer Methode zur
Quantifizierung von Meropenem in Patientenproben“

verfasst von / submitted by

Teresa Sattler

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree
of

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich meinem Betreuer Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek herzlich danken – für die großartige Unterstützung, für die fachkundige Beantwortung all meiner Fragen sowie für die Lösung manch technischen Problems.

Lieber Gottfried, danke für all deine netten, aufmunternden Worte!

Danke an Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Team der Pharmakognosie-Division bedanken. Trotz der vorherrschenden Pandemie war die Stimmung in den gemeinsamen Kaffee-Pausen immer gut und die Hilfsbereitschaft immer groß.

Dieses halbe Jahr wird mir noch lange mit Freude in Erinnerung bleiben!

Nicht zu vergessen sind natürlich meine Familie und auch meine Freunde, die durch ihre fachlichen Ratschläge und ihren emotionalen Rückhalt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Ina und Herbert bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben, mich immerzu ermutigt haben und bedingungslos hinter mir stehen – ich hoffe, euch bereitet das Lesen meiner Diplomarbeit genauso viel Freude wie mir das Schreiben ebendieser.

Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Außerdem ein großes Dankeschön an meinen Bruder Nikolaus, der mich während zahlreicher Lern-Sessions nicht nur tatkräftig unterstützt hat, sondern auch meine Launen ertragen musste – und mir trotzdem immer zur Seite steht!

Besonders danken möchte ich auch meinem Freund David, der mich vor jeder noch so großen Prüfung aufheitern konnte und mich immer an mich glauben ließ.

Vielen Dank für all eure Unterstützung, ohne euch wären mir mein Studium und das Schreiben dieser Arbeit wohl um einiges schwerer gefallen!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit eidesstattlich, dass die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden verwendet. Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen aus den benutzten Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Wien, April 2021

Ort, Datum

Teresa Anna Sattler

Unterschrift

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABSTRACT	3
3	FRAGESTELLUNG.....	5
4	EINLEITUNG.....	7
4.1	Nierenersatztherapie	7
4.2	Die Dialyse	7
4.3	Die Peritonealdialyse	9
4.4	Peritonitis.....	17
4.5	Das Beta Lactam-Antibiotikum Meropenem	20
5	ARBEITSVERLAUF & ERGEBNISSE.....	26
5.1	Methodenoptimierung	26
5.2	Die Quantifizierungsmethode	33
5.3	Verifizierung.....	39
5.4	Probenaufarbeitung mit künstlichem Plasma.....	40
6	DISKUSSION	41
7	EXPERIMENTELLER TEIL.....	44
7.1	HPLC – High Performance Liquid Chromatography	44
7.2	MS – Massenspektrometrie	50
7.3	Beta Lactam-Antibiotika.....	59
7.4	Materialien	65
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	71
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	73
11	ANHANG	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APD	Automatic Peritoneal Dialysis (automatisierte Peritonealdialyse)
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
AUC	Area Under The Curve (Peakfläche)
CAPD	Continous Ambulatory Peritoneal Dialysis (kontinuierliche PD)
CEM	Channel Electron Multiplier (Kanalelektronen-Vervielfacher, Kanalelektronen-Verstärker)
DF	Dialysis Fluid, Dialyseflüssigkeit
DP	Doripenem
ESI	Elektrospray-Ionisation
GDP	Glucosedegradationsprodukt(e)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GIT	Gastrointestinaltrakt
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KF	Korrekturfaktor
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LM	Lösungsmittel
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MCA	Multiple Channel Analysis
MeCN	Acetonitril
MG	Molekulargewicht
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MO	Mikroorganismen
MP	Meropenem
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

MW	Mittelwert
NET	Nierenersatztherapie
NP	Normal Phase (Normalphase)
PBP	Penicillin-bindende Proteine
PD	Peritonealdialyse
PDF	Peritoneal Dialysis Fluid, Peritonealdialyse-Flüssigkeit
PEB	Plasmaproteinbindung, Plasmaeiweißbindung
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
SIM	Single Ion Monitoring
sogen.	sogenannte/r
ugs.	umgangssprachlich

Zur besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich/weiblich/divers verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer validierten Quantifizierungsmethode für Meropenem in Lösung, um im Zuge einer Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum St. Pölten und dem AKH Wien weiterführende Untersuchungen von Serum- bzw. Dialysatproben von Peritonealdialyse-Patienten zu erleichtern. Mithilfe eines LC-MS/MS-Systems sollte der Nachweis des Wirkstoffs besonders selektiv und sensitiv erfolgen, wodurch schließlich Aussagen über die mögliche Anwendung von Meropenem bei dieser speziellen Patientengruppe getroffen werden können.

Die Basis der Arbeit beruhte daher auf der Annahme, dass auch eine intraperitoneale Gabe des β -Lactam-Antibiotikums Meropenem zu ausreichend hohen Serumspiegeln bei Peritonealdialyse-Patienten führt und somit mögliche bakterielle Infektionen verhindert werden können.

Für Patienten, die an chronischer Niereninsuffizienz leiden, gibt es mit der Dialyse eine Form der Nierenersatztherapie, welche die Lebensqualität verbessern, das Fortschreiten der renalen Funktionseinschränkung verlangsamen und kardiale Risikofaktoren vermindern soll. Die allgemein bekannte und etablierte Methode stellt dabei die Hämodialyse dar, wobei die Peritonealdialyse als Alternativverfahren zunehmend an Bedeutung gewinnt. Durch die merkliche Steigerung der Lebensqualität und den Gewinn an Flexibilität steigt die Zahl der Anwender an (Davenport, 2014; Schnecker, 2020).

Nichtsdestotrotz bringt die Peritonealdialyse auch Nachteile mit sich: Eine der schwerwiegendsten Komplikationen stellt die Peritonitis dar. Ausgelöst durch bakterielle Infektionen kann eine Bauchfellentzündung im schlimmsten Fall eine weitere Peritonealdialyse unmöglich machen. Daher gilt es, entstehende Infektionen möglichst rasch zu identifizieren und mittels Antibiotika-Therapie zu behandeln oder womöglich prophylaktisch auszuschließen (Hunter et al., 2014; Li et al., 2010).

Das in dieser Arbeit untersuchte Antibiotikum Meropenem gehört zur Gruppe der β -Lactame, welche Zeit-abhängig bakterizid wirken. Als Carbapenem hat es ein besonders weitreichendes Spektrum an sensitiven Erregern (Gram-positiv,

Gram-negativ sowie Anaerobier), weshalb es sich gut als initiale Therapie vor Identifikation der Erregerkultur eignet (Baldwin et al., 2008; Fish & Singletary, 1997).

Ob eine intraperitoneale ebenso wie eine intravenöse Verabreichung ausreichend hohe Serumspiegel zur Bakterien-Eradikation ermöglicht, kann mit der ausgearbeiteten Nachweismethode in weiteren Untersuchungen eruiert werden.

Diese Arbeit empfiehlt zur Quantifizierung von Meropenem eine Kombination aus internem Standard und eine daraus abgeleitete Eichgerade, um eventuelle externe Fehler von Beginn an auszuschließen.

Der Nachweis erfolgte mithilfe eines LC-MS/MS (Kopplung von HPLC und Triple Quadrupol-Massenspektrometer), um möglichst sensitive und selektive Ergebnisse zu generieren.

Hierbei wurde jede Probelösung dreifach vermessen, um Ausreißer zu identifizieren und Fehler zu minimieren.

Um die erarbeitete Quantifizierungsmethode zu stützen und zur genaueren Untersuchung des Verhaltens von Meropenem in verschiedenen Lösungen, sollten zusätzliche Daten des Analyten in künstlichem Plasma erhoben werden. Aufgrund von technischen Problemen des Massenspektrometers konnten dahingehend jedoch keine Ergebnisse geliefert werden.

Ungeachtet dessen konnte in dieser Arbeit eine Quantifizierungsmethode für Meropenem entwickelt werden, welche nachfolgende Untersuchungen mit Proben von Peritonealdialyse-Patienten ermöglicht und somit eine aktive Hilfestellung für die Forschung bei dieser besonderen Patientengruppe darstellt.

2 ABSTRACT

The aim of this thesis was to develop a validated quantification method for dissolved meropenem, in order to facilitate subsequent studies of serum or dialysate samples from patients treated with peritoneal dialysis.

The verification method was obtained by using a LC-MS/MS system, which detects substances highly sensitive and specific. Ultimately, this should give an idea of how meropenem could be used in this special group of patients.

Therefore, the basis of this work is the suggestion that intraperitoneal administration of the antibiotic meropenem leads to sufficient serum levels in patients that undergo peritoneal dialysis therapy and thus can eliminate possible bacterial infections.

Patients who suffer from chronic kidney disease are usually treated with haemodialysis, which is a form of renal replacement therapy that is designed to improve quality of life, slow down the progression of renal impairment and reduce further risk factors. As an alternative to this well-established method, peritoneal dialysis is becoming increasingly important. Especially because of the notable increase in quality of life and the gain in flexibility more and more users can be found (Davenport, 2014; Schnecker, 2020).

Nonetheless, one of the biggest downsides of peritoneal dialysis therapy is the serious but possible complication of peritonitis. Peritonitis is caused by bacterial infections and can make further peritoneal dialysis therapy impossible, in the worst case. That's exactly where the antibiotics come into play: In order to treat these infections optimally or even prevent them in the first place, antibiotics must be used (Hunter et al., 2014; Li et al., 2010).

In this work meropenem is examined as it's a β -lactam antibiotic that has a time-dependent bactericidal effect. It belongs to the class of carbapenems and has an extremely broad spectrum of sensitive pathogens (e.g., gram-positive, gram-negative bacteria as well as anaerobes). Particularly because of its wide range of sensitive bacteria it is highly suitable for the initial treatment of infections as long as the exact pathogen culture is not yet identified (Baldwin et al., 2008; Fish & Singletary, 1997).

With the elaborated quantification method further studies can be carried out in order to obtain information on whether to pursue intraperitoneal or intravenous administration for better antibiotic efficacy.

For quantification of meropenem, the present work suggests the use of an internal standard as well as a calibration curve in order to prevent external errors that could distort the results.

The detection of meropenem was carried out using a LC-MS/MS system (a combination of HPLC and triple quadrupole mass spectrometry) in order to generate the most sensitive and selective results possible.

Each sample solution was measured three times in order to identify outliers and therefore avoid errors.

With the aim of supporting the developed method and gaining additional information of its behaviour, further data on meropenem in artificial plasma should be collected. Due to technical issues of the mass spectrometer, however, these data could not be provided.

Nonetheless, a valid quantification method for meropenem was developed. Consecutive experiments with samples from patients undergoing peritoneal dialysis therapy can be simplified by using this customised method and thus be of big help for the ongoing research in this particular topic.

3 FRAGESTELLUNG

Neben der weitgehend bekannten Hämodialyse gibt es mit der Peritonealdialyse (PD) eine kostengünstigere Alternative als Nierenersatztherapie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Hierbei fungiert das Patienten-eigene Bauchfell als semipermeable Membran, über das der Stoffaustausch zur „Blutreinigung“ stattfindet (Karger, 2018).

Über die letzten Jahre hinweg stieg die Zahl der Anwender von PD an – besonders aus dem Grund der gewonnenen Flexibilität: Diese Form der Dialyse kann vom Patienten selbst zuhause durchgeführt werden und hat somit, im Gegensatz zu herkömmlicher Hämodialyse im Krankenhaus, den großen Vorteil des Komforts und daher einen merklichen Gewinn an Lebensqualität für den Patienten (Schnecker, 2020).

Gerade aus diesem Grund ist jedoch die Gefahr von Infektionen durch bakterielle Erreger erhöht – denn trotz Patienten-Schulung entsprechen die häuslichen Gegebenheiten natürlich nicht den strengen Hygienevorschriften und dem ausgebildeten Personal eines Krankenhauses (siehe Kapitel 4.3).

Um nun mögliche Infektionen des Bauchfells oder Peritonitis bei PD-Patienten rasch und vor allem effektiv zu behandeln oder bereits im Voraus zu vermeiden, gilt es eine medikamentöse Therapie zu finden, welche bei i.p. (intraperitonealer) Gabe als Zusatz zur Dialyselösung eine wirksame Konzentration erreicht.

Über die Verwendung des Breitspektrum-Antibiotikums Meropenem bei PD-assoziiierter Peritonitis o.a. Infektionen des Bauchfells liegen bis dato nur sehr wenige Daten vor.

Diese Arbeit hatte daher zum Ziel eine Methode zur sensitiven und selektiven Quantifizierung von Meropenem zu entwickeln, um in nachfolgenden Experimenten validierte Daten über die Serum- bzw. Dialysatkonzentrationen von Meropenem sowohl nach i.v. (intravenöser) Gabe als auch nach i.p. (intraperitonealer) Gabe zu sammeln und zu vergleichen.

Aufgrund der vorherrschenden SARS-CoV-2-Pandemie konnten jedoch keine Patientenproben genommen und analysiert werden, sodass in dieser Arbeit die zugrundeliegende Technik zur Quantifizierung des Antibiotikums ausgeführt und erläutert wird.

Die erarbeitete Methode soll demnach weiteren Forschungen zur Meropenem-Bestimmung in Proben von Peritonealdialyse-Patienten dienen, sodass zu einem späteren Zeitpunkt sogar ggf. eine Therapie-Empfehlung inkl. entsprechender Dosierung für intraperitoneal verabreichtes Meropenem bei dieser speziellen Patientengruppe ausgesprochen werden kann.

4 EINLEITUNG

4.1 NIERENERSATZTHERAPIE

Die Nieren regulieren beim gesunden Menschen nicht nur den Wasser- und Elektrolythaushalt (bspw. Kalium, Natrium, Phosphat), sondern sind auch für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen (z.B. Harnstoff, Kreatinin u. a. wasserlösliche Substanzen) verantwortlich.

Ist nun aufgrund von verschiedenen Krankheiten die Nierenfunktion eingeschränkt – gekennzeichnet durch ein Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR) – spricht man von akutem Nierenversagen oder chronischer Niereninsuffizienz.

Bei Patienten mit einer GFR unter 15 mL/min handelt es sich um terminale Niereninsuffizienz. In diesem Stadium der Funktionsstörung muss zur Lebenserhaltung eine Nierenersatztherapie (NET) angewendet werden (Karger, 2018).

Ganz allgemein lassen sich unter dem Begriff Nierenersatztherapie verschiedene Behandlungsmöglichkeiten zusammenfassen:

Diese beinhaltet unterschiedliche Formen der Dialyse, wie die Hämodialyse, die Hämofiltration und die Peritonealdialyse (PD), sowie die Nierentransplantation. Bei diesen Therapieoptionen geht es vor allem darum, das Fortschreiten der Nierenfunktionsstörung zu verlangsamen und im Zuge dessen kardiovaskuläre Risikofaktoren zu vermindern. Für jeden Patienten sollte dabei individuell entschieden werden, welche Behandlung die beste darstellt (Davenport, 2014).

4.2 DIE DIALYSE

„Wie bei gesunden Nieren werden mit der Dialyse überschüssiges Wasser sowie die angereicherten Elektrolyte und harnpflichtige Substanzen aus dem Körper entfernt“ (Karger, 2018). Dies ist zum weitgehenden Erhalt aller Lebensfunktionen bei chronischer Niereninsuffizienz notwendig, da es sonst zur Anreicherung dieser verschiedenen Substanzen und Metaboliten im Blut kommt. Zu hohe Konzentrationen ebendieser können toxisch wirken und im schlimmsten Fall

lebensbedrohlich sein. Darüber hinaus muss ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen im Körper aufrechterhalten und ggf. korrigiert werden (Davenport, 2014).

Grundsätzlich basiert die Dialyse auf dem Osmose-Prinzip, also dem Austausch von Stoffen über eine halbdurchlässige (semipermeable) Membran. Die Diffusion wird durch ein Konzentrationsgefälle getrieben, d.h. alle im Blut ungewollten Moleküle werden entgegen des Konzentrationsgradienten von der „Blutseite“ über eine Membran zur „Dialysatseite“ transportiert und somit aus dem Blut entfernt.

Hierbei muss beachtet werden, dass auch lebenswichtige Elektrolyte wie z.B. K^+ , Ca^{2+} oder Na^+ ins Dialysat diffundieren können. Daher müssen der Dialyseflüssigkeit entsprechende Salze beigefügt werden, um die Entziehung dieser Stoffe möglichst gering zu halten (Karger, 2018).

Die vorherrschende und auch allgemein bekannte Form der Dialyse ist die Hämodialyse.

Diese Variante der Dialyse erfolgt extrakorporal, d.h. das Blut wird mittels einer Maschine über einen Filter (sogen. Dialysator) geleitet, wo es von der Dialyseflüssigkeit umspült – und so von allen ungewollten Substanzen befreit – wird. Die Patienten benötigen hierfür einen zentralvenösen Katheter oder chirurgisch angelegte arteriovenöse Fisteln, damit mittels Kanülen das Blut zu- und abgeleitet werden kann.

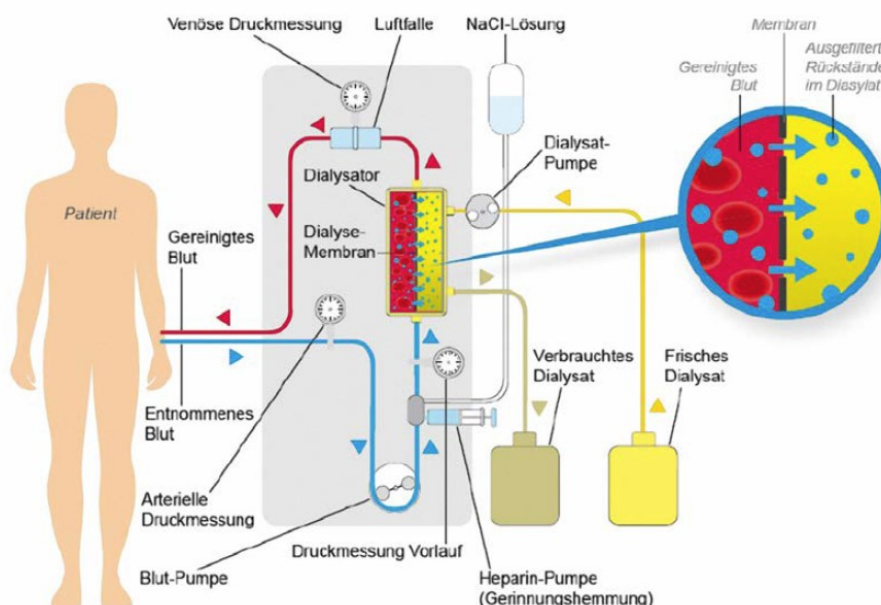


Abbildung 1: Schema Hämodialyse [Grafik]

Quelle: <https://sicheres-krankenhaus.de/planungsbuero/anforderungen-pflegebereiche/dialyse>, abgerufen am 28.01.2021

Um eine effektive Behandlung zu gewährleisten, muss die Hämodialyse i.d.R. dreimal wöchentlich für vier bis fünf Stunden im Krankenhaus bzw. Dialysezentrum durchgeführt werden (Karger, 2018).

Da diese Behandlungsform intermittierend angewendet wird, gilt es zu beachten, dass sich Wasser, Elektrolyte und harnpflichtigen Substanzen in der Zeit zwischen den Dialysen ansammeln und es somit zu starken Schwankungen der Konzentrationen kommt.

Weiters ist anzumerken, dass durch oben genannte Gefäßzugänge Komplikationen wie Infektionen, Stenosen oder Thrombosen möglich sind und damit die Qualität der Hämodialyse beträchtlich mindern können (Hechanova, 2018a).

4.3 DIE PERITONEALDIALYSE

Als Alternative zur Hämodialyse bietet sich die Peritonealdialyse (Bauchfelldialyse) an: Sie basiert auf einem intrakorporalen System ohne externe Dialysemaschine. Das gut durchblutete Peritoneum (Bauchfell) der Patienten dient als natürliche, semipermeable Membran, wodurch die Diffusion und somit die Elimination harnpflichtiger Substanzen (wie in Kapitel 4.2 erklärt) stattfinden kann (Hechanova, 2018b).

Bei dieser Art der Dialyse benötigt der Patient einen permanenten intraperitonealen Zugang (PD-Katheter), der operativ in die Bauchdecke implantiert wird. Über diesen Kunststoff-Katheter erfolgt der Austausch des Dialysats – weshalb er durch die ständige Beanspruchung auch das „heikelste Glied“ innerhalb aller Teilelemente der PD ist (Geberth & Nowack, 2014).

Bei mangelnder Pflege und Hygiene kann es durch die Ansiedlung verschiedener Keime zu Infektionen kommen, beispielsweise „exit-site“-Infektionen (Infektionen am Ausgang des Katheters) oder Tunnelinfektionen. Als schwerwiegende Folge der Keimbelastung kann dies eine Peritonitis (Entzündung des Bauchfells) nach sich ziehen (Piraino et al., 2011).

Weitere Informationen bzgl. Peritonitis sind dem Kapitel 4.4 zu entnehmen.

Positiv zeichnet sich die Peritonealdialyse vor allem dadurch aus, dass sie vom Patienten selbstständig zuhause durchgeführt werden kann, somit mehr Freiraum

und Flexibilität gewährt und keinen zusätzlichen venösen Zugang erfordert. Sie ist insgesamt schonender für den Kreislauf, da keine extrakorporale Dialysemaschine nötig ist und stellt somit einen geringeren Stressfaktor für den Körper dar. Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, dass unter PD-Behandlung die Restfunktion der Nieren länger erhalten bleibt als bei konventioneller Hämodialyse.

Für gewöhnlich stellen auch eine vorhandene Herzinsuffizienz, Aszites oder Diabetes kein Hindernis für eine Peritonealdialyse dar.

Freilich ist für eine erfolgreiche Behandlung jedoch höhere Patientenbeteiligung mit entsprechend intensiver Schulung, vor allem in Hinblick auf die Hygiene notwendig.

Dies stellt besonders für alleinlebende, ältere Patienten mit eingeschränktem Sehvermögen oder fehlender Feinmotorik ein Ausschlusskriterium dar. Jedoch gibt es die Möglichkeit entsprechende Pflegekräfte oder Angehörige hinzuzuziehen, um die PD gemeinsam zu bewerkstelligen.

Absolute Kontraindikationen für Peritonealdialyse gibt es nur sehr wenige, dazu zählen Verwachsungen nach Bauchoperationen, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sowie Divertikulitis (entzündete Ausstülpungen der Darmwand) (Hechanova, 2018b; Salmhofer, 2008).

