

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. W. Jens Fischer

Interaktionen von Cytosorb unter kontinuierlicher
Nierenersatztherapie am Beispiel Piperacillin/Tazobactam

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alexander Schubert
2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter/in: Priv.- Doz. Dr. med. Christian Vollmer

Meiner Familie,
die mich immer auf meinem Weg unterstützt und begleitet hat.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht als:

- ePoster Vortrag, Online Symposium der MedRSD am 30.09.2020
- ePoster Vortrag, Deutscher Anästhesiekongress am 29.05.2023

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika
AKI	acute kidney injury
BMI	Body- Maß-Index
C _{max} .	Spitzenkonzentration im Plasma
CPR	Kardiopulmonale Reanimation
CNV	Chronisches Nierenversagen
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRRT	Kontinuierliche Nierenersatztherapie
CS	Cytosorb
CVVHD	Kontinuierliche veno-venöse Hämodialyse
DAMP	Damage associated molecular pattern
ECMO	Extrakorporale Membran Oxygenierung
ECLS	Extrakorporaler „life saver“
EK	Endkonzentration
HC- CVVHD	„high- cutoff“ Kontinuierliche veno- venöse Hämodialyse
HCO-CVVHD	siehe HC- CVVHD
HF-CVVHDF	„high- flux“ Kontinuierliche veno-venöse Hämodiafiltration
HLM	Herz-Lungen Maschine
HVHF	High Volume Hämofiltration
HPLC	High pressure liquid chromatography
IL	Interleukin
IS	Interner Standard
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MER	Meropenem
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
MOV	Multi-Organ-Versagen
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PAP	Plättchenarmes Plasma

PCT	Procalcitonin
PEN	Penicillin G
PIP	Piperacillin
PSAER	Pseudomonas aeruginosa
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TAZ	Tazobactam
ZK	Zielkonzentration

Zusammenfassung:

Das Krankheitsbild der Sepsis und des Septischen Schocks lässt sich im Wesentlichen auf eine überschießende und fehlgeleitete Immunantwort des Körpers zurückführen. Auch heute ist die Sepsis noch die dritthäufigste Todesursache in deutschen Krankenhäusern. Eine effiziente und zügige Antibiotika-Therapie ist für die betroffenen Patienten deshalb unabdingbar. Häufig benötigen die Erkrankten eine Nierenersatztherapie. Im Rahmen der sich weiter entwickelnden Sepsis Therapie kommen immer häufiger so genannte Hämoabsorptionsfilter zusammen mit einer kontinuierlichen Hämodialyse zur Elimination von Entzündungsmediatoren (z.B. IL-2 und IL-6) zum Einsatz. Im Jahr 2011 stellte die Firma Cytosorb Inc. einen Hämoabsorptionsfilter für Moleküle mit einer Größe von 10-60 kDa vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Cytosorb Therapie auf die Plasmaspiegel verschiedener Antiinfektiva sowohl „*in vivo*“ als auch „*in vitro*“ untersucht. Im Fokus lagen dabei Piperacillin/Tazobactam und Meropenem. Es konnte in diesem Zusammenhang sowohl am Patienten, als auch „*in vitro*“ eine relevante Reduktion der zirkulierenden Antibiotika nachgewiesen werden. Dabei zeigte Cytosorb eine große Absorptionskapazität (bis zu 4,5 g für Piperacillin sowie 1,1 g für Meropenem pro Kartusche). So konnten auch weit außerhalb klinischer Konzentrationen noch eine erhebliche Absorption für Piperacillin und Meropenem nachgewiesen werden. Dabei scheint die Bindung unter anderem von der Größe und der Plasmaeiweißbindung der Substanzen abhängig zu sein. In einem Simulationsversuch mit einer Modellapparatur konnte zudem eine anhaltend lange Absorptionsfähigkeit, auch über den in der Klinik üblichen Behandlungszeitraum von 24 h hinaus, beobachtet werden (AUC 296,0 ohne CS vs. 291,3 µg/ml/h an Tag 12). Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte keine nennenswerte Freisetzung der einmal an das Cytosorb gebundenen Antibiotika nachgewiesen werden. Dem entsprechend scheint im klinischen Setting zumindest eine Optimierung der Dosierungsintervalle sowie ein routinemäßiges Monitoring der Antibiotikazielspiegel (MHK) sinnvoll. Daher sollten weitere Untersuchungen im größerem Umfang und mit einem größerem Patientenkollektiv in Erwägung gezogen werden.