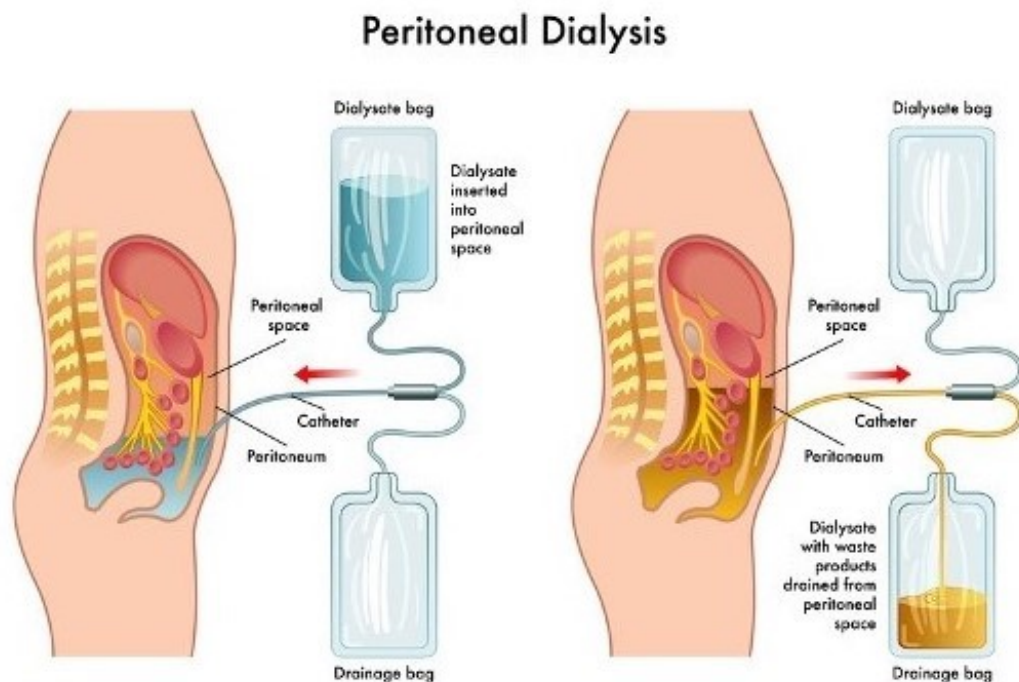


Abbildung 2: Schema Peritonealdialyse [Grafik]

Quelle: <https://www.gesundheit.gv.at/krankheiten/nieren-harnblase/dialyse/peritonealdialyse-bauchfelldialyse>, abgerufen am 28.01.2021

4.3.1 DAS PERITONEUM

Das Peritoneum ist mit einer Gesamtfläche von knapp 2 m² die größte seröse Membran des menschlichen Körpers. Es wird in das parietale Peritoneum und das viszerale Peritoneum unterteilt, wobei ersteres die inneren Wände des Bauchraums auskleidet und zweiteres die viszerale Organe des Bauchraums umschließt. Es setzt sich aus drei Schichten, nämlich Endothel, Interstitium und Mesothel, zusammen. Unter physiologischen, d.h. gesunden, Umständen enthält der Bauchraum 5-20 mL Peritoneal-Flüssigkeit, um die Oberfläche feucht zu halten und somit die Bewegung der viszerale Organe zu ermöglichen, sowie um den Austausch von Substanzen und Immunzellen zwischen dem Fluid und dem Blutplasma im Gleichgewicht zu halten. Bei Krankheit kann dieses Gleichgewicht gestört sein und in einer Flüssigkeitsansammlung in der Bauchhöhle, dem sogen. Aszites, resultieren.

Wie bereits in Kapitel 4.3 erwähnt, fungiert das Peritoneum als semipermeable Membran und erlaubt durch Diffusionsprozesse einen passiven Transport von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen. Genau diese Fähigkeit des Stoffaustauschs prädestiniert das Peritoneum zur Verwendung als Dialysemembran bei der Nierenersatztherapie. Ultrafiltration von Wasser und Diffusion von Elektrolyten und harnpflichtigen Substanzen sind bei der Peritonealdialyse die gewünschten Vorgänge. Darüber hinaus beeinflusst das menschliche Bauchfell Entzündungsreaktionen, Antigenpräsentation und Gewebsreparatur (Hunter et al., 2014; van Baal et al., 2017).

Wie aber Fang et al. (2004) und van Baal et al. (2017) darlegen, kann PD die Struktur des Peritoneums fortschreitend verändern, sodass Umbildungen der Membran, Fibrose und Angiogenese eine effiziente Dialyse-Behandlung unmöglich machen.

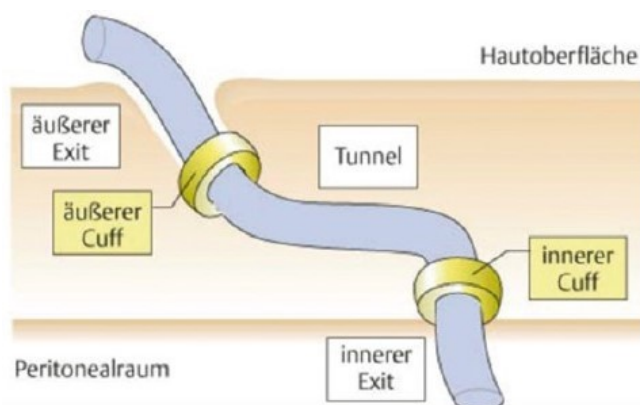
4.3.2 PERITONEALER ZUGANG / KATHETER

Zur Gewährleistung einer erfolgreichen PD-Behandlung steht im ersten Schritt das korrekte Einbringen eines dauerhaften Dialyse-Zugangs in die Bauchhöhle im Vordergrund.

Durch stetige Weiterentwicklungen stehen dafür heute Kunststoff-Katheter in verschiedenen Längen und Ausführungen zur Verfügung, die mittels chirurgischer oder laparoskopischer Techniken implantiert werden.

Das „Standard-PD-Katheter-Modell“ besteht aus einem Röhrchen aus Silikon, damit es beweglich und weich ist und inert reagiert, d.h. es geht für gewöhnlich keine unerwünschten Wechselwirkungen mit körpereigenem Gewebe ein. Fremdkörperreaktionen sollen so vermieden werden, wobei Entzündungen entlang des Katheters trotzdem nicht vollkommen auszuschließen sind.

Damit das Katheter-Röhrchen in Position bleibt, wird es mit sogen. Cuffs (Dacronmuffen) im Unterhautgewebe bzw. in der Muskulatur fixiert. Für gewöhnlich werden meist Katheter mit zwei Cuffs verwendet: Dabei sitzt der innere Cuff direkt auf dem Bauchfell auf und der äußere wird entweder im Fettgewebe (2 cm vor dem Ausgang) oder innerhalb der Faszie der Bauchmuskulatur positioniert (Mettang, 2014; Peppelenbosch et al., 2008).



**Abbildung 3: Schema der Katheterabschnitte mit Cuff-Positionierung [Grafik],
Quelle: Mettang, 2014**

Um diesen i.p. Zugang zu schaffen, kann im Allgemeinen zwischen drei Methoden gewählt werden: „blind“ (Mini-Trokar-Methode), laparoskopisch oder chirurgisch. Zum Infektionsschutz wird der Katheter in allen drei Fällen „getunnelt“, das bedeutet, wie Mettang (2014) beschreibt: „[der Katheter wird] in stumpfem Winkel durch die Strukturen der Bauchdecke (Faszien, Muskulatur, Fettgewebe und Haut) ausgeleitet“.

Mettang (2014) sowie Peppelenbosch et al. (2008) berichten, dass keine konkrete Empfehlung über die Überlegenheit eines der Verfahren ausgesprochen werden kann, da zwar endoskopische Verfahren mit höherem technischem Aufwand und längerer Operationszeit verbunden sind, jedoch genauso wie offen-chirurgische

Methoden gute Erfolge bei Patienten mit erstmaligem peritonealem Zugang erzielen.

Generell sollte bei der Katheter-Anlage eine Austrittsstelle gewählt werden, die der Patient gut sehen, beurteilen und pflegen kann, um die richtige Verbindung mit den Dialyse-Beuteln zu gewährleisten. Weitere Aspekte, die bei der Implantation beachtet werden müssen, ist die gute Fixierbarkeit, die Positionierung der Muffen und dass der Katheter nicht unter Spannung steht – welche Seite des Unterbauchs dabei gewählt wird, ist von geringerer Bedeutung.

Des Weiteren sollte nach erfolgreicher Katheter-Implantation die sogen. „break-in period“ abgewartet werden, d.h. es sollten mindestens zwei Wochen vergehen, bevor mit der Dialyse-Behandlung gestartet wird. Dies soll zumindest eine teilweise Heilung des verletzten Peritoneums gewähren und in Folge mechanische Komplikationen oder Bakterienbesiedelung vermindern (Mettang, 2014).

4.3.3 VERFAHREN DER PERITONEALDIALYSE

Die Behandlung einer Niereninsuffizienz mittels Peritonealdialyse kann auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden:

Als automatisierte PD (APD, automated peritoneal dialysis), bei welcher der Dialysat-Tausch unter Zuhilfenahme eines sogenannten Cyclers erfolgt oder als kontinuierlich-ambulante PD (CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis), bei der über den Tag verteilt mehrere Wechsel des Dialysats vom Patienten manuell, ohne externe Maschine, durchgeführt werden (Geberth & Nowack, 2014).

4.3.3.1 Automatisierte Peritonealdialyse (APD)

Die automatisierte oder auch apparative Peritonealdialyse ist zwar nicht die vorherrschende, aber in den letzten Jahren immer gefragtere Variante der PD. Dieses Verfahren ist, im Gegensatz zur CAPD, maschinell gestützt, denn der Dialysat-Wechsel erfolgt mithilfe eines Geräts, des sogen. PD-Cyclers.

Der liegende Patient ist zur Steuerung und Überwachung sowie für den Flüssigkeitszulauf und -ablauf mit diesem Cycler verbunden (Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V., 2021).

Nach Einschulung des Patienten erfolgt die APD stets über Nacht, indem der Cycler vor dem Zubettgehen mit dem PD-Katheter verbunden wird. Vollautomatisch werden durch elektrische Pumpen mehrere Dialysezyklen durchgeführt, wobei sich ein Zyklus aus dem Einbringen frischer Dialyselösung, der spezifischen Verweildauer in der Bauchhöhle und zuletzt dem Auslauf des angereicherten Dialysats zusammensetzt. In der Früh kappt der Patient einfach die Verbindung zwischen Katheter und Cycler und kann tagsüber komplett unabhängig und flexibel agieren (Andreas Vychytil & Hörl, 2013).

Das Gerät arbeitet selbsttätig, reguliert die Ein- und Auslaufvolumina automatisch und alarmiert bei Störungen optisch und akustisch. Bis zu 20 L Dialysat werden bei einer Dauer von ca. 8 Stunden umgesetzt, wobei man spezifische, Patienten-abhängige Parameter wie die Frequenz der Zyklen und die Größe der Flüssigkeitsvolumina einstellen kann (Geberth & Nowack, 2014).

Besonders für Kinder und Ältere, aber auch für aktive Erwachsene stellt die APD eine sinnvolle Alternative dar, da die Behandlung vollautomatisiert abläuft und tagsüber i.d.R. keine Dialysat-Wechsel notwendig sind (Davenport, 2014).

4.3.3.2 Kontinuierliche Peritonealdialyse (CAPD)

Die kontinuierlich-ambulante PD ist die geläufigere Variante der beiden Verfahren und gilt als die Standard-Methode. Die Dialyse verläuft hier kontinuierlich und der Flüssigkeitsaustausch, ugs. Beutelwechsel, wird nach entsprechender Schulung manuell vom Dialyse-Patienten selbst durchgeführt.

Für einen Dialysat-Wechsel wird ein sogen. Doppelbeutelsystem benötigt, das händisch mit dem PD-Katheter verbunden wird. Als erstes wird das mit harnpflichtigen u. a. ungewollten Substanzen angereicherte Dialysat aus der Bauchhöhle in einen Leerbeutel abgelassen, um danach eine frische Dialyselösung in das Peritoneum fließen zu lassen (Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V., 2021; Andreas Vychytil & Hörl, 2013).

Das bedeutet, diese PD-Methode basiert auf einer verminderten Anzahl an Dialysat-Wechseln und ergibt insgesamt eine verlängerte Verweilzeit (dwell time) des Dialysats im Peritoneum.

Die Bauchhöhle ist daher konstant mit Dialyse-Flüssigkeit gefüllt und in einem Abstand von ca. vier Stunden erfolgen über den Tag verteilt drei bis fünf Dialysat-

Wechsel. Über Nacht muss kein Austausch erfolgen, da eine Verweildauer von bis zu 8 Stunden möglich ist. Die Menge der Dialyselösung hängt dabei vom Aufnahmevermögen des Bauchraums des jeweiligen Patienten ab (Davenport, 2014; Geberth & Nowack, 2014).

Zusammengefasst sind die klaren Vorteile der CAPD die einfache Handhabung bei relativ geringem technischem Aufwand, die Regelmäßigkeit der Therapie und die verhältnismäßig niedrigen Kosten.

Andererseits beanspruchen die mehrmaligen Flüssigkeitswechsel untertags eine beträchtliche Zeit (pro Wechsel ca. 30-45 min), die der Patient immer mit einplanen muss. Die Gefahr der Entwicklung einer Peritonitis ist mit dieser Methode, im Gegensatz zu automatisierten Verfahren, geringfügig erhöht, da die Beutel-Wechsel vermehrt und manuell durchgeführt werden müssen.

Des Weiteren ist die Steigerungsfähigkeit des Dialysat-Flusses bei der CAPD beschränkt, da stark erhöhter intraabdomineller Druck zu Dyspnoe führen kann.

Aus diesen einschränkenden Gründen gewinnt die APD immer höhere Popularität (Geberth & Nowack, 2014).

4.3.4 DIALYSELÖSUNGEN

Die verwendeten Dialyseflüssigkeiten werden individuell an den Patienten angepasst und bestehen im Allgemeinen aus einer sterilen, wässrigen Lösung. Neben Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- und HCO_3^- wird meist auch eine kleine Menge Glucose beigefügt. Weiters enthalten sie als Puffer Natriumbicarbonat oder Lactat zur Aufrechterhaltung des physiologischen Säure-Basen-Haushalts sowie Vitamine und Aminosäuren in unterschiedlichen Konzentrationen. Der Glucose-Zusatz wird benötigt, um den Wasserentzug bei der Peritonealdialyse durch Erhöhung der Osmolarität zu ermöglichen. Diesen Vorgang des Entfernens von überschüssigem Wasser nennt man auch Ultrafiltration. Der starke Flüssigkeitsentzug muss beim Dialysat-Wechsel durch Abwiegen ermittelt werden (Karger, 2018; A. Vychytil, 2017).

Durch den Zusatz von Glucose und anschließender Hitzesterilisation der Dialyselösungen können sogen. Glucosedegradationsprodukte (GDP) entstehen, die lokal, aber auch systemisch toxisch wirken.

Des Weiteren kann durch die gute peritoneale Resorption von Glucose die Ultrafiltration, insbesondere bei langen Verweilzeiten, vermindert werden, was eine potentiell negative Auswirkung von Glucose auf den Metabolismus darstellt. Durch stetige Weiterentwicklungen stehen mittlerweile auch weniger schädliche Dialyselösungen mit besserer Biokompatibilität zur Verfügung (A. Vychytil, 2017).

Die Bildung der GDPs kann einerseits durch Kompartimentierung der PD-Beutel verhindert werden, indem die Glucose räumlich vom Puffer (Bicarbonat und/oder Lactat) getrennt wird und erst kurz vor Verwendung vermischt wird. Andererseits können auch Lösungen mit aus Maisstärke gewonnenem Icodextrin anstelle von Glucose verwendet werden, welche zwar durch einen ähnlich niedrigen pH-Wert von 5 - 5,5 keine optimale Biokompatibilität aufweisen, jedoch durch eine geringere Bildung von GDPs zu besserer Ultrafiltration führen und somit positive Effekte hinsichtlich des Körper-Wassergehalts zeigen. Dies gründet vor allem auf der Größe des Glucose-Polymers Icodextrin, da es zu groß ist, um das Peritoneum schnell zu passieren. Die Gefahr einer Hyperglykämie ist hier im Vergleich zu Glucose-haltigen Lösungen deutlich geringer (Davenport, 2014; A. Vychytil, 2017).

Eine weitere Möglichkeit bietet der Zusatz einer Kombination aus 15 Aminosäuren anstatt von Glucose als osmotisches Agens. Wie in einigen Studien durch A. Vychytil (2017) beschrieben wird, bietet diese Flüssigkeitszusammensetzung durch einen anabolen Effekt mit positiver Proteinbilanz womöglich Vorteile bei mangelernährten Patienten.

Der Mangel an groß ausgelegten klinischen Studien macht es schwierig, endgültige Empfehlungen für oder gegen bestimmte Lösungen auszusprechen, jedoch hat, wie eingangs erwähnt, die individuelle Patienten-Abstimmung oberste Priorität (A. Vychytil, 2017).

Die Kompatibilität des zu untersuchenden Antibiotikums Meropenem mit handelsüblich verwendeten Dialyselösungen wird in Kapitel 4.5.1.1 behandelt.

4.4 PERITONITIS

Die Peritonitis (Entzündung des Bauchfells) stellt nach wie vor eine der häufigsten und schwerwiegendsten Komplikationen der Peritonealdialyse dar. Zwar enden weniger als 4% aller PD-assoziierten Peritonitis-Fälle tödlich, jedoch ist eine Bauchfellentzündung in 16% aller Todesfälle mitverantwortlich. Bei besonders gravierenden Krankheitsverläufen kann eine Peritonitis auch zum Versagen der PD führen, da das Peritoneum in seiner Aufgabe als halbdurchlässige Membran geschädigt wird. Bei rund 25% aller Peritonitiden muss der PD-Katheter entfernt werden (Hunter et al., 2014). All diese Gründe unterstreichen die Wichtigkeit der Prophylaxe vor Keimbefall, aber auch die korrekte Behandlung bei bereits erfolgter Infektion. Denn nur eine schnelle Entzündungshemmung und Keimreduktion erhält die natürliche Membran-Funktion des Bauchfells (Li et al., 2010).

Grundsätzlich kann eine PD-assoziierte Peritonitis durch verschiedene Ursachen entstehen, die größte Infektionsquelle bietet allerdings der PD-Katheter, da er einen einfachen Zugang zum sonst sterilen Bauchfell ermöglicht. Hierbei erfolgt die Kontamination meist über Berührungen durch den Patienten selbst, Pfleger oder sonstige Helfer, die vorgeschriebene Hygienemaßnahmen beim Beutelwechsel missachten und so den Katheter oder Verbindungsstücke mit Keimen belasten (W. L. Salzer, 2018).

Weiters kann Peritonitis durch intra-abdominelle Entzündungen oder durch sogen. „exit-site“-Infektionen oder „Tunnel“-Infektionen entstehen – etwa 20% der Peritonitiden sind auf diese beiden Ursachen zurückzuführen. Erstere kann sich durch Eiterbildung an der Übergangsstelle zwischen Katheter und Haut äußern, zweite bleibt meist unerkannt – tritt aber auch nur selten alleine auf. Auch intra-abdominelle Operationen, Koloskopie, Hysteroskopie oder eine sogen. Darmdurchwanderungsperitonitis, ausgelöst durch Obstipation, stellen eine signifikante Gefahr für eine Bauchfellentzündung dar.

Bei Schmierinfektionen durch unsauberes Arbeiten wird als pathogener Keim meist *Staphylococcus epidermis* übertragen, der zwar Teil der natürlichen Hautflora ist, aber eine außergewöhnlich gute Haft-Fähigkeit an unphysiologischen Oberflächen – wie Kathetern – hat (Li et al., 2010; W. L. Salzer, 2018; Schwenger, 2007).

Die Erreger, welche am häufigsten Katheter-assoziierte Infektionen mit nachfolgender Peritonitis auslösen, sind bakteriell und heißen *Staphylococcus aureus*

und *Pseudomonas aeruginosa*. Allerdings können auch andere, meist Gram-positive, Bakterien wie verschiedene *Streptococce*-Arten, anaerobe Organismen, Diphtheroide, Legionellen oder Pilze und Hefen beteiligt sein (Li et al., 2010). Durch Gram-negative Bakterien ausgelöste Peritonitiden sind mit 15-30% nicht so häufig wie Gram-positive Peritonitiden, welche 60-80% ausmachen.

Daneben sind auch fungale Bauchfellentzündungen nicht zu unterschätzen, meist hervorgerufen durch Hefen wie *Candida* (Davenport, 2014; Hunter et al., 2014).

In Tabelle 1 (unten) können die häufigsten Erreger einer PD-assoziierten Peritonitis inkl. ihrer Auftrittshäufigkeit und möglicher antibiotischer Behandlung nachgelesen werden.

Tabelle 1: Übersicht PD-assoziierte Peritonitis verursachende Erreger-Stämme

Einteilung nach Gram ¹	Mikroorganismen ¹	Isolierung bei Peritonitis [%] ¹	ISPD Therapie-Empfehlung ²
Gram-positiv	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermis</i>	≥ 50 %	Cephalosporine / Vancomycin (bei MRE)
	<i>Streptococcus</i> (β-hämolysierend)	5-10 %	Ampicillin
	<i>Corynebacterium</i>	< 5 %	Vancomycin
	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	k. A.	Vancomycin +/- Aminoglykoside / Ampicillin (bei VRE)
Gram-negativ	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus ssp.</i>	10-25 %	k. A. ³
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Stenotrophomonas</i>	< 5 %	Gentamicin/Ciprofloxacin + Ceftazidim/Cefepim oder Carbapeneme ⁴

¹ Quelle: Salzer (2018)

² Quelle: Li et al. (2016), Salzer (2018)

³ Aufgrund der unterschiedlichen Resistenzen der verschiedenen MO kann hier der Übersicht wegen keine Empfehlung genannt werden, siehe ISPD Guidelines (Li et al., 2016).

⁴ Bsp. Antibiotika-Therapie gegen *P. aeruginosa*

Ist der pathogene Keim erst einmal in den Bauchraum eingedrungen, ist es schwer ihn wieder loszuwerden. Die Mikroorganismen finden hier eine warme, dunkle Umgebung mit vielen Nährstoffen wie bspw. Glucose vor und physiologische

Abwehrkomponenten wie Makrophagen, Immunglobuline oder das Komplementsystem sind im noch nicht entzündeten Peritoneum nur gering ausgeprägt. Ohne Störung können sich die Keime hier rasch vermehren und starke Entzündungsreaktionen hervorrufen (W. L. Salzer, 2018).

Die Katheter-assoziierten Infektionen bei PD-Peritonitis machen trotz antimikrobieller Therapie oftmals einen Tausch des Katheters bzw. sogar einen (vorübergehenden) Therapie-Wechsel auf Hämodialyse notwendig. Bei einer *P. aeruginosa*-Infektion muss der peritoneale Zugang aufgrund der schlechten Sanierbarkeit meist komplett entfernt werden (Schwenger, 2007). Auch bei fungalen Peritonitiden ist eine sofortige Katheter-Entfernung i.d.R. unumgänglich, da diese Art der Peritonitis eine hohe Mortalität aufweist (Hunter et al., 2014).

Damit es gar nicht erst zu einer Bauchfellentzündung während PD-Therapie kommt oder sie im Akutfall schnell erkannt wird, müssen Patienten ausreichend geschult werden. U.a. gibt es dazu freizugängliche Guidelines der ISPD (International Society for Peritoneal Dialysis), welche Patienten, Angehörige und medizinisches Personal hinsichtlich der Gefahr von Peritonitis, aber auch über den „state of the art“ der Therapie informieren und auf den neuesten Stand der Forschung bringen sollen (<https://ispd.org>).

Wie Schwenger (2007) beschreibt, konnte gezeigt werden, dass intensiviertes Training der Patienten die Peritonitisrate deutlich senken konnte. [...] „Trainingsmaßnahmen sollten hierauf [lokale Resistenzen, häufige Infektionswege, Rezidive] gezielt abgestimmt werden, und ggf. sollte ein regelmäßiges Nachtraining erfolgen.“

Etwaige Anzeichen und Symptome einer Peritonitis gilt es sodann schnell zu erfassen: Bauchschmerzen, Fieber und Trübung des Dialysats sind dabei die Hauptmerkmale (W. L. Salzer, 2018). Des Weiteren äußert sich eine Peritonitis oft durch Übelkeit und Erbrechen und bei schwerwiegenden Fällen auch durch Hypotonie. Der Grund für die abdominelle Empfindlichkeit liegt dabei an der akuten Reizung des Bauchfells (Davenport, 2014).

Bei etwaigem Auftreten von trübem Dialysat sollte rasch gehandelt werden und Proben direkt aus dem ersten auffälligen Beutel entnommen werden, um sie zur Untersuchung auf mikrobiellen Befall an ein Labor weiterzugeben.

Damit keine Zeit verloren wird, ist sodann eine rasche Breitband-Antibiotika-Therapie unumgänglich, d.h. eine empirische Therapie, die sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Organismen behandelt und lokale Resistenzen berücksichtigt – zumindest solange, bis die genauen Erregerstämme ermittelt wurden und auf eine spezifische Keim-Eradikation umgestellt werden kann. Intraperitoneale Gabe des Antibiotikums ist der intravenösen Gabe vorzuziehen. Normalerweise reagieren sensitive Keime gut auf die antimikrobielle Therapie, sodass bei milden Verläufen gar kein Spitalsaufenthalt nötig wird. Bei schwerwiegenderen Fällen kann jedoch, wie oben bereits erwähnt, eine Entfernung des Katheters und temporärer Behandlungs-Wechsel auf Hämodialyse erforderlich sein (Hunter et al., 2014; Li et al., 2010).

Nach erfolgreicher Therapie und Keim-Elimination kann erneut ein PD-Katheter an gleicher oder anderer Stelle gesetzt werden. Besonders schwere Fälle oder wiederkehrende Peritonitis machen jedoch eine neuerliche Peritonealdialyse-Behandlung unmöglich (Hunter et al., 2014).

Sowohl El-Reshaid et al. (2016) als auch Schwenger (2007) schildern, dass die Peritonitisrate bei APD generell niedriger ausfällt als bei CAPD. Dies lässt sich auf die geringere Zahl an Beutelwechseln zurückführen.

In der 10-Jahres single-center Studie von El-Reshaid et al. (2016) wird jedoch zusätzlich beschrieben, dass sich der Unterschied in der Anzahl der Peritonitiden zwischen den beiden Gruppen nicht auf das Überleben der Patienten ausgewirkt hat. Dieser Fakt stützt die Empfehlung der ISPD Guidelines (Li et al., 2016) die Entscheidung zwischen APD oder CAPD nicht aufgrund des Risikos für eine mögliche Bauchfellentzündung zu treffen.

4.5 DAS BETA LACTAM-ANTIBIOTIKUM MEROPENEM

Meropenem gehört, gemeinsam mit den drei weiteren Vertretern Imipenem, Doripenem und Ertapenem, zu einer Untergruppe der β -Lactam-Antibiotika, zur Klasse der Carbapeneme.

Die Carbapeneme werden generell als Breitspektrum-Antibiotika bezeichnet, da sie gegen sehr viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien, sowie relevante Anaerobier hoch wirksam sind.

Meropenem hat dabei im Gegensatz zu Imipenem eine deutlich höhere Wirksamkeit im Gram-negativen Bereich, auf der anderen Seite jedoch eine geringfügig schwächere Aktivität gegen Gram-positive Erreger.

Da Meropenem nicht über den Gastrointestinaltrakt resorbiert wird, steht nur die parenterale Therapie als Behandlung zur Verfügung (Aktories et al., 2017).

Spezifische Informationen über Wirkmechanismus, Pharmakodynamik und Pharmakokinetik sowie Anwendungen und Resistenzen von Meropenem können auf Seite 59 in Kapitel 7.3 nachgelesen werden.

4.5.1 MEROPENEM BEI PD-ASSOZIIERTER PERITONITIS

Eine empirische Antibiotika-Therapie bei PD-assoziiierter Peritonitis muss so schnell wie möglich nach Diagnosestellung gestartet werden. Da erst nach Erstellung eines Antibiotogramms der oder die genaue(n) Erreger bekannt sind, empfiehlt sich die initiale Gabe eines Breitspektrum-Antibiotikums, das sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Erreger erfasst – dies wird auch in den ISPD Guidelines deutlich betont. Aufgrund dieses frühzeitigen Behandlungsbeginns spricht die Mehrzahl der Peritonitiden gut auf die antimikrobielle Therapie an. Nachdem ein Erregernachweis erstellt werden konnte, kann die Behandlung entsprechend angepasst werden.

Weiters wird in den Guidelines beschrieben, dass eine i.p.-Gabe des Arzneistoffs einer i.v.-Gabe überlegen ist und deshalb vorgezogen werden soll (Geberth & Nowack, 2014; Li et al., 2016).

Meropenem stellt dabei nicht das Mittel der Wahl dar, wie nachfolgende Beispiele zeigen, da es, wie alle Carbapeneme, zwar ein Breitspektrum-Antibiotikum ist, aber zu den sogen. Reserve-Antibiotika zählt und daher nur mit besonders strenger Indikation eingesetzt werden soll. Durch gezielte Anwendung dieser Antibiotika soll die fortschreitende Entstehung von Antibiotika-resistenten Erregern eingedämmt werden (Ebenhoch & Röhr, 2020).

Entsprechend der ISPD Guidelines sollte eine Pseudomonas-assoziierte Peritonitis durch zwei Antibiotika mit verschiedenen Wirkmechanismen behandelt werden. Als Standard-Therapie wird dabei eine Kombination aus i.p. Gentamicin oder p.o. Ciprofloxacin zusammen mit i.p. Ceftazidim oder i.p. Cefepim

vorgeschlagen. Da eine durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachte Bauchfellentzündung jedoch oft sehr schwerwiegend verläuft, sollte als fundierte Alternative die Therapie mit einem Carbapenem, wie Meropenem, Imipenem oder Doripenem erwogen werden. Besonders bei Erregern mit Resistenzen gegenüber Cephalosporinen und anderen Penicillinen macht eine Behandlung mit Meropenem oder Imipenem Sinn.

Auch bei polymikrobieller Peritonitis, also einer durch mehrere, unterschiedliche Erreger ausgelösten Entzündung, wird zwar empfohlen mit einer Triple-Therapie (bestehend aus Metronidazol, Vancomycin und einem Aminoglykosid oder Ceftazidim) zu starten. Eine Monotherapie mit einem Carbapenem wie Meropenem würde sich jedoch als Alternative anbieten, insbesondere wenn die Peritonitis einer chirurgischen Ursache zugrunde liegt.

Generell wird bei der Therapie der Peritonitis eine Dosis von 1 g Meropenem pro Tag angeraten (Li et al., 2016).

In Tabelle 2 können relevante Meropenem-empfindliche Erreger nachgelesen werden.

Tabelle 2: Für PD-assoziierte Peritonitis relevante Meropenem-empfindliche Erregerstämme

Gram-positive Aerobier ¹	Gram-negative Aerobier ¹	Keime, bei denen eine erworbene Resistenz problematisch sein könnte ¹
<i>Staphylococcus aureus</i> ² <i>Staphylococcus epidermis</i> ² <i>Streptococcus</i> (β-hämolysierend) <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Proteus vulgaris</i>	<i>Enterococcus faecium</i> ³ <i>Acinetobacter</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁴

¹ Quelle: Fachinformation Fresenius-Kabi (2020)

² nur Methicillin-empfindliche Stämme

³ Resistenzrate ≥ 50 % in einem/mehreren EU-Staaten

⁴ Resistenzen variieren innerhalb der EU, örtliche Prävalenzen sind zu berücksichtigen

Wie auch de Fijter et al. (2016) bemerken, ist deutlich erkennbar, dass Meropenem momentan nicht das Mittel erster Wahl bei PD-assoziiierter Peritonitis darstellt. Allerdings fungiert es aufgrund von vermehrt auftretenden multiresistenten Bakterien (besonders im Gram-negativen Bereich) immer öfter als hochwirksame

antimikrobielle Therapie. Der Vorteil von Meropenem, im Vergleich zu anderen Carbapenemen, liegt dabei ganz klar an seinen – vergleichsweise – gering ausgeprägten zentralnervösen Nebenwirkungen.

Aufgrund des (bis dato) eher seltenen Gebrauchs von Meropenem bei der PD liegen nur äußerst limitierte Daten über seine Pharmakokinetik und Pharmakodynamik nach intraperitonealer Gabe vor – oft wurden nur Studien über einzelne, spezifische Patientenfälle publiziert.

Dies stützt die Notwendigkeit dieser Arbeit, um mit der hier ausgearbeiteten Methodik weiterführende Untersuchungen an mit Meropenem behandelten Peritonealdialyse-Patienten voranzutreiben.

4.5.1.1 Intraperitoneale Verabreichung und Kompatibilität von Meropenem mit handelsüblichen Dialyselösungen

Wie bereits in Kapitel 4.5 erwähnt, kann Meropenem aufgrund der ungenügenden Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt nur parenteral verabreicht werden. Daher bietet sich bei PD-Patienten die intraperitoneale (i.p.) Gabe an, d.h. die direkte Zugabe des Antibiotikums zur Dialyseflüssigkeit.

Vlaar et al. (2013) sowie Wiesholzer et al. (2017) zeigen auf, dass bei i.p.-Gabe im Gegensatz zur Alternative der intravenösen (i.v.) Verabreichung nicht nur höhere Wirkkonzentrationen direkt am Infektionsort erreicht werden, sondern auch für den Patienten Vorteile bringt. Da das Antibiotikum der Dialyselösung beigemischt werden kann, kann die Behandlung trotz Infektion zuhause durchgeführt werden – der Patient muss also bei langandauernder Therapie nicht zwingend für die volle Behandlungsdauer im Krankenhaus verweilen.

Außerdem muss kein zusätzlicher venöser Zugang gesetzt werden und die Gefahr, dass Antibiotika mit hohem Molekulargewicht (MG) oder starker Plasmaproteinbindung (PEB) über die perorale (p.o.) oder i.v.-Route nicht ins Peritoneum diffundieren können – und somit nicht am Wirkort ankommen – wird umgangen (Vin et al., 2009).

Diese Erkenntnis stützt auch eine Studie von Wiesholzer et al. (2016), bei der die unterschiedliche Pharmakokinetik von Meropenem nach i.v.- bzw. i.p.-Verabreichung bei Patienten mit APD untersucht wurde. Eine ausreichende Zeit-abhängige Bakterizidie konnte nach beiden Verabreichungsmodalitäten im Serum

erreicht werden, hingegen konnte nach i.v.-Gabe kein ausreichender Wirkspiegel direkt am Peritoneum nachgewiesen werden. Genaue Daten dazu sind in der einschlägigen Fachliteratur nachzulesen.

Um ebendiese intraperitoneale Behandlung zu ermöglichen, muss das angewendete Antibiotikum jedoch mit der gewünschten PD-Lösung kompatibel sein und darin, zumindest über einen gewissen Zeitraum, stabil bleiben, um wirksame Serumspiegel, und somit ausreichende Wirksamkeit zu erreichen.

Im Vorfeld ist zu beachten, dass keine allgemeingültige Aussage über die Kompatibilität von Meropenem in Dialyselösungen (DF; dialysis fluid) ausgesprochen werden kann, da die Zusammensetzung von DF stark voneinander abweichen kann und somit u.a. in ungleichen pH-Werten resultieren kann.

In Kapitel 4.3.4 auf Seite 15 wird auf die Zusammensetzung von Dialyseflüssigkeiten näher eingegangen.

Trotz aller Vorteile ist bei i.p.-Verabreichung anzumerken, dass das Arzneimittel von vielen Faktoren beeinflusst werden kann: Es muss kompatibel mit der Flüssigkeits-Zusammensetzung der DF sein, die DF muss vor Verwendung mittels einer speziellen Heizplatte auf Körpertemperatur erhitzt werden können und bestenfalls sind die PD-Beutel einige Tage lagerfähig. Auch die Beschaffenheit des Beutels kann eine Rolle beim Abbau eines Arzneistoffs spielen. All diese Umstände setzen die Stabilität des Antibiotikums in den Dialyselösungen voraus und sollen trotzdem zu ausreichenden Wirkkonzentrationen im Peritoneum führen (Vin et al., 2009).

Von Wiesholzer et al. (2017) wurde die Kompatibilität von Meropenem mit drei handelsüblichen PDFs (peritoneal dialysis fluids, Peritonealdialyse-Flüssigkeiten), Extraneal®, Physioneal® (1,36% Glucose) und Physioneal® (2,27% Glucose), unter verschiedenen Lagerungsbedingungen untersucht. Im Gegensatz zu den beiden Physioneal®-Lösungen enthält Extraneal® keine Glucose, sondern Icodextrin. Es wurde gezeigt, dass sich – im Vergleich zu deionisiertem Wasser als Referenzlösung – nur Extraneal® als kompatibel mit Meropenem erweist. Hier konnte nur eine minimal geringere Stabilität (weniger als 10%) nachgewiesen werden, sodass eine Empfehlung zur Lagerung im Kühlschrank für bis zu 7 Tage bzw. bei Raumtemperatur für maximal zwei Tage ausgesprochen werden konnte.

Bei beiden Physioneal®-Lösungen hingegen wurde, sowohl bei Raumtemperatur als auch in kühlerer Umgebung, ein deutlicher Abbau des Antibiotikums aufgezeigt, was diese Lösungen nach Meropenem-Zugabe nicht zur Lagerung befähigt.

Generelle Conclusio war nichtsdestotrotz, dass Meropenem in allen PDFs sowie im deionisierten Wasser Temperatur- und Zeit-abhängig abgebaut wird. D.h. eine mögliche Verringerung der Konzentration durch Erwärmen auf Körpertemperatur vor Verabreichung darf nicht außer Acht gelassen werden.

Zudem zeigt Kussmann et al. (2016) auf, dass in allen vier untersuchten PDFs Dianeal®, Extraneal®, Nutrineal® und Physioneal® das Bakterienwachstum gehemmt werden konnte, wobei sich die antimikrobielle Wirkung aller getesteten Antibiotika im Verlauf der Messungen vermindert hat. Für Meropenem konnte dabei jedoch in keiner der Dialyselösungen ein deutlicher bakterizider Effekt nachgewiesen werden. Zu beachten ist dabei, dass der bakteriostatische Effekt der Dialyselösungen an sich die antimikrobielle Aktivität von Zeit-abhängigen Antibiotika wie Meropenem herabsetzen könnte.

Auch dieses Beispiel zeigt, dass die Wahl der Dialyselösung einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität von Meropenem hat und so den Krankheitsverlauf entscheidend mitbestimmen kann.

Abschließend ist zu sagen, dass bei jedem PD-assoziierten Peritonitis-Fall individuell entschieden werden muss, ob eine Therapie mit Meropenem angebracht bzw. sinnvoll ist. Aufgrund unterschiedlicher Stabilität von Meropenem in PDFs ist die Wahl der Dialyselösung maßgeblich an der Wirksamkeit der antibiotischen Therapie beteiligt und kann so den Therapieerfolg u.U. auch negativ beeinflussen.

Die Datenlage dahingehend ist jedoch immer noch gering, weshalb weitere Studien und Forschung nötig sind, um gesicherte Informationen zu generieren.

5 ARBEITSVERLAUF & ERGEBNISSE

Um eine möglichst selektive und sensitive Quantifizierung von Meropenem in den nachfolgenden Proben sicherzustellen, mussten die Parameter der verwendeten Geräte, HPLC und MS/MS, optimiert werden. Zu aller Erst wurde dafür eine wässrige Meropenem-Lösung mit bekannter Konzentration (1 ng/mL) hergestellt, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messmethode zu gewährleisten. Da diese Arbeit die Verwendung von Doripenem als internen Standard (I.S) vorschlägt, mussten diese Bedingungen auch für Doripenem angepasst werden und gleichsam mit einer wässrigen Doripenem-Lösung mit bekannter Konzentration eruiert werden.

Erst danach konnte eine konkrete Quantifizierungsmethode erarbeitet und ebendiese validiert werden. Es galt zu klären, ob die ausgewählten Parameter zu reproduzierbaren Ergebnissen führen und sich schlussendlich als präzise Methode für tiefergehende Meropenem-Untersuchungen, wie zur Feststellung von Meropenem-Konzentrationen in Serum- sowie Dialysat-Proben von Peritonealdialyse-Patienten, eignen.

5.1 METHODENOPTIMIERUNG

Da die Proben zuerst eine HPLC-Trennung durchlaufen und danach im Triple-Quadrupol-MS quantifiziert werden, musste eine Optimierung für beide Geräte vorgenommen werden.

In vorliegender Arbeit wird zur Quantifizierung von Meropenem sowohl ein externer Standard als auch ein interner Standard (Doripenem, siehe Kapitel 5.2.1) verwendet, weshalb die Methode auch für Doripenem angepasst werden musste.

Näheres zu den Geräten HPLC und MS kann in Kapitel 7.1 bzw. 7.2 nachgelesen werden.

Eine Auflistung der verwendeten Materialien findet sich in Kapitel 7.4.

5.1.1 OPTIMIERUNG DER HPLC-PARAMETER

Das Ziel einer Optimierung der HPLC-Parameter ist die möglichst gute Reproduzierbarkeit der Auftrennung mit schmalen, gut voneinander getrennten Peaks bei tunlichst kurzer Retentionszeit.

Für eine Messung werden 5 µL der Probe aufgezogen und auf die Trennsäule aufgebracht. Zur optimalen Analyse wird als Säule eine Acclaim™ 120 C18 (3 µm, 120 Å, 2,1x150 mm, Thermo Fisher Scientific) verwendet, die sich im auf 25 °C temperierten Säulenofen befindet.

Da im Verlauf der Optimierung festgestellt wurde, dass der Analyt in wässriger Lösung bei Raumtemperatur nicht stabil bleibt, wurde die Temperatur des Autosamplers auf 5 °C reduziert, um die Stabilität von Meropenem und des I.S. bis zum Beginn der Messungen zu gewährleisten.

Die mobile Phase wurde auf eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min optimiert und besteht aus 2 Fließmittel-Gemischen: Lösungsmittel A ist zusammengesetzt aus bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.) + 0,1% Ameisensäure (HCOOH) und Lösungsmittel B besteht aus Acetonitril (MeCN) + 0,1% Ameisensäure.

Der Fließmittel-Zusatz von Ameisensäure ist üblich, um den pH-Wert der Mischung zu stabilisieren und in der ESI-MS-Kopplung höhere Ionenintensitäten zu zeigen (Zonaras et al., 2016).

Um eine zeitnahe Elution des Analyten Meropenem und des internen Standards Doripenem zu ermöglichen sowie eine gute Trennung der beiden Peaks zu erreichen, fiel die Entscheidung auf eine Gradientenelution mit folgender Fließmittel-Zusammensetzung (Tabelle 3):

Tabelle 3: Fließmittelzusammensetzung bei Gradientenelution

Fließgeschwindigkeit	A: Aqua bidest. + HCOOH [%]	B: Acetonitril + HCOOH [%]	Zeit [min]
0,5 mL/min	95	5	0,0
	75	25	7,5
	10	90	7,6
	10	90	10,0
	95	5	10,1
	95	5	15,0

In der Tabelle oben sowie in Abbildung 4 ist ersichtlich, dass es sich um einen „Multi-Step Gradienten“ handelt, d.h. eine kontinuierliche Veränderung der Zusammensetzung des Fließmittels.

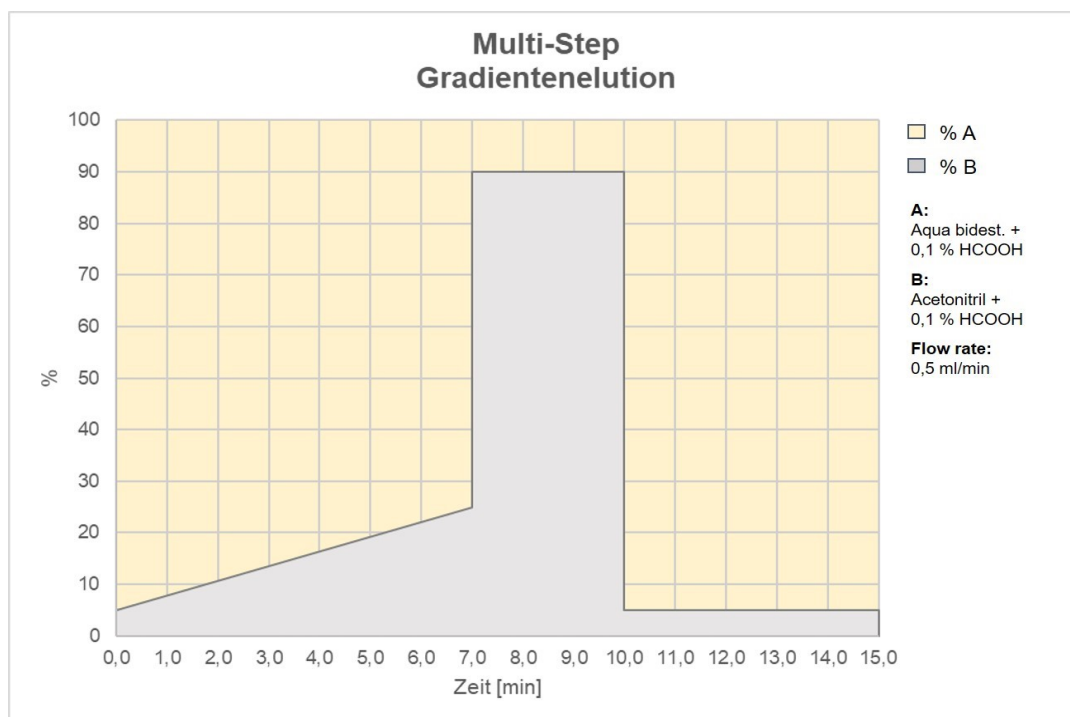


Abbildung 4: Gradientenelution - Änderung der Fließmittelzusammensetzung

Dadurch kann eine Retentionszeit von rund 3,8 Minuten für Doripenem und rund 5,0 Minuten für Meropenem erreicht werden, wobei beide Substanzen eine Peak-Breite von ca. 0,3 min aufweisen. Die gesamte Analysendauer beträgt 15 Minuten, dabei ist das Equilibrieren des Systems von Minute 10,1 bis Minute 15,0 inkludiert.

5.1.2 OPTIMIERUNG DER MS-PARAMETER

Für die Optimierung der MS-Parameter musste zuerst eine wässrige Meropenem-Lösung mit bekannter Konzentration (*hier*: 1 ng/mL) hergestellt werden.

Diese wurde mithilfe einer halbautomatischen Pumpenspritze direkt in die Ionenquelle (ESI, Elektrospray-Ionisation, siehe Kapitel 7.2.1) des Massenspektrometers injiziert. Hier werden aus der injizierten Substanz – durch eine mit Spannung (5,5 kV) angelegte Kapillare und durch Heizstäbe mit Temperaturen von 500 °C – Ionen gebildet.

Die entstandenen Ionen werden durch den Triple-Quadrupol, bestehend aus drei hintereinander geschalteten Quadrupolen, geleitet. Mithilfe des Software-Modus zur automatischen Substanzoptimierung werden die Geräteparameter laufend verändert und gleichzeitig Massenspektren aufgenommen, um schließlich die optimalen Parameter zur selektiven und sensitiven Quantifizierung von Meropenem zu erhalten. Diese Methode (MRM – multiple reaction monitoring, siehe unten auf S. 30) soll aus Precursor-Ionen spezifische Produkt-Ionen generieren, um möglichst intensive Peaks im Massenspektrum detektieren zu können.

Die Substanzoptimierung wurde sowohl im negativen Modus, bei welchem negative Ionen entstehen, als auch im positiven Modus durchgeführt, welcher zu positiven Ionen führt. Da der Positiv-Modus durch die Protonierung des Stickstoffs von Meropenem eine bessere Empfindlichkeit zeigte, wurde dieser für alle weiteren Versuche dieser Arbeit ausgewählt.