Summary:

Sepsis and septic shock can be traced back to an excessive and misguided immune response of the body. Even today, sepsis is the third most common cause of death in Germany. An efficient and rapid antibiotic therapy is therefore indispensable for those patients being affected. Frequently, patients require renal replacement therapy. In the evolving sepsis therapy, so-called hemoabsorption filters are increasingly used together with continuous hemodialysis to eliminate inflammatory mediators (e.g. IL-2 and IL-6). In 2011, the company Cytosorb Inc. developed a hemoabsorption filter for molecules with a size of 10-60 kDa [3, 4]. In this work, the effects of Cytosorb therapy on plasma levels of various anti-infectives were investigated both "*in vivo*" and "*in vitro*". The main focus was on Piperacillin/Tazobactam and meropenem. In this context, a relevant reduction of circulating antibiotics could be demonstrated in patients, as well as "*in vitro*". Cytosorb shows a high absorption capacity (up to 4.5 g for piperacillin and 1.1 g for meropenem per cartridge). Even far beyond clinical concentrations, we were able to detect considerable absorption for piperacillin and meropenem. The interaction appears to be dependent on the size and plasma protein binding of the substances, among other factors. Moreover, in a simulation test using an "*in vitro*" system, a long absorption capacity could be observed. Even beyond the treatment period of 24 h, which is commonly used in the clinic (AUC 296.0 without CS vs. 291.3 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$ on day 12). Further, no significant release of the antibiotics once bound to Cytosorb could be detected in the performed investigations. In this context at least an optimization of the dosing intervals as well as a routine monitoring of the antibiotic target levels (MIC) seems reasonable for the threatened patients. Further studies on a larger scale and with a larger patient population should definitely be conducted.

Inhalt

1.0	Einleitung.....	1
1.1	Sepsis.....	2
1.2	Epidemiologie	3
1.3	Diagnostik.....	4
1.4	Antibiotische Therapie	4
1.5	Supportive Therapie.....	8
1.6	Cytosorb Therapie.....	9
1.7	Studien zum klinischen Einsatz von Cytosorb	13
2.	Problemstellung	14
2.1	Hypothesen	15
3.	Material und Methoden.....	16
3.1	„In vivo“ Untersuchungen	16
3.2	„in vitro“ Versuche	20
3.2.1	Sättigungskinetik	21
3.3	Simulation einer CVVHD im Labormaßstab	22
3.4	„In vivo“/ „in vitro“ Versuche mit Imipenem	25
3.5	Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	26
3.6	Dokumentation & Statistik.....	28
4.	Ergebnisse	29
4.1	Klinische Verlaufskontrollen	29
4.2	Ergebnisse der klinischen Verlaufskontrollen mit Imipenem.....	32
4.3	In vitro Untersuchungen der Cytosorb Kinetik	33
4.3.1	Auswirkungen unterschiedlicher Medien auf die Plasmaspiegel.....	34
4.3.2	Sättigung der Bindung von Piperacillin und anderen Antibiotika an Cytosorb.....	36
4.3.3	Vergleich der Bindung an Cytosorb mit der Bindung an Aktivkohle	39
4.4	Reversibilität der Bindung an Cytosorb	41
4.5	Simulationsversuche mit Piperacillin in einem pharmakokinetischen Modell.....	44
5	Diskussion	49
6	Ausblick	60
7	Danksagung.....	61
8	Geräte:	62
9	Substanzverzeichnis	63
10	Abbildungsverzeichnis	67