Dadurch ergeben sich für die Optimierung des MS folgende Parameter:

ESI pos., CAD 4.0, GS1 40.0, GS2 40.0, CUR 10.0, IS 5500, TEM 500 °C, Quantifier – DP 71, CE 21, CXP 24, Qualifier – DP 71, CE 41, CXP 10, dwell je 150 msec, CEM 3000, DF -100

Die durch das MRM ermittelten Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) von Meropenem lauten:

Precursor-Ion: $m/z = 384,3$ Da $[M+H]^+$

Produkt-Ionen: $m/z = 141,2$ Da („Quantifier“) und
 $m/z = 114,0$ Da („Qualifier“)

Für die als internen Standard verwendete Substanz Doripenem wurde in ebengleicher Methodik eine Optimierung der Geräteparameter durchgeführt.

Dies führte zu folgenden, optimierten Ionen:

Precursor-Ion: $m/z = 421,2$ Da $[M+H]^+$

Produkt-Ionen: $m/z = 273,9$ Da („Quantifier“) und
 $m/z = 111,9$ Da („Qualifier“)

5.1.2.1 MRM – Multiple Reaction Monitoring

Wie bereits oben besprochen, handelt es sich beim verwendeten Massenspektrometer um einen Triple-Quadrupol, also um drei hintereinander geschaltete Quadrupole.

Im ersten Quadrupol (Q1) wird, wie in Abbildung 5 ersichtlich, das Precursor- oder Vorläufer-Ion, d.h. das spezifische Quasimolekölion $[M+H]^+$ einer bekannten Verbindung wie Meropenem oder Doripenem, selektiert. Dieser spezielle Modus des MRM zur Selektion von einzelnen Ionen wird auch als Single Ion Monitoring (SIM) bezeichnet und wird hier im Q1 sowie im Q3 (siehe unten) angewendet.

Durch die in Kapitel 5.1.2 beschriebene Geräte-Optimierung unter Verwendung einer wässrigen Meropenem- bzw. Doripenem-Lösung kann danach nur das speziell ausgewählte Precursor-Ion in den zweiten Quadrupol (Q2) vordringen.

In dieser sogen. Kollisionszelle oder collision chamber wird das selektierte Ion mittels hochbeschleunigten Stickstoffs (gasförmig) in kleinere Teilchen fragmentiert.

Die „Bruchstücke“, die durch diese Fragmentierung entstehen, werden als Product Ions (Produkt-Ionen) bezeichnet. Bei bestimmten, gleichbleibenden Einstellungen läuft diese Fragmentierung immer gleich ab, d.h. aus dem gleichen, selektierten Vorläufer-Ion resultieren die immer gleichen Produkt-Ionen.

Der dritte Quadrupol (Q3) wird, wie auch der erste, als Massenfilter zur Selektion genutzt, wobei nun die im Q2 gebildeten Produkt-Ionen gescannt und durch Einstellung eines bestimmten Massenbereichs selektiert werden. Alle anderen Ionen, die nicht in diesen spezifischen Bereich fallen, werden ignoriert.

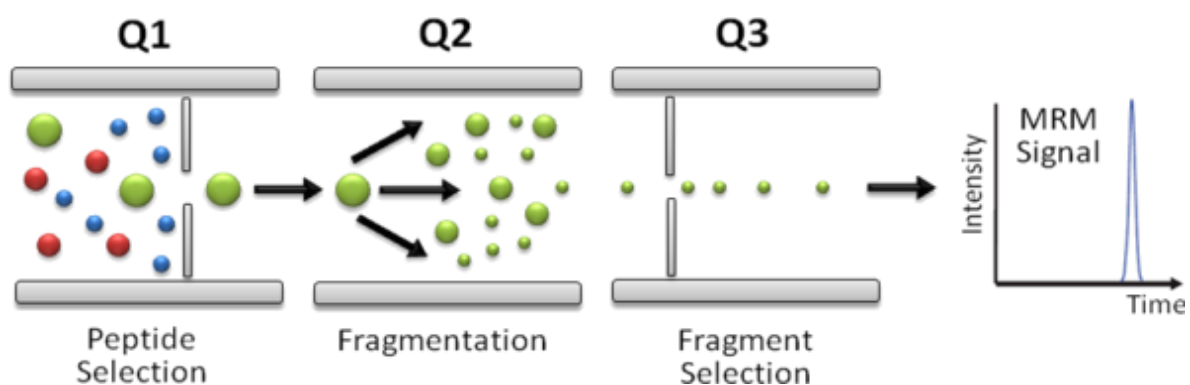


Abbildung 5: Prinzip MRM [Grafik]

Quelle: <http://www.inf.fu-berlin.de/lehre/WS14/ProteomicsWS14/LUS/lu6a/345/index.html>,
abgerufen am 15.02.2021

Ebendiese besonders sensitive und selektive Technik wird Multiple Reaction Monitoring (MRM) genannt und ist oben schematisch dargestellt.

Um nun Meropenem bzw. Doripenem selektiv nachzuweisen, mussten die spezifischen Precursor- und Produkt-Ionen, wie in Kapitel 5.1.2 auf S. 28 dargelegt, durch Optimierung der Geräteparameter selektioniert werden.

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis des MRM-Experiments des Precursor-Ions von Meropenem ($m/z = 384,3$ Da), bei welchem mehrere gebildete Fragmente zu erkennen sind. Jedoch nur die beiden markierten ($m/z = 141,2$ Da, sowie $m/z = 114,0$ Da) sind aufgrund ihrer Intensität für die Bestimmung essentiell.

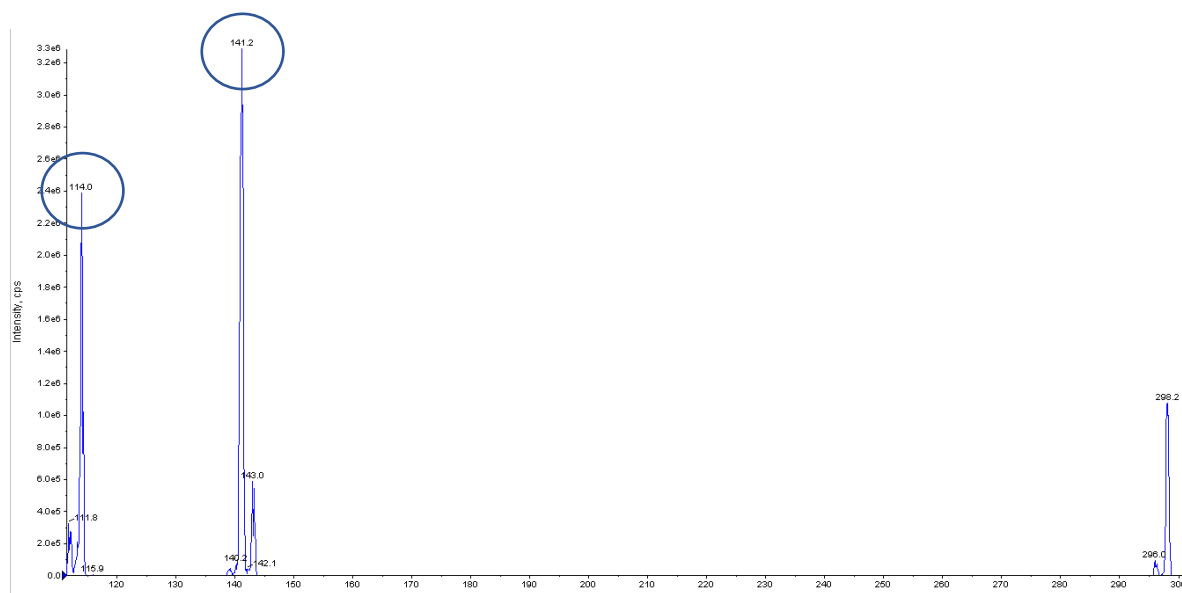


Abbildung 6: MCA Scans von Meropenem

Das Fragment mit der höchsten Intensität wird Quantifier genannt, da es zur Quantifizierung der gesuchten Substanz herangezogen wird. Im Falle von Meropenem hat der Quantifier ein m/z von 141,2 Da. Das Fragment mit der zweithöchsten Intensität wird als Qualifier bezeichnet und zeigt hier ein m/z von 114,0 Da. Der Qualifier eines gesuchten Moleküls muss detektiert werden, um sicherzustellen, dass der gefundene Quantifier auch tatsächlich vom zu untersuchenden Molekül stammt.

Denn nur jene Peaks, die sowohl Quantifier als auch Qualifier im Diagramm beinhalten, können für die endgültige Bestimmung von Meropenem durch Ermittlung der AUC (area under the curve) verwendet werden.

In Abbildung 7 ist der Peak von Meropenem zu erkennen, der sowohl Quantifier (blau) als auch Qualifier (rot) aufweist.

Da die vorliegende Arbeit Doripenem als internen Standard verwendet, ist der Abbildung 7 ebenso der Peak von Doripenem zu entnehmen, bei welchem die typischen Fragment-Ionen in grün (Quantifier) bzw. grau (Qualifier) dargestellt sind.

Des Weiteren ist in untenstehender Darstellung die – durch die Optimierung der HPLC/MS-Bedingungen erreichte – gute Trennung der Peaks von Meropenem (MP) und des internen Standards zu erkennen. Außerdem werden die Retentionszeiten von ungefähr 3,8 Minuten für Doripenem (DP) und 5,0 Minuten für Meropenem gezeigt, welche eine gute Unterscheidung der beiden Substanzen erlauben, jedoch keine langdauernde Messung erfordern.

Die unterschiedliche Höhe der beiden Peaks ergibt sich aus der unterschiedlichen Sensitivität der Messung bei verschiedenen Substanzen (Konzentrationen: 2248,5 ng/mL MP und 2541,0 ng/mL DP).

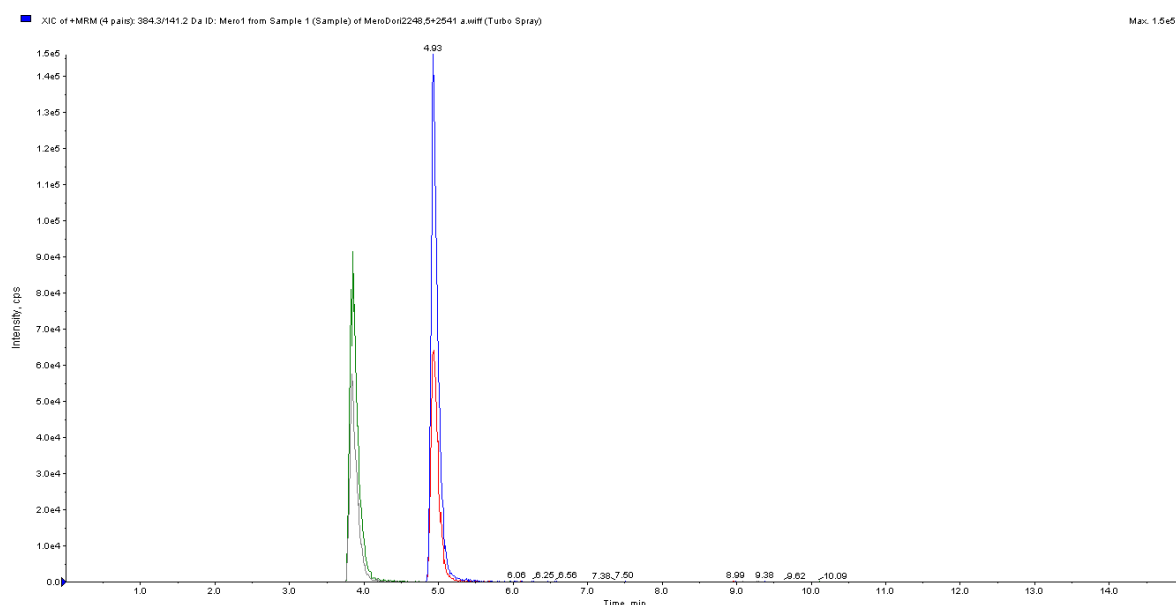


Abbildung 7: Produktionen von Meropenem und Doripenem: Quantifier (blau bzw. grün) und Qualifier (rot bzw. grau)

5.2 DIE QUANTIFIZIERUNGSMETHODE

Diese Arbeit schlägt zur Quantifizierung von Meropenem eine Kombination zweier Methoden vor, um eine höhere Genauigkeit zu erzielen und systemische Fehler mit Sicherheit auszuschließen.

Zum einen wird mithilfe des externen Standards Meropenem eine Eichgerade erstellt, als zweite Methode wurde mit Doripenem ein interner Standard (I.S.) verwendet, der ebenso zur Erstellung der Eichgerade benötigt wird.

Der Grund für die Verwendung beider Quantifizierungsmethoden ist die Instabilität des Analyten im Lösungsmittel (LM). Es wurde über die Dauer der Versuchsreihe festgestellt, dass Meropenem weder in wässriger Lösung (Aqua bidest.), noch als Lösung in Methanol über den Zeitraum der Messungen (max. 12 Stunden) stabil bleibt. Der Grund für den Abbau wurde nicht näher untersucht.

Dies steht nicht unbedingt in Einklang mit den Untersuchungen von Wiesholzer et al. (2017), die zwar ebenso einen Abbau von Meropenem in wässriger Lösung bei Raumtemperatur feststellen konnten, jedoch eine derartig starke Verminderung der Konzentration ($> 15\%$) erst nach zumindest 3 Tagen nachweisen konnten. Allerdings wurde, wie bereits in Kapitel 4.5.1.1 erläutert, ebenso in bestimmten Dialyselösungen ein Abbau des Antibiotikums aufgezeigt, was an der Zusammensetzung der einzelnen Lösungen liegen könnte. Das bedeutet, Meropenem reagiert offensichtlich in Abhängigkeit weiterer Inhaltsstoffe einer wässrigen Lösung unterschiedlich.

Dieser Fakt unterstreicht die Durchführung der Quantifizierung mittels Eichgerade und zugesetztem I.S., um Fehler aufgrund Zeit-abhängigen Abbaus von Beginn an ausschließen zu können.

Die genaue Vorgehensweise zum Erreichen einer reproduzierbaren Eichgerade kann in den folgenden Kapiteln 5.2.1 und 5.2.2 nachgelesen werden.

5.2.1 INTERNER STANDARD

Der Einsatz eines internen Standards wird grundsätzlich dann nötig, wenn systemische Fehler nicht zu vernachlässigen sind. Das bedeutet allen zu analysierenden Proben wird gleichsam eine bekannte Konzentration an I.S. zugesetzt, um über die gesamte Analysendauer exakt gleiche Bedingungen für Analyt und I.S. zu schaffen.

Der I.S. sollte dabei ähnliche physikochemische Eigenschaften vorweisen, nicht in der Probe selbst vorkommen und neben dem Analyten bestimmbar sein (Thiele et al., 1999-2016).

Um den systemischen Fehler der beschriebenen Zeit-abhängigen Konzentrationsverminderung von Meropenem möglichst genau nachweisen zu können, benötigt es daher eine dem Analyten besonders ähnliche Substanz. Diese wird der Versuchslösung immer in gleicher Konzentration beigemischt, wodurch der Abbau über die Dauer der Messungen veranschaulicht werden kann.

Es liegt nahe, dabei einen weiteren antibiotisch wirksamen Vertreter der Carbapenem-Familie wie z.B. Doripenem auszuwählen.

Im direkten Vergleich kann man in den Abbildungen oben erkennen, dass sich Doripenem von Meropenem durch eine zusätzliche Sulfonamid-Gruppe am Pyrrolidin-Ring des Moleküls unterscheidet und sich somit optimal als interner Standard eignet.

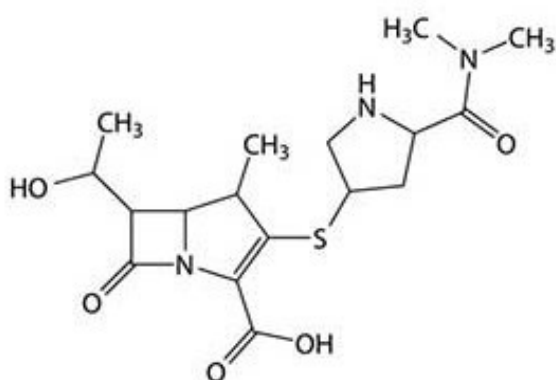


Abbildung 8: Struktur Meropenem [Grafik],
Quelle: [https://www.gelbe-](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme)
[liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme,](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme)
abgerufen am: 16.02.2021

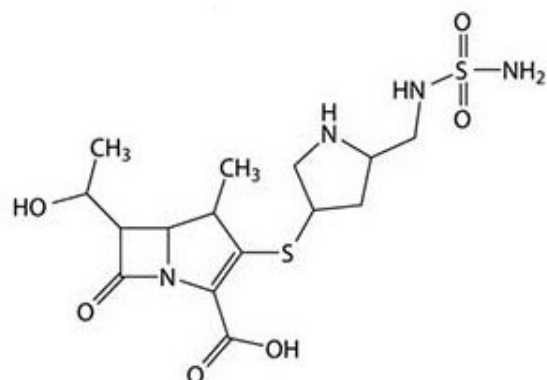


Abbildung 9: Struktur Doripenem [Grafik],
Quelle: [https://www.gelbe-](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme)
[liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme,](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme)
abgerufen am: 16.02.2021

Um anfangs zu erfahren, wie sich Doripenem bei der Messung verhält und um alle Geräte-Parameter zu optimieren, wurde, wie in Kapitel 5.1 (Methodenoptimierung), eine wässrige Doripenem-Lösung mit bekannter Konzentration ins System eingebracht und mehrmals vermessen. Es stellte sich heraus, dass sich – ebenso wie Meropenem – auch Doripenem nicht stabil im Lösungsmittel verhält.

Um nach dieser Erkenntnis den Abbau der beiden Carbapeneme direkt zu vergleichen, wurde sodann ein Gemisch mit bekannten Konzentrationen an Doripenem und Meropenem in bidestilliertem Wasser hergestellt und vermessen. Die Temperatur des Autosamplers, in welchem sich die mit Probelösungen befüllten Vials befinden, wurde auf 5 °C reduziert, um sofortigem Abbau, noch vor dem Start der Analyse, vorzubeugen.

Nach der Analyse und Auswertung der Daten durch einen Vergleich der Peakflächen zeigte sich, dass Meropenem und Doripenem eine nahezu gleich verlaufende Konzentrationsabnahme aufweisen.

In Tabelle 4 sind die genauen Daten der Zeit-abhängigen prozentualen Abnahme, inkl. verwendeter Konzentrationen und gemessener Peakflächen nachzulesen.

Tabelle 4: Vergleich der prozentualen Abnahme der Konzentration (Meropenem/Doripenem)

	Meropenem			Doripenem		
Zeit [min]	C [ng/mL] ¹	Peakfläche MW ²	Abnahme [%] ³	C [ng/mL] ¹	Peakfläche MW ²	Abnahme [%] ³
0	91,2	1,57E+05	100	111,0	8,63E+04	100
45	91,2	1,35E+05	86	111,0	7,58E+04	88
90	91,2	1,21E+05	77	111,0	6,56E+04	76
135	91,2	1,11E+05	71	111,0	5,85E+04	68
180	91,2	1,04E+05	66	111,0	5,55E+04	64
225	91,2	9,98E+04	63	111,0	5,32E+04	62
270	91,2	9,56E+04	61	111,0	5,05E+04	59

¹ C [ng/mL] gibt die Konzentration der vermessenen Lösung an

² MW gibt den Mittelwert der Peakfläche aus je 3 hintereinander folgenden Messungen der gleichen Probe an, „1,57E+05“ bedeutet dabei $1,57 \cdot 10^5 = 157000$

³ Abnahme [%] gibt die prozentuale Abnahme der Peakflächen-Größe an

Die angegebenen Zahlenwerte sind gerundet; die Berechnung erfolgte mit den exakten Werten.

Aus diesem Grund ist es möglich, mithilfe des I.S., weiters auch eine externe Eichgerade zu generieren. Die genaue Beschreibung der dazugehörigen Herangehensweise wird in nachfolgendem Kapitel 5.2.2 erläutert.

5.2.2 EICHGERADE

Grundsätzlich muss, um eine externe Eichgerade zu erstellen, zunächst eine Lösung des Analyten mit bekannter Konzentration hergestellt werden. Diese sogen. Stammlösung wird verdünnt, sodass mehrere, unterschiedliche Konzentrationen vermessen und analysiert werden können. Danach kann mithilfe eines Graphs die Konzentration gegen die ermittelte Peakfläche aufgetragen werden und resultiert – bestenfalls – in einer linearen Funktion (Gerade).

In vorliegender Arbeit wurde jede Probenlösung dreifach vermessen und daraus der Mittelwert berechnet, um mögliche Ausreißer identifizieren und ausschließen zu können.

Aufgrund des in vorherigen Versuchen nachgewiesenen Abbaus von Meropenem in Lösung musste dabei eine neue Methodik mithilfe eines Korrekturfaktors erarbeitet werden.

Zur Erstellung der Eichgerade wurden ausgehend von einer Stammlösung fünf Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Meropenem hergestellt und diesen jeweils die gleiche, spezifische Menge an Doripenem (I.S.) zugefügt. Anhand der stets gleichen Konzentration des I.S. kann mit den durch die Analyse erhaltenen Peakflächen ein Korrekturfaktor (KF) errechnet werden. Indem der Mittelwert der von der ersten Dreifach-Messung erhaltenen Peakfläche als 100% angesehen wird, können für alle weiteren, durch den Abbau verringerten, Peakflächen jeweils Faktoren errechnet werden, die den Abbau „kompensieren“ und so auf die ursprüngliche Peakfläche nivellieren.

Ein Ausschnitt einer Analyse wird dazu als Beispiel in Tabelle 5 (S. 37) dargestellt. Eine Demonstration für die Korrektur der Peakfläche von Meropenem wird in darauffolgender Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 5: Berechneter Korrekturfaktor mittels internen Standards Doripenem¹

Zeit [min]	Proben-Vial	C [ng/mL]	Peakfläche ²	Peakfläche MW	KF
0	1	518	1,39E+005	1,39E+005	0,9976
15	1	518	1,42E+005		0,9765
30	1	518	1,35E+005		1,0272
45	2	518	1,37E+005	1,33E+005	1,0122
60	2	518	1,30E+005		1,0667
75	2	518	1,31E+005		1,0585
90	3	518	1,24E+005	1,26E+005	1,1183
105	3	518	1,27E+005		1,0919
120	3	518	1,27E+005		1,0919

¹ Die hier dargestellten Werte stellen nur einen Auszug aller gemessenen Daten dar. Der komplette Datensatz kann im Anhang eingesehen werden.

² Die Angabe „1,39E+005“ bedeutet dabei $1,39 \cdot 10^5 = 139000$

Die angegebenen Zahlenwerte sind gerundet; die Berechnung erfolgte mit den exakten Werten.

Anhand dieser Korrekturfaktoren kann nun durch Vergleich mit den erhaltenen Peakflächen von Meropenem eine „korrigierte Peakfläche“ errechnet werden, indem die gemessene Peakfläche mit dem jeweils ermittelten Korrekturfaktor multipliziert wird.

So kann auf rechnerischem Weg auf die ursprünglich vorhandene Konzentration von Meropenem geschlossen werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Korrigierte Peakfläche von Meropenem¹

Zeit [min]	Proben-Vial	C [ng/mL]	Gemessene Peakfläche ²	KF (I.S.)	Korrigierte Peakfläche
0	1	0,05	2,36E+001	0,9976	2,35E+001
15	1	0,05	2,60E+000	0,9765	2,54E+000
30	1	0,05	6,53E+001	1,0272	6,71E+001
45	2	0,47	1,51E+001	1,0122	1,53E+001
60	2	0,47	1,04E+001	1,0667	1,11E+001
75	2	0,47	1,43E+001	1,0585	1,51E+001
90	3	4,65	6,82E+002	1,1183	7,63E+002
105	3	4,65	1,18E+003	1,0919	1,29E+003
120	3	4,65	9,30E+002	1,0919	1,02E+003

¹ Die hier dargestellten Werte stellen nur einen Auszug aller gemessenen Daten dar. Der komplette Datensatz kann im Anhang eingesehen werden.

² Die Angabe „2,36E+001“ bedeutet dabei $2,36 \cdot 10^1 = 2,36$

Die angegebenen Zahlenwerte sind gerundet; die Berechnung erfolgte mit den exakten Werten.

Die so ermittelten Peakflächen können dann in einem Graph gegen die bekannten Konzentrationen an Meropenem [ng/mL] in den Proben aufgetragen werden. Somit wird eine externe Eichgerade erhalten, welche auch für weitere Messungen nicht ihre Gültigkeit verliert.

Bei vorliegender Arbeit ergab sich durch die beschriebene Vorgehensweise eine lineare Eichgerade mit der Geraden-Gleichung $y = 278,56x + 4384,5$ und einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9998$.

Die erhaltene Gerade ist in Abbildung 10 dargestellt.

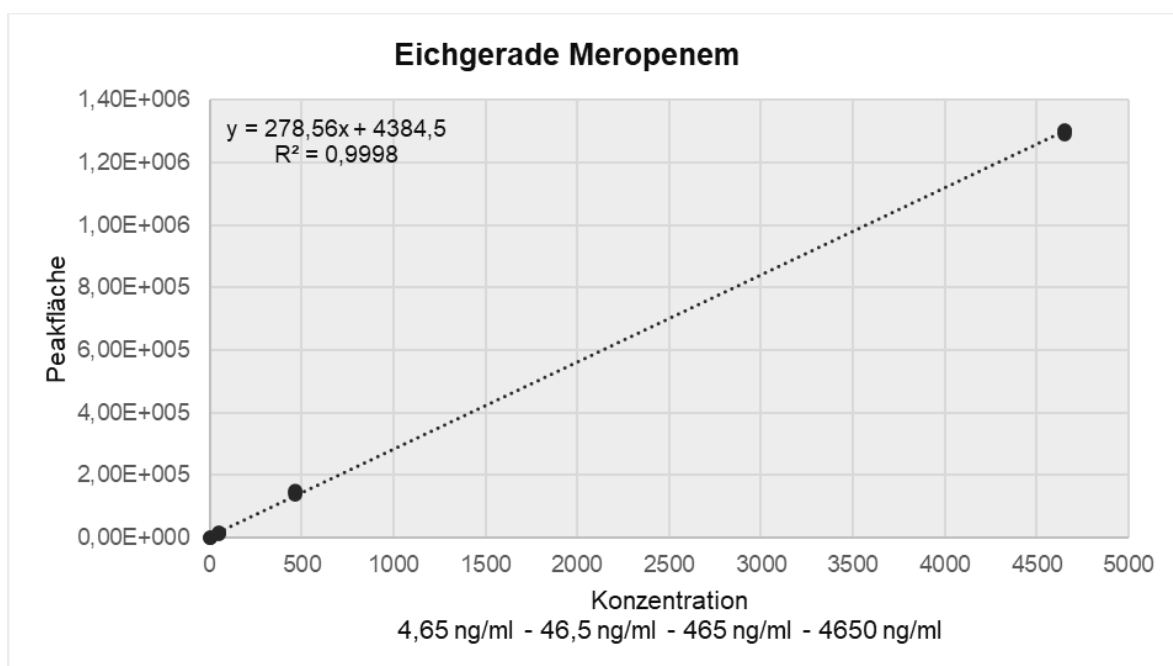


Abbildung 10: Eichgerade von Meropenem

Bei nachfolgenden Analysen von tatsächlichen Patientenproben kann auf Basis dieser Methode sowohl mit Doripenem als internem Standard als auch mit der externen Eichgerade von Meropenem gearbeitet werden, um die korrekten Antibiotika-Konzentrationen zu ermitteln.

5.3 VERIFIZIERUNG

Um die in Kapitel 5.2 erläuterte Quantifizierungsmethode zu verifizieren, wurden weitere, unabhängige Messungen durchgeführt. Die Verwendung oben gezeigter Eichgerade wird durch die Übereinstimmung der erhaltenen Daten gesichert und belegt somit, dass der Methodik allgemeine Richtigkeit zugeschrieben werden kann.

Hierbei wurden weitere wässrige Meropenem-Lösungen mit verschiedenen, bekannten Konzentrationen hergestellt und der interne Standard zugesetzt.

Durch Berechnung (siehe oben) werden die Peakflächen korrigiert und sollen dann mit den Werten der dargestellten Eichgerade korrelieren.

Ein Beispiel dazu ist unten angeführt.

Tabelle 7: Verifizierung der Eichgerade mithilfe unabhängiger Meropenem-Analyse und Berechnung

Zeit [min]	Proben-Vial	MP C [ng/mL]	Korrigierte Peakfläche ¹
135	4	214	7,06E+004
150	4	214	6,87E+004
165	4	214	6,43E+004

¹ Bei den angegebenen Zahlenwerten handelt es sich um gerundete Werte; die Berechnung erfolgte mit den exakten Werten.

Berechnung durch die ermittelte Geradengleichung:

$$y = 278,56x + 4384,5$$

$$x = (y - 4384,5) / 278,56$$

$$x = (64267,01 - 4384,5) / 278,56$$

$$x = \underline{\underline{214,9}}$$

Der errechnete x-Wert stimmt mit bekannter Konzentration von MP (214 ng/mL) überein.

5.4 PROBENAUFARBEITUNG MIT KÜNSTLICHEM PLASMA

Da alle vorangegangenen Messungen ausschließlich in wässriger Lösung stattfanden und dies nur bedingt die Realität darstellt, sollte die entwickelte Quantifizierungsmethode auch auf Basis von künstlichem Plasma validiert werden. Dies sollte praxisnahe Gegebenheiten schaffen, die einen konkreten Vergleich zu tatsächlichen Serum- bzw. Dialysatproben von Peritonealdialyse-Patienten erlauben und die Methode für spätere Patientenproben-Untersuchungen stichhaltig machen.

Hierfür wurde das im Kühlschrank aufbewahrte, pulverförmige Kunst-Plasma vor Verwendung mit entkalktem Wasser versetzt und bis zur kompletten Auflösung geschüttelt, sodass eine klare, gelbliche Flüssigkeit entstand. Diese wurde in sog. Eppendorf Reaktionsgefäße („Eppis“) überführt.

Definierte Mengen mit verschiedenen Konzentrationen an Meropenem wurden gemeinsam mit einer für jede Probe gleichbleibenden Konzentration an I.S. dem künstlichen Plasma zugefügt.

Zur Testung, welches organische Lösungsmittel sich besser zur Proteinpräzipitation eignet, wurde eine Testreihe 1:2 mit Methanol sowie eine weitere Testreihe 1:2 mit Acetonitril versetzt und sodann mittels Vortex gut durchgemischt.

Mit beiden Lösungsmitteln wurde eine deutliche Trübung sichtbar, welche die erfolgreiche Ausfällung der – bei der Analyse unerwünschten – Proteine anzeigt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in der Zentrifuge bei 15 000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert, damit sich alle ausgefallenen Bestandteile am Boden bzw. in der Spitze des Gefäßes absetzen.

Der Überstand der verschiedenen Lösungen wurde für die Analyse in Vials überführt und zeigte sich bei den Methanol-Lösungen immer noch deutlich trüb, bei den Acetonitril-Lösungen hingegen klar.

Die Vermessungen hätten sodann starten sollen, jedoch konnten diese aufgrund von technischen Problemen des MS nicht durchgeführt werden.

Dieses Experiment gilt es daher zu wiederholen.

6 DISKUSSION

Die Basis für diese Arbeit beruht auf der Annahme, dass das Breitspektrum-Antibiotikum Meropenem nach intraperitonealer Gabe bei PD-Patienten ausreichend hohe Serumspiegel erzielt, um eine initiale Therapie bei bakterieller Infektion zu ermöglichen. Des Weiteren soll die Gabe von Meropenem als Prophylaxe gegen sensitive Erreger eine Infektion verhindern, um die Gefahr einer möglichen, daraus resultierenden Peritonitis zu minimieren. Dazu muss eine Methode ausgearbeitet werden, welche Meropenem in Lösung möglichst selektiv und sensitiv nachweist.

Wie auch W. L. Salzer (2018) und Schwenger (2007) feststellen, sollte – neben intensivem Patiententraining hinsichtlich der Implantat-Pflege und Hygiene – besonders vor der Katheter-Implantation sowie vor intraabdominellen Untersuchungen, Koloskopien, Hysteroskopien oder anderen invasiven Eingriffen im gastrointestinalen Bereich die prophylaktische Gabe eines Antibiotikums erwogen werden, um das Risiko einer möglichen Peritonitis zu senken.

Aufgrund einer von Land zu Land unterschiedlichen bakteriellen Antibiotika-Resistenzrate, sollte allerdings mit der prophylaktischen Antibiotika-Gabe nicht leichtfertig umgegangen werden und die mögliche Häufung von lokalen Resistenzen bei jeder Therapie-Entscheidung miteinbezogen werden (BASG-Arzneispezialitätenregister, 2017).

Da es sich bei Meropenem um ein semisynthetisches β -Lactam-Antibiotikum mit besonders breitem Spektrum handelt – es deckt sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien, wie auch Anaerobier ab – empfiehlt sich Meropenem als empirische Initial-Therapie bei noch nicht genau ermittelter Erregerkultur. Eine wirksame Therapie kann sofort gestartet werden und gravierende Folgen können – im besten Fall – vermieden werden (Baldwin et al., 2008; Fish & Singletary, 1997).

In Kapitel 4.5.1 wird auf die Meropenem-empfindlichen Erreger näher eingegangen, sie umfassen unter anderem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* ssp. sowie *Pseudomonas aeruginosa* (BASG-Arzneispezialitätenregister, 2017).

Da Peritonitis nach wie vor eine der schwerwiegendsten Komplikationen bei Peritonealdialyse-Patienten darstellt, muss diese mittels Antibiotika-Verabreichung tunlichst verhindert werden.

Aus diesem Grund hat die vorliegende Arbeit zum Ziel, eine Methode zur Quantifizierung von Meropenem in Serumproben zu entwickeln, um nachfolgende Untersuchungen an Patientenproben zu erleichtern und die weitere Forschung für Peritonealdialyse-Patienten zu unterstützen. Schlussendlich gilt es herauszufinden, ob sich Meropenem auch für die intraperitoneale Gabe eignet, damit den bereits durch Infektion geschwächten Patienten ein intravenöser Zugang im klinischen Setting „erspart“ werden kann und somit Patienten auch zuhause, in gewohnter Umgebung, weiter behandelt werden können. Die Datenlage bezüglich schon erfolgter Untersuchungen nach intraperitonealer Verabreichung von Meropenem bei dieser speziellen Patientengruppe ist gering.

Mithilfe eines internen Standards (Doripenem) und durch die Erstellung einer externen Eichgerade konnte dabei eine besonders empfindliche und spezifische Nachweismethode für Meropenem in Lösung erarbeitet werden.

Das aufgetretene Problem des Abbaus von Meropenem und Doripenem in wässriger Lösung konnte mithilfe des internen Standards gelöst werden, indem eine rechnerische Methode zur Generierung der Eichgerade ausgearbeitet wurde. Der Grund für diese Zeit-abhängige Konzentrationsverminderung bleibt nach wie vor unklar, insbesondere in Hinblick auf die kontroversen Ergebnisse, auf welche Wiesholzer et al. (2017) bei der Untersuchung von Meropenem in verschiedenen PD-Dialyselösungen stieß. Die Zusammensetzung der jeweiligen Lösungsflüssigkeit scheint dabei allerdings eine entscheidende Rolle zu spielen.

Nichtsdestotrotz ist die entwickelte Methode vielfältig anwendbar und schließt einen Fehler durch ebensolchen Abbau, aber auch anderer Gründe, von vornherein aus.

Anzumerken gilt es jedoch, dass der unvollendete Quantifizierungsversuch von Meropenem in künstlichem Plasma nachgeholt werden muss, da er in vorliegender Arbeit aufgrund von technischen Problemen des Massenspektrometers nicht korrekt durchgeführt werden konnte und daher keine Ergebnisse lieferte.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass diese Nachweismethode erst nach Einholung der fehlenden Daten des Antibiotikums in künstlichem Plasma vollständig ist und endgültig beurteilt werden kann.

Bis dato qualifiziert sie sich jedoch durchaus als validierte Methode für nachfolgende Quantifizierungsexperimente mit Meropenem und vereinfacht so weiterführende nähere Untersuchungen von Meropenem in realen Serum- bzw. Dialysatproben von PD-Patienten.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

Die Quantifizierung von Meropenem wurde in dieser Arbeit durch die Kopplung zweier Methoden erreicht und wie folgt durchgeführt:

- Zuerst wurde zur Abtrennung aller ungewollten Substanzen eine HPLC, d.h. ein chromatographisches Trennverfahren, verwendet.
- Für die anschließende selektive und sensitive Bestimmung des Antibiotikums Meropenem wurde ein Triple-Quadrupol Massenspektrometer, mit ESI als Ionisierungsquelle sowie Detektion durch einen CEM, eingesetzt.

Eine genaue Beschreibung der verwendeten Techniken kann in den beiden folgenden Kapiteln nachgelesen werden.

Die eingestellten Geräteparameter sowie die genaue Quantifizierungsmethode können in Kapitel 5 (Arbeitsverlauf & Ergebnisse) eingesehen werden.

Eine Auflistung aller verwendeten Materialien findet sich in Kapitel 7.4.

7.1 HPLC – HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Im Allgemeinen zählt die Chromatographie zu den analytischen Trennverfahren. Das Probengemisch wird zwischen einer stationären und einer mobilen Phase verteilt und durch Wechselwirkungen des Analyten zwischen diesen zwei verschiedenen Phasen können Stoffe chromatographisch aufgetrennt werden und resultieren in einem Chromatogramm. Aufgetrennte Substanzen werden dabei als Peaks dargestellt. Hierbei ist ein entscheidendes Merkmal einer Substanz die Retentionszeit, welche die Zeit – und damit die Wanderungsgeschwindigkeit – angibt, bis ein Stoff die Trennsäule durchlaufen hat. Abhängig von der Anzahl und der Intensität der eingegangenen Wechselwirkungen, d.h. der Affinität einer Substanz zur stationären oder zur mobilen Phase, resultiert eine kürzere oder längere Retentionszeit.

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography bzw. Hochleistungsflüssigchromatographie) gehört aufgrund von Verbesserungen der Trennapparatur sowie der Trennmaterialien zu den wichtigsten Säulen-chromatographischen Verfahren (Gey, 2015; Schnecker, 2020).

Das zu analysierende Substanzgemisch wird mithilfe der flüssigen, mobilen Phase an der festen, stationären Phase vorbeitransportiert, sodass die Verbindungen im Lösungsmittel-Gemisch mit der stationären Phase interagieren können. Da unterschiedliche Analyten unterschiedliche Affinitäten zur stationären Phase aufweisen, und somit die Adsorption daran Substanz-abhängig ist, wird eine Auftrennung eines Substanz-Gemisches anhand dessen Polarität ermöglicht.

Die Auftrennung erfolgt in der sogen. Trennsäule, die das „Herz“ einer jeden HPLC darstellt. Die meisten Säulen sind aus rostfreiem Edelstahl gefertigt und haben die Form eines kleinen Zylinders ($\varnothing$ 1-5 mm, Länge 50-300 mm), der mit sehr kleinen ($1\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$), porösen und starren Partikeln „gepackt“ ist. Dieses Packungsmaterial stellt die stationäre Phase dar, an welcher die mobile Phase vorbeifließt (Kazakevich & LoBrutto, 2007a; Schweiggert & Brehm, 2015).

Im Falle der hier verwendeten HPLC wird die Trennleistung im Gegensatz zu simpler Flüssigchromatographie erhöht, indem die mobile Phase (der Eluent) unter hohem Druck (bis zu 400 bar) an besonders kleinen Teilchen der stationären Phase vorbeigepresst wird. Durch verkürzte Retentionszeiten wird so die Analyse deutlich beschleunigt (R. Salzer, Thiele, Zuern & Zimmerer, 1999-2016).

Des Weiteren kann dadurch eine besonders hohe Auflösung erreicht, sowie eine Verbesserung der Nachweisgrenze erzielt werden.

Die Elution¹ kann, im einfachsten Fall, mit nur einem Lösungsmittel oder mit einem gleichbleibenden LM-Gemisch erfolgen (isokratische Elution). Bei der HPLC kann jedoch auch mit einer Gradientenelution gearbeitet werden, bei der sich die Zusammensetzung der mobilen Phase kontinuierlich verändert. Durch die unterschiedliche Polarität der verwendeten Elutionsmittel hat die Gradientenelution den Vorteil der verbesserten Peak-Auflösung. Die Adsorption der Substanzen zur stationären Phase wird durch die kontinuierliche Phasen-Änderung vermindert, wodurch die Elution ebendieser Substanzen erfolgt (Gey, 2015; Schnecker, 2020; Schweiggert & Brehm, 2015).

In vorliegender Arbeit wurde zur Verbesserung der Trennung ebenso mit einer Gradientenelution gearbeitet, bestehend aus einem binären Lösungsmittel-

¹ Elution beschreibt das Herauslösen von adsorbierten Substanzen aus einer stationären Phase, bspw. mithilfe eines Lösungsmittels (Spektrum-Akademischer-Verlag, 1999).

Gemisch aus angesäuertem Acetonitril und angesäuertem bidestilliertem Wasser (siehe Kapitel 5.1.1).

Wie oben bereits erwähnt, bilden kleine, poröse Partikel als sogen. Adsorbentien die stationäre Phase einer HPLC. Diese Partikel sind i.d.R. Silicagele (Kieselgele, SiO_2) in kugelförmiger Gestalt, da sie eine hohe Druckstabilität sowie eine hohe Porosität aufweisen. Chemisch gesehen besitzen Kieselgele normalerweise freie Silanolgruppen, d.h. sie reagieren aufgrund ihrer Sauerstoff-Gruppen sehr polar und hydrophil.

Zur Elution der Substanzen wird daher eine apolare mobile Phase benötigt. Dieser Vorgang stellt die sogen. Normalphasen-Chromatographie dar.

Mithilfe von apolaren Substanzen können diese oberflächlichen Silanolgruppen des Kieselgels allerdings chemisch modifiziert werden (in Abbildung 11 dargestellt), sodass sich ihre Polarität umkehrt und sie sich hydrophob verhalten.

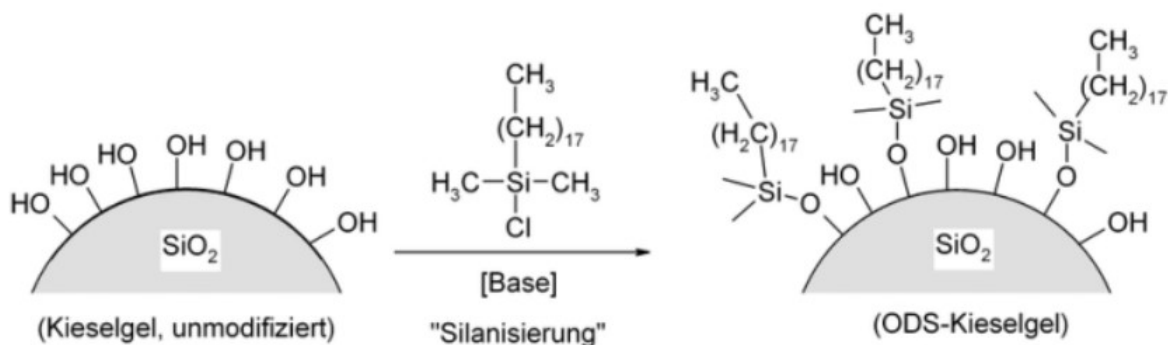


Abbildung 11: Schema Kieselgel, RP-18-Modifikation [Grafik]

Anm.: ODS = Octadecylsilan (C_{18})

Quelle: https://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/Folien_LC.pdf,
abgerufen am 22.02.2021

Auch in dieser Arbeit wurde eine sogen. RP-18-Trennsäule verwendet, bei welcher die stationäre Phase durch Silanisierung mit Octadecyl-Ketten (C_{18} , siehe Abbildung 12) derivatisiert wurde. Das bedeutet, die polaren Hydroxygruppen des Kieselgels wurden mit Octadecyl-Silan versehen, wodurch die Oberfläche nun überwiegend hydrophob reagiert. „Überwiegend“ deshalb, da aus sterischen Gründen nicht jede einzelne der Hydroxygruppen mit den Alkyl-Silan-Gruppen versehen werden kann.

Da somit die Polarität der stationären Phase umgekehrt wurde, nennt man diese hydrophoben Trennphasen auch Umkehrphasen, RP (reversed phase) oder C18-Trennphasen, was zusätzlich die Alkylierung mittels Octadecyl-Ketten angibt.

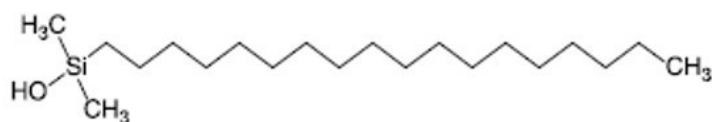


Abbildung 12: C₁₈ (Octadecyl)-Silan [Grafik], Quelle: Kazakevich and LoBrutto (2007b)

Im Gegensatz zur Normalphasen-Chromatographie macht die Verwendung dieser RP-18-Säule die Nutzung einer polaren mobilen Phase erforderlich, wie z.B. ein Acetonitril/Wasser-Gemisch, wie es auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

Das Verfahren wird daher reversed phase (RP)-Chromatographie genannt (Gey, 2015; Schweiggert & Brehm, 2015).

Hierbei ist anzumerken, je apolarer die mobile Phase ist, desto schneller erfolgt die Elution der Analyten. Dies spricht ebenso für die Verwendung einer Gradientenelution, wie oben erwähnt, da die Lösungsmittel-Zusammensetzung nach den jeweiligen Wünschen steuerbar ist.

Heutzutage wird die RP-Chromatographie weitaus häufiger als die NP-Chromatographie eingesetzt, da sie sowohl für polare als auch für apolare Analyten verwendbar ist. Der Grund dafür liegt an dem zugrundeliegenden Trennmechanismus der RP-Säulen: Hier werden nicht wie bei der NP-Chromatographie reine Adsorptionsvorgänge an den polaren Hydroxygruppen zur Trennung verwendet, sondern der Trennmechanismus basiert auch auf den Interaktionen zwischen apolaren Gruppen zueinander, welche vorwiegend auf den Van-der-Waals-Kräften beruhen. Die Ausbildung der Wechselwirkungen hängt dabei mit der Ähnlichkeit des Analyten zur Alkylkette der stationären Phase zusammen – je ähnlicher die Verbindung zur C₁₈-Kette des Kieselgels ist, desto stärker die Interaktionen und desto geringer die Wanderungsgeschwindigkeit (R. Salzer, Thiele, Zuern, Zimmerer, et al., 1999-2016). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei indirekt proportional zur Retentionszeit, d.h. Substanzen mit geringer Wanderungsgeschwindigkeit haben eine längere Retentionszeit. In weiterer Folge bedeutet das, dass besonders apolare Substanzen bei der RP-Chromatographie

eine längere Retentionszeit haben als polare Substanzen, welche im Chromatogramm früher aufscheinen.