1.0 Einleitung

Im Jahr 2011 wurden rund 175.051 Patienten in deutschen Krankenhäusern mit der Diagnose Sepsis behandelt. Dabei wurde in 37,8 % der Fälle eine intensivmedizinische Behandlung notwendig. Die Letalität ist weiterhin mit 6813 verstorbenen auf 100.000 Einwohner [1] unverändert hoch. Damit rangiert die Sepsis an dritter Stelle der Todesursachen in deutschen Krankenhäusern [2] (Deutschland, 2018). Vor dem Hintergrund dieser Zahlen wird deutlich, dass das Krankheitsbild der Sepsis und die daraus resultierende Therapie einen wesentlichen Bestandteil der aktuellen Forschung darstellen. Ein weiterer Faktor für die anhaltenden Bemühungen zur Optimierung der Sepsistherapie sind die weiterhin hohen Behandlungskosten für das Gesundheitssystem. Hierbei wurden in den vergangenen Jahren rund 6,3 Milliarden Euro für die Therapie der Sepsis aufgewendet [1]. Es ist dabei anzunehmen, dass die Behandlungskosten durch weitere notwendige Therapien (Anschlussheilbehandlung, Langzeitpflege usw.) nochmals deutlich steigen. Der dynamische Verlauf und die Komplexität der Sepsis stellen alle an der Therapie Beteiligten vor enorme Herausforderungen. In der Regel liegt die Krankenhausverweildauer von Patienten mit einer Sepsis bei 10,6 Tagen [3] (ICD A41.9 Sepsis n.n., Stand 2018). Häufig ist die Erkrankung mit erheblichen Auswirkungen auf das tägliche Leben der Patienten verbunden. Im Rahmen der seit 1991 stattfindenden Konsensuskonferenzen liegt der Fokus auf eben dieser Problematik. Dabei ist es stets das Ziel, die aktuellen Entwicklungen voranzutreiben, das Bewusstsein für die Erkrankung zu fördern, sowie einheitliche Behandlungsansätze zu erstellen [4]. So wird in den Konsensus-Richtlinien die Wichtigkeit einer schnellen und zielgerichteten Therapie hervorgehoben. Der Antibiotika-Therapie (empirisch und kalkuliert) obliegt hier eine essenzielle Rolle. Scheitert eine rasche Eindämmung der Infektion, so kommt es häufig zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen und unterschiedlichsten Komplikationen. Das Multi-Organ-Versagen stellt dabei die gemeinsame Endstrecke im Krankheitsverlauf der Sepsis dar. Eines der in diesem Hinblick häufig betroffenen Organsysteme sind die Nieren. Im Verlauf der progredienten Schocksymptomatik kommt es unter anderen zum Nierenversagen. Die Nierenersatztherapie ist somit häufig unumgänglich. Unter den möglichen Nierenersatzverfahren ist vor allem der kontinuierlichen veno-venösen Hämodialyse (CVVHD) der Vorrang zu geben [5], da diese geringere Inzidenzen für kardiozirkulatorische

Nebenwirkungen aufweist. Notwendigerweise müssen diese im Hinblick auf eine effiziente Elimination harnpflichtiger Substanzen in Kauf genommen werden. Des Weiteren kommt es zu deutlichen Veränderungen in der Pharmakokinetik der antiinfektiven Substanzen. Während der Behandlung mit Nierenersatzverfahren lassen sich reduzierte Plasmaspiegel der für die Therapie notwendigen Antibiotika beobachten.

Unter der anhaltenden Weiterentwicklung der Sepsistherapie haben seit einigen Jahren so genannte Hämoperfusionsfilter Einzug gehalten. Das Ziel einer Therapie unter Einsatz solcher Filter ist es, Entzündungsmediatoren (IL-2, IL-6 usw.) aus dem zirkulierenden Patientenblut zu entfernen [6] und dadurch die überschießende Immunantwort zu dämpfen. Die Firma Cytosorb Inc. stellte 2011 einen Patentantrag für einen Hämoperfusionsfilter [7, 8]. Durch die Hämofiltration werden Moleküle mit mittlerer Größe (10-60 kDa) an das Filtersystem gebunden. Das primäre Ziel ist auch hier die vorrangige Elimination von Interleukinen. Allerdings können auch viele der häufig in der Klinik verwendeten Antibiotika in das Absorptionsspektrum fallen und somit gebunden werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den möglichen Auswirkungen der Cytosorb Therapie auf die Plasmaspiegel von Piperacillin/Tazobactam sowie Imipenem/ Meropenem am Patienten (in vivo) und umfasst weiterführende experimentelle Untersuchungen im Labor (in vitro).