Beim verwendeten HPLC-Gerät handelt es sich um einen Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 Hochleistungsflüssigchromatograph, wie er in Abbildung 13 dargestellt ist. Die dazu benutzte Software nennt sich Chromeleon, Dionex™ Chromatography MS Link 2.5.0.2429.

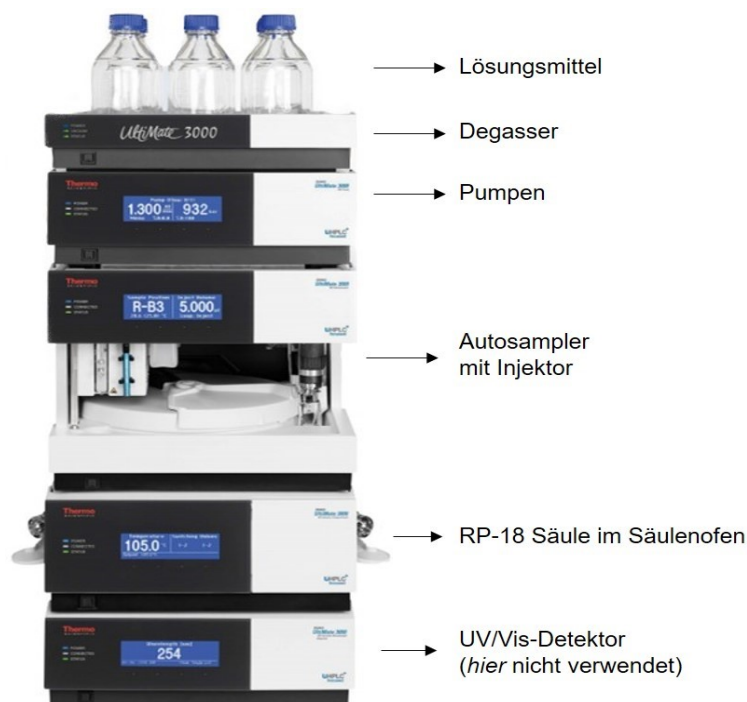


Abbildung 13: Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate RS 3000 HPLC [Grafik]

Quelle: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/BR-70133-LC-Dionex-UltiMate-3000-RSLC-BR70133-EN.pdf>, abgerufen am 23.02.2021

Die Lösungsmittelbehälter stehen oben auf dem HPLC-Gerät, um durch ein sogen. Hochdruckmischungssystem über zwei nachfolgende Pumpen einen konstanten Fluss der mobilen Phase zu gewährleisten. Eine Pumpe fördert dabei das angesäuerte Acetonitril, die andere das angesäuerte, deionisierte Wasser.

Bevor die mobile Phase allerdings gemeinsam mit der Probe durch die Trennsäule geleitet wird, gibt es bei verwendetem HPLC einen sogen. Degasser, der die Lösungsmittel entgast, um mögliche, das präzise System störende Luftblasen zu entfernen.

Der Autosampler besteht aus einem Drehteller mit Platz für 120 Vials, der über einen Bereich von +8 bis +45 °C temperierbar ist. Von dort aus wird mittels eines

vollautomatischen Injektors ein Volumen von 5 µL aus dem gewünschten Proben-Vial aufgezogen und über eine drucklose Schleifeninjektion auf die Säule aufgebracht (ThermoFisherScientific, 2013).

In Abbildung 14 ist der schematische Aufbau des Autosamplers inkl. Schleifen-Injektion nachzuvollziehen.

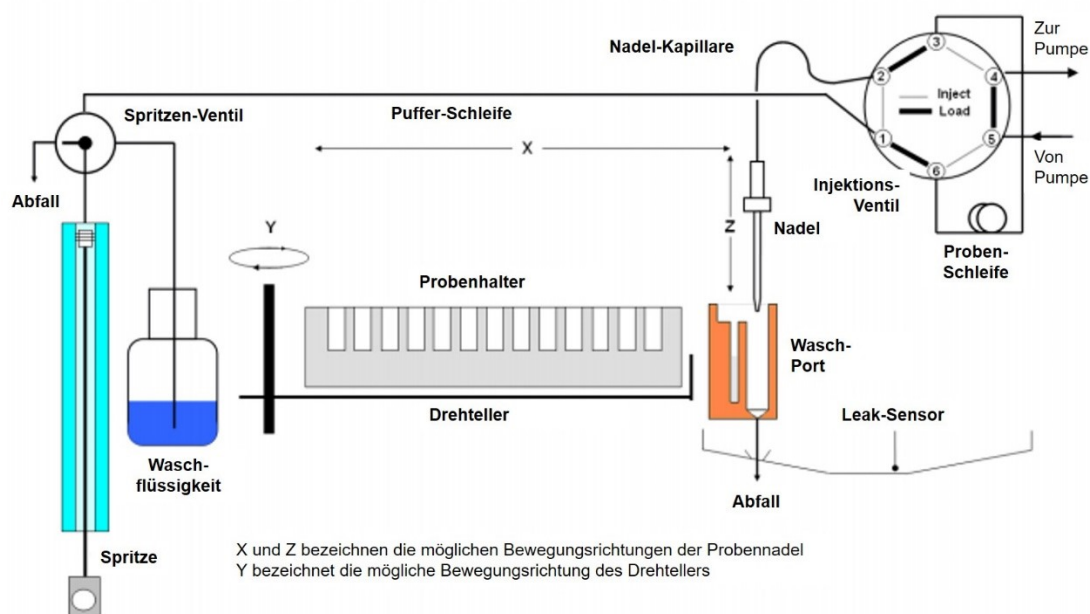


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Autosamplers mit Schleifeninjektion [Grafik]
Quelle: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-4828-3050-ultimate-3000-acc-man48283050-en.pdf>, aus dem Englischen übersetzt; abgerufen am 23.02.2021

Gemeinsam mit der entgasten mobilen Phase wird die Probe sodann durch die RP-18-Säule vorbei an der stationären Phase geleitet. Die Säule befindet sich dabei in einem temperierbaren Säulenofen, um die Umgebungsbedingungen konstant zu halten, damit sie reproduzierbar bleiben.

In der Trennsäule finden die oben erklärten Adsorptions- und Desorptionsvorgänge der zur untersuchenden Probe statt und werden durch diese Wechselwirkungen unterschiedlich stark retiniert. Durch die angewendete Gradientenelution werden die Retentionszeiten verkürzt.

Anstatt zum UV/Vis-Detektor, der in verwendetem HPLC integriert ist, werden die nun aufgetrennten Substanzen (inkl. des enthaltenen Meropenem) direkt zum gekoppelten Massenspektrometer weitergeleitet, wo die Substanzen quantifiziert werden können. Genaueres dazu kann in Kapitel 7.2 nachgelesen werden.

Alle Lösungsmittel-Reste werden in der anschließenden Ionenquelle nicht ionisiert, somit nicht ins MS weitergeleitet, sondern gelangen in einen entsprechenden Abfall-Behälter.

7.2 MS – MASSENSPEKTROMETRIE

„In Kombination mit der Chromatographie (GC-MS, LC-MS) ist die Massenspektrometrie prädestiniert für die Quantifizierung aufgetrennter Analyte [sic] aus komplex zusammengesetzten Matrices“ beschreibt Gey (2015).

Die Massenspektrometrie ist dabei eine nicht-zerstörungsfreie, analytische Methode, welche auf die Strukturen der ursprünglichen Moleküle rückschließen lässt und somit grundlegende chemische Informationen liefert.

Das daraus erhaltene Massenspektrum stellt jedoch ausschließlich die Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) der analysierten, elektrisch geladenen Moleküle dar und kann in Folge dessen der Verifizierung von chemischen Strukturen dienen – oder fungiert, wie im Falle dieser Arbeit, zur quantitativen Messung von Konzentrationen komplex zusammengesetzter Substanz-Mischungen (Lambert et al., 2012).

Die elementaren Schritte der massenspektrometrischen Analyse umfassen:

- (1) die Ionisierung des Analyten, d.h. der Erzeugung von Ionen aus dem zu analysierenden Molekül,
- (2) die Auftrennung der entstandenen (Fragment-) Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) und
- (3) der Detektion der gebildeten (Fragment-) Ionen.

Alle drei Schritte können dabei durch verschiedenste Verfahren erreicht werden. Hierbei ist der Prozess der Detektion maßgeblich an der Verstärkung der Signale und somit an der hohen Empfindlichkeit und der geringen Nachweisgrenze des verwendeten Massenspektrometers beteiligt (Lambert et al., 2012).

In vorliegender Arbeit wurde mit folgender MS-Konfiguration gearbeitet:

API 4000, Triple Quadrupol Mass Spectrometer, AB Sciex Instruments und der dazu gehörigen Software: Analyst 1.5 (Sierra Analytic, LLC).

Genauer können die verwendeten Techniken in den nachfolgenden Unterkapiteln 7.2.1, 7.2.2 und 7.2.3 nachgelesen werden.

Die Liste aller verwendeten Materialien findet sich in Kapitel 7.4.

7.2.1 ESI – ELEKTROSPRAY-IONISATION

Jede massenspektrometrische Untersuchung muss mit der Ionisierung der Proben-Moleküle beginnen, da nur geladene Teilchen durch ein elektrisches Feld beeinflusst und somit aufgetrennt werden können.

In dieser Arbeit wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) angewendet, da sich der gesuchte Analyt Meropenem in Lösung befindet und der interne Standard ebenso einfach hinzugegeben und gelöst werden kann.

ESI gehört dabei zu den sogen. weichen Ionisierungsmethoden, da sie – im Gegensatz zu den harten Ionisierungstechniken – nur mit geringer innerer Überschussenergie Ionen erzeugen kann und die Molekül-Ionen daher keiner oder nur sehr geringer Fragment-Bildung unterliegen (Lambert et al., 2012).

Dadurch können mit dieser Methode auch hochmolekulare Biomoleküle wie Proteine oder Glykoproteine in ihrer Struktur bestehen bleiben. Die Zuordnung des Molekulargewichts kann hier mithilfe der entstandenen Peaks und der sogen. „Quasimolekülionen“ (z.B. $[M+H]^+$) sehr genau erfolgen.

Dahingegen sind harte Ionisationsmethoden, wie bspw. die Elektronenstoß-Ionisation, durch umfangreiche Fragmentationen gekennzeichnet, die daraus resultierend nur geringe Ionen-Ausbeuten zeigen.

Bei LC-MS-Kopplung, wie es auch *hier* der Fall ist, ist die Nutzung einer weichen Ionisierungsmethode wie ESI durchaus üblich (Gey, 2015).

Da ESI, wie bereits erklärt, zu den schonenden Ionisierungstechniken zählt, verläuft die Ionisierung ohne hohe Energiezufuhr. Sie beruht auf einem Prozess, der ohnehin im Lösungsmittel freiwillig abläuft und, wenn überhaupt, nur eine sehr geringe externe Energiezufuhr benötigt. Dazu müssen jedoch sowohl Analyt als auch mobile Phase bestimmte Bedingungen erfüllen, um eine korrekte Ionisierung zu ermöglichen. Ein Beispiel dafür wäre z.B. das Vorkommen bestimmter funktioneller Gruppen im Analyten oder das Vorhandensein einer gewissen Polarität des LM.

Im Gegensatz zu den nächstfolgenden Schritten der Fragmentierung im Triple-Quadrupol und der Detektion, welche unter Vakuum stattfinden, sitzt die ESI-Ionisierungsquelle nicht innerhalb des Vakuumraums des Massenspektrometers, sondern erfolgt unter Atmosphärendruck (Lambert et al., 2012).

In Abbildung 15 ist die verwendete Ionisierungsmethode ESI inkl. eines Querschnitts zum besseren Verständnis schematisch dargestellt. Im rechten Teil der Grafiken sind in Rot die Stickstoff-Ströme zum Verdampfen des LM abgebildet.

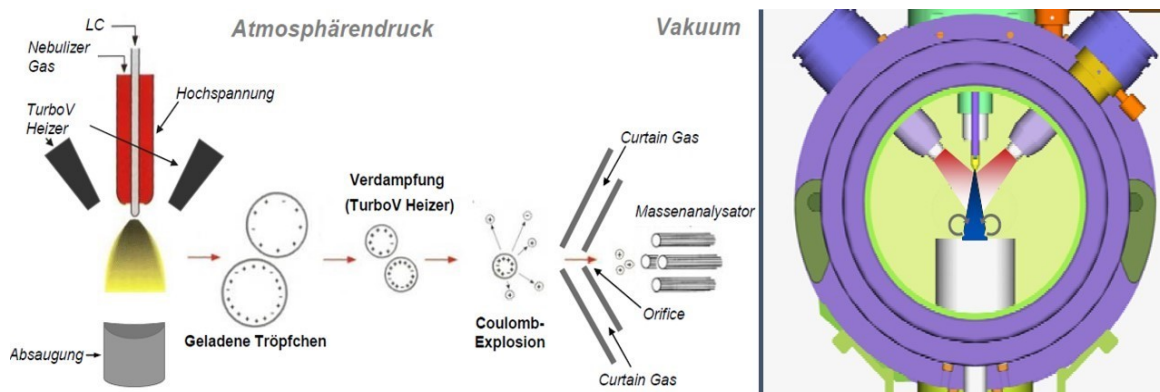


Abbildung 15: ESI - Schema und Querschnitt [Grafik]

Quelle: Applied Biosystems Inc. and MDS Inc. Joint Owners, API 4000™ LC/MS/MS System, Basis-Trainingskurs, 2009

Durch die direkte Kopplung mit dem HPLC wird das eben erst aufgetrennte Eluat mit geringer Flussrate direkt in die Ionenquelle des MS gefördert. Die in der Flüssigkeit gelösten Probemoleküle werden durch eine dünne Kapillare (Emitter) geleitet, an welcher eine elektrische Hochspannung von bis zu 5 kV angelegt ist. Durch die Einleitung eines Inertgases (*hier* Stickstoff, N₂) werden die Moleküle gleichzeitig vernebelt.

Durch diese beiden Schritte führt der Austritt der Analyt-Lösung aus der Kapillare gleichzeitig zur Zerstäubung und Aerosol-Bildung sowie zur elektrischen Aufladung (Ionisierung) und Polarisierung – je nach Richtung des elektrischen Feldes werden Kationen oder Anionen gebildet. Die Tröpfchen bewegen sich danach aufgrund dieser Spannung gleichsam zur Eintrittsöffnung des Analysators. Darüber hinaus verdampft ein weiterer, durch Heizstäbe erhitzter Inertgas-Gegenstrom (*hier* N₂) übriges Lösungsmittel von den zerstäubten Tröpfchen, sodass sie kontinuierlich kleiner werden und die desolvatisierten, gleichgeladenen

Ionen immer dichter aneinandergedrängt werden. Durch die so entstehende, immer größer werdende elektrostatische Abstoßung zwischen den gleichnamigen Ladungen kommt es schließlich zu sogen. Coloumb-Explosionen. Bei diesen „Explosionen“ zerplatzt ein geladenes Tröpfchen in weitere, noch kleinere Tröpfchen. Dieser Vorgang passiert so oft, bis die Tröpfchen klein genug sind, sodass sie nur noch ein einziges geladenes Ion enthalten und deswegen als „Quasimolekülionen“² bezeichnet werden. Über eine beheizte Transfer-Kapillare, zur weiteren Abdampfung von Lösungsmittel aus den Tröpfchen, werden die gebildeten Ionen sodann in den tatsächlichen Massenanalysator überführt. Stufenweise werden dabei die Ionen über Vakuumpumpen in den für die Analyse notwendigen Hochvakuum-Raum transportiert (Lambert et al., 2012).

Überschüssige Lösungsmittel und Abfallprodukte werden über Pumpen abgesaugt.

² Quasimolekülionen werden zumeist bei weichen Ionisierungsverfahren gebildet. Es sind intakte Moleküle, die einfache oder mehrfache Ladungen aufweisen, wodurch sich die Molmasse $[M]$ bei positiver Ladung auf $[M+H]^+$ bzw. bei negativer Ladung auf $[M-H]^-$ ändert (Lambert et al., 2012). Der Einfachheit halber werden diese „Quasimolekülionen“ im Folgenden auch als „Ionen“ bezeichnet.

7.2.2 TRIPLE QUADRUPOLE-ANALYSATOR

Zur weiteren Analyse der zuvor ionisierten Teilchen wird nun ein Triple-Quadrupol als Analysator verwendet, da dieser eine weitere Fragmentierung der entstandenen Ionen erlaubt und daher sehr selektiv und sensitiv arbeitet.

Dieser Massenanalysator nutzt die Fähigkeit der Ionen aus, sich durch wechselnde elektrische Felder ablenken zu lassen. Dabei kann die Geschwindigkeit und Flugbahn der Ionen kontrolliert werden, um die Auftrennung in Abhängigkeit ihres spezifischen Masse-zu-Ladungsverhältnis zu ermöglichen (Lambert et al., 2012).

Das benutzte Massenspektrometer ist unten in Abbildung 16 gezeigt.

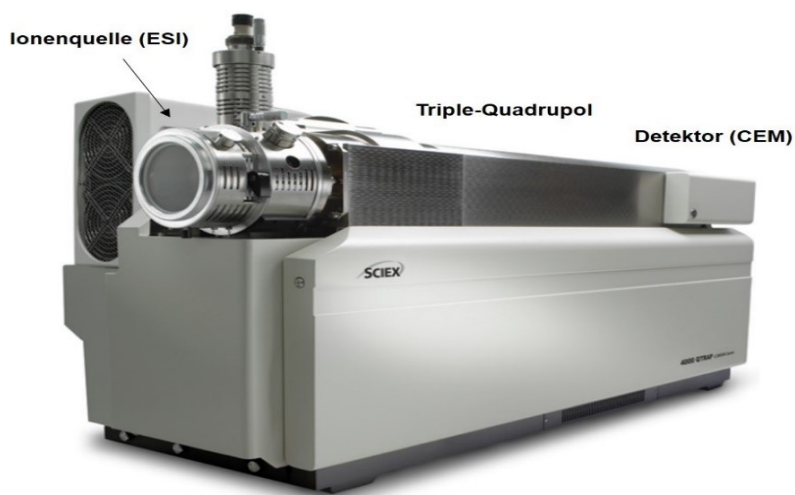


Abbildung 16: MS/MS - API 4000™

Quelle: <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/site-planning-guide/4000-site-planning-guide-de.pdf>, abgerufen am 23.02.2021

Um ein eben solches elektrisches Wechselfeld zum Scannen und Selektieren der Ionen aufzubauen, besteht ein Quadrupol-Massenfilter aus vier zueinander parallel und quadratisch angeordneten Stäben, welche als Elektroden fungieren.

An die jeweils schräg gegenüberliegenden Stabelektroden ist das gleiche Potenzial angelegt, wobei diese Potenziale in Bruchteilen von Sekunden alternieren.

Abbildung 17 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Quadrupols. In Längsrichtung kommen die durch die ESI entstandenen Ionen in den Massenfilter hinein und können sich, aufgrund einer Potentialdifferenz zwischen Anfang und Ende des Quadrupols, stabil durch das elektrische Feld der Stäbe

hindurchbewegen, sofern die voreingestellten Parameter des Analysators mit den jeweiligen m/z -Verhältnissen der Ionen übereinstimmen. Wenn die m/z -Verhältnisse der Ionen nicht mit diesen Parametern korrelieren, prallen die Ionen an den Stabelektroden ab oder werden aus dem Massenfilter geschleudert. Sie können anschließend nicht detektiert werden (*API 4000™ LC/MS/MS System, Basis-Trainingskurs*, 2009; Lambert et al., 2012).

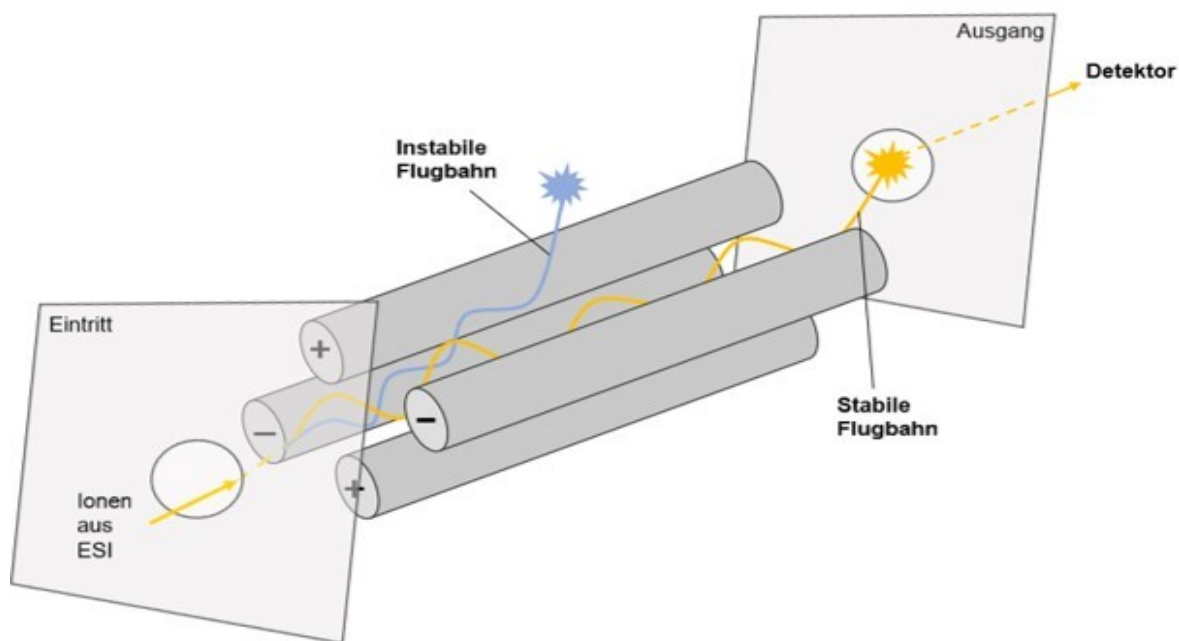


Abbildung 17: Schema – Quadrupol-Massenfilter

Beim angewendeten Triple Quadrupol-Analysator (*kurz: Triple Quad, auch QQQ*) sind drei solcher Quadrupol-Massenfilter hintereinander geschaltet, was der Leistungssteigerung des Massenspektrometers dient (Schema s. S. 56, Abbildung 18).

Dadurch kann das Grundrauschen verringert werden und somit eine höhere Empfindlichkeit sowie Selektivität gewährleistet werden. Die Quantifizierung von sehr geringen Analyten-Konzentrationen, auch bei vielen Analyten in einem Durchlauf, wird somit ermöglicht.

Nichtsdestotrotz muss stets ein Kompromiss zwischen der Auflösung und der Sensitivität geschlossen werden – je schmaler die Peaks, desto höher die Auflösung, desto höher die Selektivität; je breiter die Peaks, desto niedriger die

Auflösung, desto größer die Sensitivität (*API 4000™ LC/MS/MS System, Basis-Trainingskurs*, 2009).

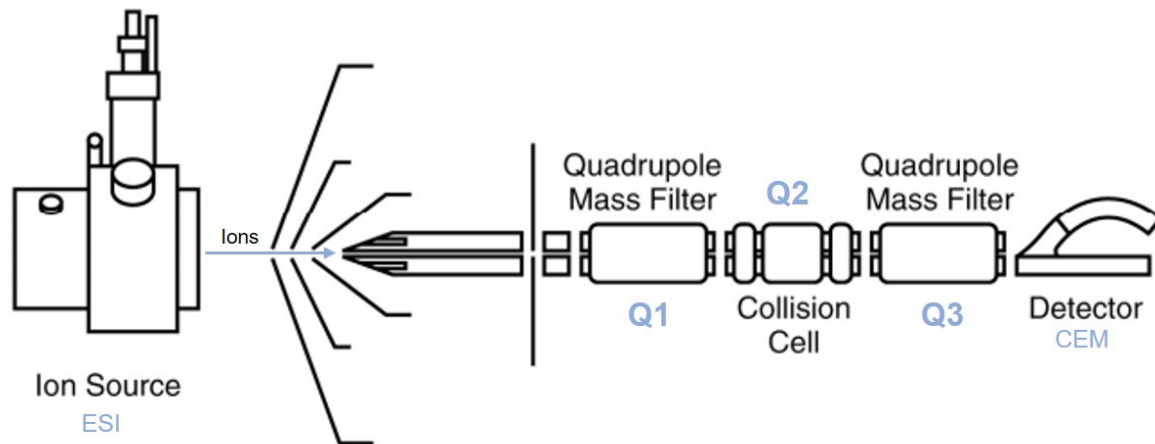


Abbildung 18: Schema – Triple Quadrupol-Analysator [Grafik]

Quelle: <http://www.caoptronicsgroup.com/PDFs/Bio%20Med%20Foods/4000-api-hardware-guide.pdf>, abgerufen am 24.02.2021

Der erste Quadrupol (Q1) wird genutzt, um das Precursor Ion (Vorläufer-Ion, das spezifische Quasimolekülion einer gesuchten Verbindung) zu filtern. Dies funktioniert – wie oben beschrieben – mithilfe ihres bestimmten m/z -Verhältnis. Nur diese selektierten Ionen können sodann in den zweiten Quadrupol (Q2, auch: Kollisionskammer) eintreten. Der Q2 wird auch Kollisionskammer genannt, da hier die Fragmentierung des selektierten Vorläufer-Ions stattfindet und die sogen. Product-Ions bzw. Produkt-Ionen gebildet werden. Die Fragmentierung erfolgt durch Zufuhr eines Inertgases (w.o. N_2) im Gegenstrom-Prinzip, sodass die Stickstoff-Atome mit den Vorläufer-Ionen kollidieren und diese zerstören.

Diese Fragmentierung findet unter reproduzierbaren Bedingungen statt. Das bedeutet, bei bestimmten, konstanten Parameter-Einstellungen läuft die Fragmentierung stets gleich ab, sodass aus dem gleichen Precursor-Ion die immer gleichen Produkt-Ionen generiert werden.

Neben der Fragmentierung wird das zweite Kompartiment ebenso zur Beschleunigung der Ionen und zu deren Transfer in den dritten Quadrupol benötigt. Der Q3 wird, wie der erste Quadrupol, als Massenfilter genutzt, wobei nun die gebildeten Fragmente selektiert werden (Lambert et al., 2012).

Dieser spezielle Vorgang, aus einem Vorläufer-Ion typische Produkt-Ionen zu generieren, wird Multiple Reaction Monitoring (MRM) genannt und wird auch anhand des Analyten Meropenem in Kapitel 305.1.2.1 näher erläutert.

Da beim Triple Quadrupol-Analysator zwei Massenfiter zur Selektion der Ionen gekoppelt werden, wird diese Form der massenspektrometrischen Analyse auch MS/MS oder Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet.

Der besondere Vorteil des Quadrupol-Massenfilters liegt nicht nur an seiner Fähigkeit den gesamten möglichen m/z -Bereich zu scannen, sondern auch in seinem ausgesprochen großen dynamischen Bereich³. Mit dieser Voraussetzung eignet er sich sehr gut für quantitative Messungen – insbesondere, wenn es sich beim Analyten nicht um eine Reinsubstanz, sondern um ein Gemisch mit möglichen Verunreinigungen handelt (Lambert et al., 2012).

Aus diesem Grund ist der Triple Quadrupol bei dieser Arbeit das Mittel der Wahl.

7.2.3 CEM – CHANNEL ELECTRON MULTIPLIER

Zur Detektion der im dritten Quadrupol selektierten Ionen wurde der Channel Electron Multiplier (CEM, Kanal-Elektronenvervielfacher) ausgewählt.

Ein sogen. Channeltron wird zum direkten Nachweis von geladenen Teilchen wie Ionen oder Elektronen verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Sekundärelektronenvervielfacher (Elektronenmultiplier), der eine Verstärkung eines Signals von bis zu 10^8 ermöglichen kann (Hertel & Schulz, 2010).

Zwei Darstellungen eines Channeltrons sind in Abbildung 19 gezeigt.

Das generelle Prinzip eines Elektronenmultipliers ist einfach: Wenn ein selektiertes Ion (oder Elektron) auf die erste Dynode⁴ trifft, werden dort ein bis mehrere Sekundärelektronen mit kleinerer kinetischer Energie herausgelöst. Diese weiteren Elektronen werden zur nächsten Dynode hin beschleunigt, wo wiederum

³ „Der dynamische Bereich ist der Bereich von unterschiedlichen Ionenhäufigkeiten, die mit hoher Genauigkeit aufgezeichnet werden können“ (Lambert et al., 2012). Das bedeutet, sowohl sehr kleine als auch sehr große Häufigkeiten können genau erfasst werden.

⁴ Eine Dynode ist eine Elektrode aus einer Serie von Einzelelektroden. Über die gesamte Dynoden-Serie ist eine Spannung angelegt, die durch einen indirekten Zusammenhang mit der zunehmenden Elektronenanzahl ebendiese beschleunigen kann (Wikipedia, 2020).

Elektronen herausgeschlagen und somit vervielfacht werden. Dieser Vorgang wiederholt sich solange, bis eine Anode die entstandene Masse an Elektronen auffangen und weiterverarbeiten kann.

Beim verwendeten Kanal-Elektronenvervielfacher gibt es nicht mehrere Dynoden zur „Elektronen-Vermehrung“, sondern die gesamte Innenwand des dünnen Glasrohrs fungiert als eine einzige, ausgedehnte Dynode. Durch eine wenige 100 nm dicke, halbleitende Wand-Beschichtung können auch hier bei jedem Aufprall von Ionen bzw. Elektronen neue Sekundärelektronen ausgelöst werden. Diese werden ebenso durch einen kontinuierlichen Potenzialanstieg über die gesamte Länge des Rohrs beschleunigt.

Aufgrund dieser Methode zur Verstärkung kann die Dauer eines Ionen-Impulses verlängert und die Stromstärke erhöht werden – dies ermöglicht den Nachweis der Signale mittels gewöhnlicher Elektronik (Hertel & Schulz, 2010).

Die erhaltenen Daten können sodann mit weiterführender Software am Computer prozessiert und ausgewertet werden.

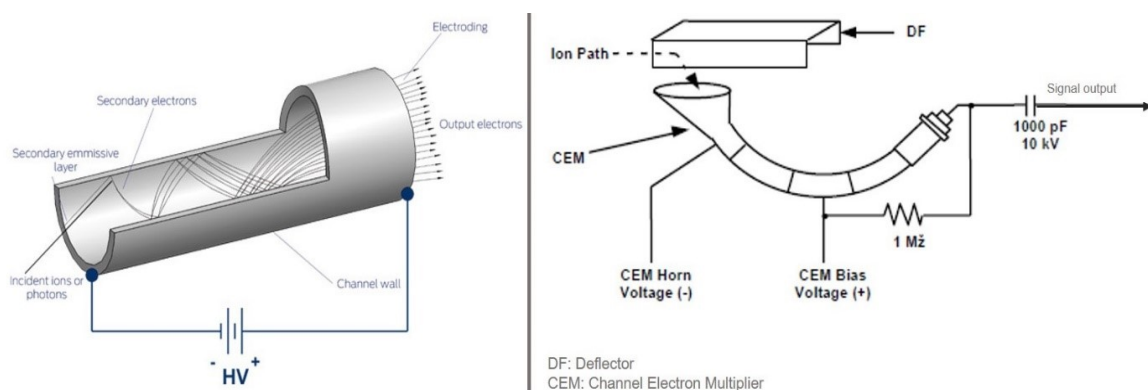


Abbildung 19: Schema und Funktionsweise Channeltron [Grafik]

Quellen: <https://www.photonis.com/products/channeltron-electron-multipliers>, abgerufen am 25.02.2021 und API 4000™ LC/MS/MS System, Basis-Trainingskurs, 2009

7.3 BETA LACTAM-ANTIBIOTIKA

Im Allgemeinen wird die Bekämpfung vermehrungsfähiger, krankheitserregender Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren als antimikrobielle Chemotherapie beschrieben. Mit der Spezifikation „Antibiotika“ sind dabei ursprünglich biosynthetisch hergestellte, antibakterielle Naturstoffe gemeint, wobei diese heutzutage zumeist voll- oder semisynthetisch produziert werden können.

Durch die Verwendung von Antibiotika können Bakterien dabei entweder reversibel in ihrem Wachstum oder der Vermehrung gehemmt werden (Bakteriostase) oder irreversibel geschädigt oder abgetötet werden (Bakterizidie).

Um *in vivo* eine antimikrobielle bzw. antibiotische Wirkung zu erzielen, muss der Wirkstoff direkt am Ort der Infektion wirken und ist dabei einer Reihe von physiologischen Vorgängen ausgesetzt. Aus diesem Grund ist für eine rationale Therapie die umfassende Kenntnis über die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parameter eines Antibiotikums bzw. einer Antibiotika-Gruppe wesentlich. Die verschiedenen antibiotischen Klassen besitzen dabei unterschiedliche Mechanismen und Angriffsorte, um mit den Mikroorganismen wechselwirken zu können (Stahlmann & Lode, 2003).

Der Wirkmechanismus der β -Lactam-Antibiotika beruht auf der Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese, wodurch sie Zeit-abhängig bakterizid wirken. Das bedeutet, dass Konzentrationen, die über der MHK⁵ liegen, keine zusätzlichen Effekte für das Abtöten der Bakterien bringen. Dahingegen ist die Zeitdauer, in welcher die MHK überschritten sein muss, ausschlaggebend für den wirksamen Nutzen dieser Antibiotika-Gruppe (Stahlmann & Lode, 2003).

Der spezifische Angriffsort der β -Lactam-Antibiotika sind die Peptidoglycan-Synthetasen der bakteriellen Zellwand, welche als Transpeptidasen hauptsächlich zur enzymatischen Quervernetzung des Peptidoglycangerüsts dienen und somit die Zellwand der Bakterien stabilisieren. Durch ein spezielles Strukturelement, welches alle β -Lactame (mehr oder weniger) gleichsam besitzen, kann durch Ähnlichkeit zur terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Gruppe der Transpeptidase

⁵ MHK: Minimale Hemmkonzentration, ist die niedrigste Antibiotikum-Konzentration, ab welcher eine bakteriostatische Hemmung einer Bakterienkultur eintritt (Aktories et al., 2017).

ebendiese blockiert werden und somit die zum Überleben der Bakterien notwendige Zellwandsynthese aufgehalten werden (Aktories et al., 2017).

Das relevante und namensgebende Element dieser Antibiotika-Gruppe ist chemisch bzw. mikrobiologisch gesehen der β -Lactam-Ring als antibakteriell aktives Zentrum. In Abbildung 20 ist dieses zentrale chemische Strukturelement jeweils grün hinterlegt.

Anhand verschiedener weiterer Molekülstrukturen wird die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika in die vier Klassen Penicilline, Cephalosporine, Monobactame sowie Carbapeneme eingeteilt (Aktories et al., 2017).

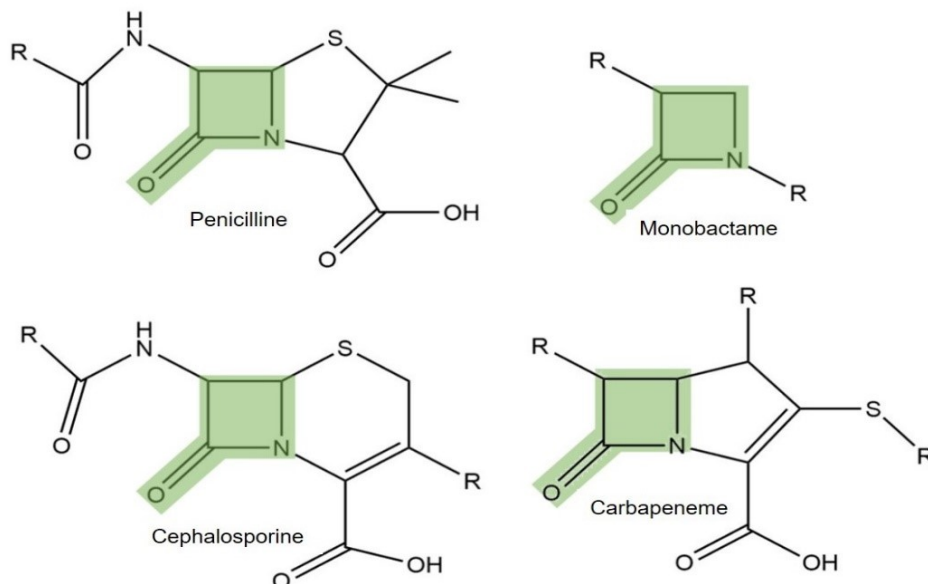


Abbildung 20: Strukturelement – Beta Lactam-Ring [Grafik], Quelle:
[https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3A_Bio-inorganic_Chemistry/Readings/Metals_in_Biological_Systems_\(Saint_Mary%27s_College\)/NDM-1%3A_Metallobetalactamases_\(MBLs\)_and_Antibiotic_Resistance](https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHEM_342%3A_Bio-inorganic_Chemistry/Readings/Metals_in_Biological_Systems_(Saint_Mary%27s_College)/NDM-1%3A_Metallobetalactamases_(MBLs)_and_Antibiotic_Resistance),
 abgerufen am 28.02.2021

7.3.1 MEROPENEM

Meropenem zählt zu der β -Lactam-Klasse der Carbapeneme, welche mit einer Penicillin-ähnlichen Grundstruktur ausgestattet sind, jedoch anstelle des Schwefel-Atoms einen Kohlenstoff tragen, sowie eine Doppelbindung im 5er-Ring (= Pyrrolin) aufweisen (Aktories et al., 2017).

Dies ist auch oben in Abbildung 20 ersichtlich.

Meropenem mit seinem wirksamen aktiven Zentrum ist in Abbildung 21 dargestellt.

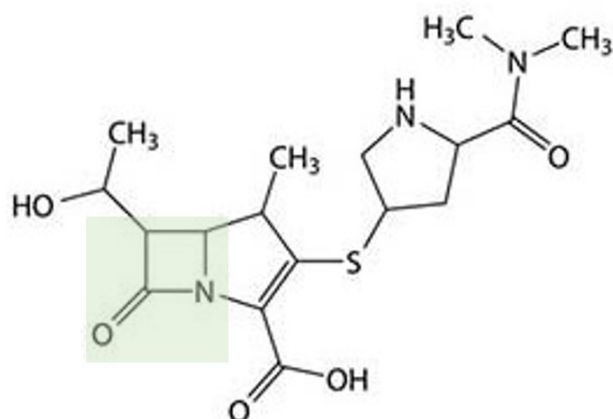


Abbildung 21: Struktur – Meropenem (grün: Beta Lactam-Ring)

Quelle: <https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme>, abgerufen am: 16.02.2021, editiert am 28.02.2021

7.3.1.1 Pharmakologische Eigenschaften

Ob ein Antibiotikum wirksam ist oder nicht, hängt in erster Linie von seinen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften ab.

Der Wirkmechanismus von Meropenem beruht – wie die gesamte Gruppe der β -Lactame – auf der Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese und schlussendlicher Abtötung der Bakterien. Durch die hohe Affinität zu spezifischen Penicillin-bindenden Proteinen (PBP) kann Meropenem die Zellwand gut penetrieren und die Bakterien inaktivieren. Dabei ist es meist resistent gegenüber der durch verschiedene β -Lactamasen⁶ ausgelösten Hydrolyse und (im Gegensatz zu Imipenem) stabil gegen humane Dehydropeptidase-1 (DHP-1), welche beide der Grund für erworbene bakterielle Antibiotika-Resistenzen sein können.

Die antibakterielle Wirksamkeit ist für die Zeit-abhängigen Antibiotika (u.a. Meropenem) am besten, wenn die Plasmakonzentration für eine bestimmte Zeitspanne über der MHK gehalten wird (Baldwin et al., 2008).

Aufgrund seiner fehlenden oralen Absorption wird Meropenem ausschließlich als Infusion oder Bolusinjektion verabreicht, wodurch sich die mögliche Nebenwirkung einer Entzündung an der Injektionsstelle ergibt, sich unerwünschte gastro-intestinale Wirkungen jedoch in Grenzen halten.

⁶ β -Lactamasen sind von Bakterien gebildete Enzyme, die die β -Lactam-Bindung der Antibiotika an die Transpeptidase hydrolytisch spalten und somit die antibiotische Wirkung aufheben. Sie sind eine der Hauptursachen für bakterielle Resistenzen gegen diese Antibiotika-Gruppe (Aktories et al., 2017).

Bei der gemeinsamen Gabe von Meropenem mit Probenecid ist Vorsicht geboten, wie auch bei gleichzeitiger Gabe von Valproinsäure und Warfarin, da sich durch Wechselwirkungen Veränderungen in der Elimination ergeben können.

Die Plasmaproteinbindung von Meropenem beträgt ca. 2%, es ist gut gewebegängig und reichert sich schnell in Körperflüssigkeiten, wie bspw. der Peritonealflüssigkeit an. Meropenem hat eine Halbwertszeit (HWZ) von etwa einer Stunde und das mittlere Verteilungsvolumen liegt bei ca. 0,25 L/kg.

Die Ausscheidung von Meropenem erfolgt zum größten Teil unverändert renal. Daher muss für Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und daraus resultierender Verlängerung der HWZ eine individuelle Dosisanpassung erfolgen. Durch entsprechende Dialysebehandlung kann jedoch eine adäquate Entfernung von Meropenem erreicht werden.

Für Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion sind keine Dosisanpassungen nötig (BASG-Arzneispezialitätenregister, 2017; Nicolau, 2008).

7.3.1.2 Anwendungen

Die Carbapeneme weisen generell ein extrem breites Wirkspektrum auf. Das bedeutet, sie sind sowohl gegen beinahe alle Gram-positiven als auch gegen die meisten Gram-negativen Bakterien sowie gegen relevante Anaerobier hoch wirksam. Während der Therapie ist jedoch zu beachten, dass eine abnehmende Empfindlichkeit von *Pseudomonas* nicht selten vorkommt, sowie *Stentrophomonas maltophilia* durch Carbapeneme selektiert werden kann.

Meropenem weist dabei im Gram-negativen Bereich eine höhere Wirksamkeit als im Gram-positiven Bereich vor. Dies liegt vermutlich an der zusätzlichen C-2-Seitenkette des Pyrrolidin-Rings (Aktories et al., 2017; Fish & Singletary, 1997).

Es ist für ein breites Spektrum an schwerwiegenden, bakteriellen Infektionen zugelassen – sowohl für Erwachsene als auch für Kinder ab drei Monaten.

Aufgrund der Vielzahl an Meropenem-sensitiven Erregern wird es zumeist als empirische Therapie vor der spezifischen Erreger-Identifikation angewendet, um eine möglichst schnell wirksame Therapie zu gewährleisten.

Dabei wird es für gewöhnlich bei moderaten bis hin zu schwerwiegenden Verlaufsformen mit polymikrobieller oder nosokomialer Ursache verwendet (Baldwin et al., 2008).

Die für PD-assoziierte Peritonitis relevanten Erregerstämme wurden bereits in Kapitel 4.5.1 ausgeführt.

Meropenem findet Anwendung bei komplizierten intra-abdominellen Infektionen (cIAI), komplizierten Haut- und Weichteil-Infektionen (cSSSI), akuter bakterieller Meningitis, komplizierten Infektionen des Urogenitaltrakts (UTI), gynäkologischen Infektionen sowie broncho-pulmonalen Infektionen bei Patienten mit zystischer Fibrose, nosokomialer Pneumonie und schwerwiegender ambulant-erworbener Pneumonie (Baldwin et al., 2008; BASG-Arzneispezialitätenregister, 2017).

7.3.1.3 Resistenzen

Meropenem weist gegenüber den meisten β -Lactamasen (inkl. AmpC β -Lactamase und ESBL) hohe Stabilität auf, jedoch können Carbapenemasen wie die B-Metallo- β -Lactamasen die Aktivität von Meropenem negativ beeinflussen. Im Gegensatz zu seinem Verwandten Imipenem ist Meropenem stabil gegen humane DHP-1, was die Notwendigkeit der zusätzlichen Gabe eines Dehydropeptidase-Hemmers wie Cilastatin nichtig macht.

Bakterielle Resistenzen gegenüber Meropenem können sich durch mehrere Mechanismen entwickeln: durch verminderte Durchlässigkeit der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, reduzierte Affinität von Meropenem zu PBP, Über-Expression von Effluxpumpen Gram-negativer Bakterien oder die vermehrte Synthese von β -Lactamasen, welche auch Carbapeneme hydrolysieren können. Trotz dieser zahlreichen Möglichkeiten müssen Erreger, laut Baldwin et al. (2008), mindestens zwei dieser Mechanismen erworben haben, um eine signifikante Resistenz gegenüber Carbapenemen zu erlangen.

Dabei scheint insbesondere Meropenem nur ein geringes Potential zur Erreger-Selektion *in vitro* zu haben.

Innerhalb der Europäischen Union variieren die Resistenzen von Erregern wie *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Acinetobacter* spp.. Daher sollte stets eine lokale Häufung von Resistenzen gegenüber diesen Bakterien berücksichtigt und in die Therapie-Wahl miteinbezogen werden (Baldwin et al., 2008; BASG-Arzneispezialitätenregister, 2017).

7.3.1.4 Stabilität

Meropenem ist eine feste, weiße bis hellgelbe Substanz mit einem Molekulargewicht von 383,45 g/mol. In Arzneimitteln wird die hydrierte Form Meropenem-Trihydrat verwendet, wobei keine besonderen Lagervoraussetzungen bestehen und es ungeöffnet bis zu zwei Jahre haltbar ist. Allerdings muss es nach Auflösen für die folgende Verabreichung als Injektion oder Infusion sofort verwendet werden und darf nicht weiter gelagert werden (BASG-Arzneispezialitätenregister, 2017).

Wie bereits früher ausgeführt (Kapitel 4.5.1.1), kann sich die Stabilität durch Zugabe zu verschiedenen Peritonealdialyse-Flüssigkeiten verändern bzw. negativ beeinflusst werden. Sowohl die Lagerungstemperatur als auch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Flüssigkeiten spielen dabei eine Rolle und müssen bei dieser Form der Anwendung entsprechend beachtet werden.

7.4 MATERIALIEN

Alle während dieser Arbeit verwendeten Materialien, Software-Produkte sowie Reagenzien und Lösungsmittel sind in unten stehenden Tabellen nachzulesen.

Tabelle 8: Materialien – Geräte und Software-Produkte

Gerät / Software	Name (inkl. Größe)	Hersteller	CAS-Nr. / Ref.-Nr.
Eppendorf-Pipette	Finnpipette Digital ACL 40-200µl	Labsystems, Finnland	B53373
Eppendorf-Reaktionsgefäß	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland	REF 72.690.001 LOT 8081411
Gefriergerät	Gefriertruhe groß, Raum 2F407	Liebherr GmbH	-
HPLC	Dionex UltiMate 3000	Thermo Fisher Scientific	-
HPLC-Säule	Acclaim™ 120 C18 3µm 120Å 2.1x150mm	Thermo Fisher Scientific	Prod.No. 059130 Serial No. 002697 LOT 018-01-139
HPLC-Software	Chromeleon Client Version 6.8 SR5 Build 2429; Dionex Chromatography MS Link 2.5.0.2429	Thermo Fisher Scientific	-
HPLC-Vials	0,2 ml/11,6x32mm/klar	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland	REF 702007 LOT 140101495
Kühlgerät	Kühlschrank klein, Raum 2F404	Liebherr GmbH	-
MS	API 4000	AB Sciex Instruments	Model: 1005760 AT Seriennummer: V24040809
MS-Software	Analyst 1.5	Sierra Analytics, LLC	-
Pasteurpipette	Volac Disposable Glass Pasteur Pipettes 230mm	Poulsen & Graf Ltd, UK/Ger	ISO 7712 Art.-Nr.: D812 Batch ID: 43126
Spitzen für Eppendorf-Pipette	200 µl gelb	Sarstedt AG & Co., Deutschland	-

Vial-Deckel	N 9 PP Schraub- kappe, rot/gelb/grün/ blau, Loch, Silikon- Septum	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland	Blau: REF 702287.1
Vollpipetten	Silberbrand Eterna, Klasse B Ex 20°C DIN 1 ml, 2 ml	Brand GmbH + Co. KG, Deutschland	-
Vortexer	REAX 2000	Heidolph	No. 541_1900_00 Serial.No 8947356
Waage	Mettler AE 240 Elektronische Feinwaage	Mettler Toledo GesmbH	Fabr.-Nr.: J83280
Zentrifuge	Heraeus Pico 21 Centrifuge	Thermo Electron Corporation	Fabr.-Nr.: 40771880

Tabelle 9: Materialien – Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel / Reagens	Name (inkl. Größe) Hersteller CAS-Nr. / Ref.-Nr., weitere Herstellerinformationen
Acetonitril	HiPerSolv Chromanorm, for HPLC Supergradient, 2,5 Liter, Reag.Ph.Eur., USP, ACS VWR International S.A.S., Frankreich CAS: 75-05-8 EC-No: 200-835-2, Density: 0,78 kg/L
Ameisensäure	Rotipuran® ≥ 98%, p.a., ACS, 1 Liter Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland Art.-Nr. 4724.1
Aqua bidestillata	-
Doripenem monohydrat Vetranal™, analytical standard	2x 25 mg Sigma-Aldrich CAS: 364622-82-2; PCode: 102280155
Meropenem trihydrat	500 mg Sigma-Aldrich CAS: 119478-56-7, made in USA LOT: LRAC5653
Methanol	HiPerSolv Chromanorm 2,5 Liter, 83638.320 VWR International S.A.S., Frankreich CAS-No.: 67-56-1 EC-No.: 200-659-6
Precinorm® U	Künstliches Plasma Roche Diagnostics GmbH LOT: 186 436-02 REF: 10171743

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. & Starke, K., (2017), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (U. u. F. Verlag Ed. 12. Auflage ed.), München
- API 4000™ LC/MS/MS System, Basis-Trainingskurs, 2009, Applied Biosystems Inc. and MDS Inc. Joint Owners, abgerufen am: 24.02.2021
- Baldwin, C. M., Lyseng-Williamson, K. A. & Keam, S. J., (2008), Meropenem, *Drugs*, 68(6), S. 803-838
- BASG-Arzneispezialitätenregister, (2017, März 2019), Meropenem Accord 1g Fachinformation, https://aspreregister.basg.gv.at/aspreregister/faces/aspreregister.jspx?_afLoop=2927297036097306&_afWindowMode=0&_adf.ctrl-state=16cpdkam4d_4, abgerufen am: 01.03. 2021
- Davenport, A., (2014) Chapter 3 - Chronic Kidney Failure: Renal Replacement Therapy, In P. J. Morris & S. J. Knechtle (Eds.), *Kidney Transplantation—Principles and Practice (Seventh Edition)* (S. 39-53), Philadelphia (PA): W.B. Saunders
- de Fijter, C. W., Jakulj, L., Amiri, F., Zandvliet, A. & Franssen, E., (2016), Intraperitoneal Meropenem for Polymicrobial Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis, *Perit Dial Int*, 36(5), S. 572-573
- Ebenhoch, M. & Röhr, A., (2020), Reserve-Antibiotika: Gezielt gegen Multiresistenz, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/gezielt-gegen-multiresistenz/>, abgerufen am: 11.03. 2021
- El-Reshaide, W., Al-Disawy, H., Nassef, H. & Alhelaly, U., (2016), Comparison of peritonitis rates and patient survival in automated and continuous ambulatory peritoneal dialysis: a 10-year single center experience, *Ren Fail*, 38(8), S. 1187-1192
- Fang, W., Qian, J. Q., Yu, Z. Y. & Chen, S. S., (2004), Morphological changes of the peritoneum in peritoneal dialysis patients, *Chin Med J (Engl)*, 117(6), S. 862-866
- Fish, D. N. & Singletary, T. J., (1997), Meropenem, a new carbapenem antibiotic, *Pharmacotherapy*, 17(4), S. 644-669
- Fresenius-Kabi, (2020), Fachinformation Meropenem Kabi 500mg/1g, https://aspreregister.basg.gv.at/aspreregister/faces/aspreregister.jspx?_afLoop=1350182813239011&_afWindowMode=0&_adf.ctrl-state=grxu6bwkn_4, abgerufen am: 11.02. 2021
- Geberth, S. & Nowack, R., (2014) Peritonealdialyse (PD), In *Praxis der Dialyse* (S. 183-224), Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Gey, M. H., (2015), *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen* (3. Aufl. 2015 ed.), Berlin, Heidelberg
- Hechanova, L. A., (2018a, Jan 2018), Hämodialyse, <https://www.msdmanuals.com/de/profi/urogenitaltrakt/nierenersatztherapie/h%C3%A4modialyse?query=Dialyse>, abgerufen am: 27.01. 2021
- Hechanova, L. A., (2018b), Peritonealdialyse, <https://www.msdmanuals.com/de/profi/urogenitaltrakt/nierenersatztherapie/peritonealdialyse?query=Dialyse>, abgerufen am: 27.01. 2021

- Hertel, I. V. & Schulz, C. P., (2010), *Atome, Moleküle und optische Physik 2: Moleküle und Photonen - Spektroskopie und Streuphysik*, Berlin, Heidelberg: Springer
- Hunter, J. P., Barlow, A. D. & Nicholson, M. L., (2014) Chapter 5 - Access for Renal Replacement Therapy, In P. J. Morris & S. J. Knechtle (Eds.), *Kidney Transplantation—Principles and Practice (Seventh Edition)* (S. 72-90), Philadelphia (PA): W.B. Saunders
- Karger, C. P., (2018) Dialyse als Nierenersatztherapie, In W. Schlegel, C. P. Karger, & O. Jäkel (Eds.), *Medizinische Physik: Grundlagen – Bildgebung – Therapie – Technik* (S. 683-689), Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Kazakevich, Y. & LoBrutto, R., (2007a) Introduction, In *HPLC for Pharmaceutical Scientists* (S. 1-24)
- Kazakevich, Y. & LoBrutto, R., (2007b) Stationary Phases, In *HPLC for Pharmaceutical Scientists* (S. 75-138)
- Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V., K., (2021), Die Peritonealdialyse: Varianten der Peritonealdialyse, <https://www.nierenwissen.de/nierenersatztherapien/peritonealdialyse>, abgerufen am: 03.02. 2021
- Kussmann, M., Schuster, L., Wrenger, S., Pichler, P., Reznicek, G., Burgmann, H., Poepl, W., Zeitlinger, M., et al., (2016), Influence of Different Peritoneal Dialysis Fluids on the In Vitro Activity of Cefepime, Ciprofloxacin, Ertapenem, Meropenem and Tobramycin Against Escherichia Coli, *Perit Dial Int*, 36(6), S. 662-668
- Lambert, J. B., Gronert, S., Shurvell, H. F. & Lightner, D. A., (2012), *Spektroskopie: Strukturaufklärung in der Organischen Chemie* (2., aktualisierte Aufl. ed.), München [u.a.]: Pearson
- Li, P. K., Szeto, C. C., Piraino, B., Bernardini, J., Figueiredo, A. E., Gupta, A., Johnson, D. W., Kuijper, E. J., et al., (2010), Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update, *Perit Dial Int*, 30(4), S. 393-423
- Li, P. K., Szeto, C. C., Piraino, B., de Arteaga, J., Fan, S., Figueiredo, A., Fish, D. N., Goffin, E., et al., (2016), ISPD Peritonitis Recommendations: 2016 Update on Prevention and Treatment, *Perit Dial Int*, Vol. 36, S. 481-509
- Mettang, T., (2014), Der PD-Katheter - Welcher, wann und wie?, *Dialyse aktuell*, 2014; 18(7), S. 366-375
- Nicolau, D. P., (2008), Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of meropenem, *Clin Infect Dis*, 47 Suppl 1, S. S32-40
- Peppelenbosch, A., van Kuijk, W. H. M., Bouvy, N. D., van der Sande, F. M. & Tordoir, J. H. M., (2008), Peritoneal dialysis catheter placement technique and complications, *NDT Plus*, 1(suppl_4), S. iv23-iv28
- Piraino, B., Bernardini, J., Brown, E., Figueiredo, A., Johnson, D. W., Lye, W. C., Price, V., Ramalakshmi, S., et al., (2011), ISPD position statement on reducing the risks of peritoneal dialysis-related infections, *Perit Dial Int*, 31(6), S. 614-630
- Salmhofer, H., (2008), Die Peritonealdialyse, *Medizin in Salzburg*, S. 34-37
- Salzer, R., Thiele, S., Zuern, A. & Zimmerer, C., (1999-2016), Chromatographie - kompakt: Das Prinzip der HPLC, <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromakompakt.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromakompakt/hplc/hplcprin0104.vscml.html>, abgerufen am: 18.02. 2021

- Salzer, R., Thiele, S., Zuern, A., Zimmerer, C., Bezugla, E. & Schleicher, K., (1999-2016), Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc/stat_phase/statphase_hplc2.vscml.html, abgerufen am: 22.02. 2021
- Salzer, W. L., (2018), Peritoneal dialysis-related peritonitis: challenges and solutions, *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 11, S. 173-186
- Schnecker, V., (2020), *Bestimmung von Ampicillin in Serumproben von Peritonealdialyse-Patienten* (Diplomarbeit), Universität Wien,
- Schweigert, R. & Brehm, I., (2015), HPLC, Available from Thieme Gruppe RÖMPP abgerufen am: 2015/07/23, <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-08-01905>
- Schwenger, V., (2007), PD-assoziierte Peritonitis, *Der Nephrologe*, 2(2), S. 107-118
- Spektrum-Akademischer-Verlag, (1999), eluieren, *Lexikon der Biologie*, <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/eluieren/20939>, abgerufen am: 26.04. 2021
- Stahlmann, R. & Lode, H., (2003) Antibiotika und Chemotherapeutika - antiinfektiöse Therapie, In U. u. F. Verlag (Ed.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (11. Auflage ed., S. 746-771), München: Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K.
- ThermoFisherScientific, 2013, *Autosampler Operating Instructions*, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-4828-3050-ultimate-3000-acc-man48283050-en.pdf>, abgerufen am: 23.02.2021
- Thiele, S., Salzer, R. & Zuern, A., (1999-2016), Kalibrierung, <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/kalibrierung.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/datenauswertung/quantitativ/innererstandard/innerstandardm80ht0801.vscml.html>, abgerufen am: 16.02. 2021
- van Baal, J. O. A. M., Van de Vijver, K. K., Nieuwland, R., van Noorden, C. J. F., van Driel, W. J., Sturk, A., Kenter, G. G., Rikkert, L. G., et al., (2017), The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum, *Tissue and Cell*, 49(1), S. 95-105
- Vin, F., Rutherford, P. & Faict, D., (2009), Intraperitoneal Administration of Drugs in Peritoneal Dialysis Patients: A Review of Compatibility and Guidance for Clinical Use, *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 29, S. 5-15
- Vlaar, P. J., van Hulst, M., Benne, C. A. & Janssen, W. M., (2013), Intraperitoneal compared with intravenous meropenem for peritoneal dialysis-related peritonitis, *Perit Dial Int*, 33(6), S. 708-709
- Vychytil, A., (2017), Peritonealdialyselösungen, *Der Nephrologe*, 12(1), S. 20-26
- Vychytil, A. & Hörl, W. H., (2013), Peritonealdialyse – eine Alternative zur Hämodialyse im Zentrum, *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 163(11), S. 253-254
- Wiesholzer, M., Pichler, P., Reznicek, G., Wimmer, M., Kussmann, M., Balcke, P., Burgmann, H., Zeitlinger, M., et al., (2016), An Open, Randomized, Single-Center, Crossover Pharmacokinetic Study of Meropenem after Intraperitoneal and Intravenous Administration in Patients Receiving Automated Peritoneal Dialysis, *Antimicrob Agents Chemother*, 60(5), S. 2790-2797

- Wiesholzer, M., Winter, A., Kussmann, M., Zeitlinger, M., Pichler, P., Burgmann, H., Reznicek, G. & Poepl, W., (2017), Compatibility of Meropenem with Different Commercial Peritoneal Dialysis Solutions, *Perit Dial Int*, 37(1), S. 51-55
- Wikipedia, (2020), Dynode, <https://de.wikipedia.org/wiki/Dynode>, abgerufen am: 25.02. 2021
- Zonaras, V., Alexis, M. & Koupparis, M., (2016), Development and validation of an LC-MS method for the simultaneous determination of sulfadiazine, trimethoprim, and N4-acetyl-sulfadiazine in muscle plus skin of cultured fish, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 39:7, S. 364-373

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schema Hämodialyse [Grafik] Quelle: https://sicheres-krankenhaus.de/planungsbuero/anforderungen-pflegebereiche/dialyse , abgerufen am 28.01.2021	8
Abbildung 2: Schema Peritonealdialyse [Grafik] Quelle: https://www.gesundheit.gv.at/krankheiten/nieren-harnblase/dialyse/peritonealdialyse-bauchfelldialyse , abgerufen am 28.01.2021	10
Abbildung 3: Schema der Katheterabschnitte mit Cuff-Positionierung [Grafik], ..	12
Abbildung 4: Gradientenelution - Änderung der Fließmittelzusammensetzung ..	28
Abbildung 5: Prinzip MRM [Grafik] Quelle: http://www.inf.fu-berlin.de/lehre/WS14/ProteomicsWS14/LUS/lu6a/345/index.html , abgerufen am 15.02.2021	30
Abbildung 6: MCA Scans von Meropenem	31
Abbildung 7: Produktionen von Meropenem und Doripenem: Quantifier (blau bzw. grün) und Qualifier (rot bzw. grau)	32
Abbildung 8: Struktur Meropenem [Grafik], Quelle: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme , abgerufen am: 16.02.2021	34
Abbildung 9: Struktur Doripenem [Grafik], Quelle: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme , abgerufen am: 16.02.2021	34
Abbildung 10: Eichgerade von Meropenem	38
Abbildung 11: Schema Kieselgel, RP-18-Modifikation [Grafik] Anm.: ODS = Octadecylsilan (C ₁₈) Quelle: https://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Trennmethoden/Folien_LC.pdf , abgerufen am 22.02.2021	46
Abbildung 12: C ₁₈ (Octadecyl)-Silan [Grafik], Quelle: Kazakevich and LoBrutto (2007b)	47
Abbildung 13: Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate RS 3000 HPLC [Grafik] Quelle: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/BR-70133-LC-Dionex-UltiMate-3000-RSLC-BR70133-EN.pdf , abgerufen am 23.02.2021	48

Abbildung 14: Schematische Darstellung des Autosamplers mit Schleifeninjektion [Grafik] Quelle: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-4828-3050-ultimate-3000-acc-man48283050-en.pdf , aus dem Englischen übersetzt; abgerufen am 23.02.2021	49
Abbildung 15: ESI - Schema und Querschnitt [Grafik] Quelle: Applied Biosystems Inc. and MDS Inc. Joint Owners, <i>API 4000™ LC/MS/MS System, Basis-Trainingskurs</i> , 2009.....	52
Abbildung 16: MS/MS - API 4000™ Quelle: https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/site-planning-guide/4000-site-planning-guide-de.pdf , abgerufen am 23.02.2021	54
Abbildung 17: Schema – Quadrupol-Massenfilter	55
Abbildung 18: Schema – Triple Quadrupol-Analysator [Grafik] Quelle: http://www.caoptronicsgroup.com/PDFs/Bio%20Med%20Foods/4000-api-hardware-guide.pdf , abgerufen am 24.02.2021	56
Abbildung 19: Schema und Funktionsweise Channeltron [Grafik] Quellen: https://www.photonis.com/products/channeltron-electron-multipliers , abgerufen am 25.02.2021 und <i>API 4000™ LC/MS/MS System, Basis-Trainingskurs</i> , 2009.....	58
Abbildung 20: Strukturelement – Beta Lactam-Ring [Grafik], Quelle: https://chem.libretexts.org/Courses/Saint_Marys_College_Notre_Dame_IN/CHM_342%3A_Bio-inorganic_Chemistry/Readings/Metals_in_Biological_Systems_(Saint_Mary%27s_College)/NDM-1%3A_Metallobetalactamases_(MBLs)_and_Antibiotic_Resistance , abgerufen am 28.02.2021	60
Abbildung 21: Struktur – Meropenem (<i>grün</i> : Beta Lactam-Ring) Quelle: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/carbapeneme , abgerufen am: 16.02.2021, editiert am 28.02.2021	61

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht PD-assoziierte Peritonitis verursachende Erreger-Stämme	18
Tabelle 2: Für PD-assoziierte Peritonitis relevante Meropenem-empfindliche Erregerstämme	22
Tabelle 3: Fließmittelzusammensetzung bei Gradientenelution.....	27
Tabelle 4: Vergleich der prozentualen Abnahme der Konzentration (Meropenem/Doripenem).....	35
Tabelle 5: Berechneter Korrekturfaktor mittels internen Standards Doripenem ¹ .	37
Tabelle 6: Korrigierte Peakfläche von Meropenem ¹	37
Tabelle 7: Verifizierung der Eichgerade mithilfe unabhängiger Meropenem- Analyse und Berechnung.....	39
Tabelle 8: Materialien – Geräte und Software-Produkte	65
Tabelle 9: Materialien – Lösungsmittel und Reagenzien.....	66
Tabelle 10: Korrekturfaktor (Berechnung mittels I.S.)	74
Tabelle 11: Korrigierte Peakfläche von Meropenem	75

11 ANHANG

Vollständige Messdaten zu den in Kapiteln 5.2 und 5.3 erwähnten Auszügen:

ad Tabelle 5: Berechneter Korrekturfaktor mittels internen Standards Doripenem¹:

Tabelle 10: Korrekturfaktor (Berechnung mittels I.S.)

Zeit [min]	Proben-Vial	C [ng/mL]	Peakfläche	Peakfläche MW	KF
0	1	518	1,39E+005	1,39E+005	0,9976
15	1	518	1,42E+005		0,9765
30	1	518	1,35E+005		1,0272
45	2	518	1,37E+005	1,33E+005	1,0122
60	2	518	1,30E+005		1,0667
75	2	518	1,31E+005		1,0585
90	3	518	1,24E+005	1,26E+005	1,1183
105	3	518	1,27E+005		1,0919
120	3	518	1,27E+005		1,0919
135	4	518	1,21E+005	1,25E+005	1,1460
150	4	518	1,30E+005		1,0667
165	4	518	1,24E+005		1,1183
180	5	518	1,17E+005	1,18E+005	1,1852
195	5	518	1,21E+005		1,1460
210	5	518	1,17E+005		1,1852
225	6	518	1,16E+005	1,16E+005	1,1954
240	6	518	1,16E+005		1,1954
255	6	518	1,15E+005		1,2058
270	1	518	1,15E+005	1,15E+005	1,2058
285	1	518	1,14E+005		1,2164
300	1	518	1,17E+005		1,1852
315	2	518	1,17E+005	1,19E+005	1,1852
330	2	518	1,16E+005		1,1954
345	2	518	1,23E+005		1,1274
360	3	518	1,20E+005	1,18E+005	1,1556
375	3	518	1,20E+005		1,1556
390	3	518	1,15E+005		1,2058
405	4	518	1,23E+005	1,19E+005	1,1274
420	4	518	1,17E+005		1,1852
435	4	518	1,17E+005		1,1852
450	5	518	1,14E+005	1,14E+005	1,2164
465	5	518	1,13E+005		1,2271
480	5	518	1,14E+005		1,2164
495	6	518	1,10E+005	1,12E+005	1,2606
510	6	518	1,12E+005		1,2381
525	6	518	1,14E+005		1,2164

Anm.: Die angegebenen Zahlenwerte sind gerundet; die Berechnung erfolgte mit den exakten Werten.

ad Tabelle 6: Korrigierte Peakfläche von Meropenem¹:

Tabelle 11: Korrigierte Peakfläche von Meropenem

Zeit [min]	Proben-Vial	C [ng/mL]	Gemessene Peakfläche ²	KF (I.S.)	Korrigierte Peakfläche
0	1	0,05	2,36E+001	0,9976	2,35E+001
15	1	0,05	2,60E+000	0,9765	2,54E+000
30	1	0,05	6,53E+001	1,0272	6,71E+001
45	2	0,47	1,51E+001	1,0122	1,53E+001
60	2	0,47	1,04E+001	1,0667	1,11E+001
75	2	0,47	1,43E+001	1,0585	1,51E+001
90	3	4,65	6,82E+002	1,1183	7,63E+002
105	3	4,65	1,18E+003	1,0919	1,29E+003
120	3	4,65	9,30E+002	1,0919	1,02E+003
135	4	46,5	1,03E+004	1,1460	1,18E+004
150	4	46,5	1,25E+004	1,0667	1,33E+004
165	4	46,5	1,25E+004	1,1183	1,40E+004
180	5	465	1,23E+005	1,1852	1,46E+005
195	5	465	1,20E+005	1,1460	1,38E+005
210	5	465	1,25E+005	1,1852	1,48E+005
225	6	4650	1,09E+006	1,1954	1,30E+006
240	6	4650	1,08E+006	1,1954	1,29E+006
255	6	4650	1,08E+006	1,2058	1,30E+006
270	1	0,05	5,85E+000	1,2058	7,05E+000
285	1	0,05	1,77E+000	1,2164	2,15E+000
300	1	0,05	6,69E+000	1,1852	7,93E+000
315	2	0,47	1,47E+001	1,1852	1,74E+001
330	2	0,47	1,72E+001	1,1954	2,06E+001
345	2	0,47	7,64E+000	1,1274	8,61E+000
360	3	4,65	6,84E+002	1,1556	7,90E+002
375	3	4,65	1,08E+003	1,1556	1,25E+003
390	3	4,65	1,59E+003	1,2058	1,92E+003
405	4	46,5	1,17E+004	1,1274	1,32E+004
420	4	46,5	1,01E+004	1,1852	1,20E+004
435	4	46,5	1,04E+004	1,1852	1,23E+004
450	5	465	1,16E+005	1,2164	1,41E+005
465	5	465	1,19E+005	1,2271	1,46E+005
480	5	465	1,13E+005	1,2164	1,37E+005
495	6	4650	1,03E+006	1,2606	1,30E+006
510	6	4650	1,03E+006	1,2381	1,28E+006
525	6	4650	1,05E+006	1,2164	1,28E+006

Anm.: Die angegebenen Zahlenwerte sind gerundet; die Berechnung erfolgte mit den exakten Werten.