1.1 Sepsis

Im Jahr 2016 wurden die aktuellen Leitlinien zur Sepsis zuletzt durch eine Konsensuskonferenz aktualisiert. Infolgedessen wird die Sepsis als lebensgefährliche Organdysfunktion definiert, welche durch eine dysregulierte körpereigene Reaktion auf eine vermutete Infektion verursacht wird [4]. Um die der Erkrankung zugrundeliegenden Organdysfunktionen zielgerichtet und zügig zu identifizieren, werden diese anhand des sog. *SOFA Score (Sequential Organ Failure Assesment)* beurteilt. Es werden im Folgenden die bis 2016 verwendeten Kennzahlen und Differenzierungen verwendet.

Es lassen sich mehrere Foci für die Sepsis identifizieren. Die häufigsten Erkrankungen, welche in einer Sepsis münden, betreffen Infektionen der Atemwege gefolgt von Weichteil- und abdominalen Infektionen, siehe Tabelle 1. Der häufigste Erreger ist dabei mit 44,7 %

Escherichia coli, gefolgt von Staphylococcus aureus mit 26,8 %. Den kleinsten Anteil an Erregern der Sepsis machen Pseudomonaden mit knapp 5 % aus, siehe Tabelle 2. Auch wenn sich an den Ursachen der Erkrankung im Laufe der letzten Jahre nur wenig geändert hat, unterliegen die Diagnostik und Epidemiologie einem ständigen Wandel. Mit der erneuten Novelle der Definitionen (Sepsis 3) rückte die Organdysfunktion [4] in den Mittelpunkt der Diagnosestellung. Daraus resultierend erhoffte man sich eine effizientere Erfassung erkrankter Patienten. Im Weiteren wurde auch die Definition des septischen Schocks angepasst. Der septische Schock stellt die Maximalvariante der Sepsis mit der Notwendigkeit einer Katecholamin-Therapie bei volumenrefraktärer Hypotonie sowie einem Serum-Laktat > 2.0 mmol dar [2].

Focus	Sepsis	Schwere Sepsis	Septischer Schock
Infektionen der Atemwege	7,8 %	48,2 %	60,2 %
Weichteilinfektionen/ Knocheninfektionen	17,4 %	20,4 %	25,7 %
Abdominelle Infektionen	11,4 %	18,1 %	25,9 %

Tabelle 1: Infektionsfokus, entnommen aus [1].

Erreger	Häufigkeit in [%]
Escherichia coli	44,7 %
Staphylococcus aureus	26,8 %
Streptokokken	18,7 %
Pseudomonas spp.	4,6 %

Tabelle 2 Häufige Erreger der Sepsis aus [1].

1.2 Epidemiologie

Im Rahmen einer Multicenter-Studie von Brunkhorst et. al [1] aus dem Jahr 2014 wird die Inzidenz der Sepsis in Deutschland auf 106 pro 100.000 Einwohner geschätzt, die der schweren Sepsis mit 84 pro 100.000, sowie die Inzidenz des septischen Schocks mit 23 pro 100.000 Einwohner angegeben. Betrachtet man die geschätzte Letalität, so lässt sich feststellen, dass diese mit 10,5 % für die Sepsis sowie 42,8 % für die schwere Sepsis und 60,5 % für den septischen Schock hoch ist. Unter Anwendung der neueren Sepsis-3-Definition kann die Gesamt Krankenhausletalität mit 50,9 % [9] angegeben werden. Die damit verbundenen Kosten betragen in Deutschland ca. 6,3 Milliarden Euro [1]. Dabei lassen sich direkte Kosten

(Medikamente, Labor, Mikrobiologie, Unterkunft, Behandlungsmaterialien und Personal) von indirekten Kosten (Produktivitätsverlust der Solidargemeinschaft) unterscheiden. Die indirekten Krankenhauskosten im Falle des Versterbens betragen 2,43 Milliarden Euro. Legt man die Gesamtkosten zu Grunde, so werden allein für die Sepsis Therapie rund 30 % des Budgets deutscher Intensivstationen aufgewendet [1]. Somit stellt die Sepsis für das deutsche Gesundheitssystem eine erhebliche Belastung dar.

1.3 Diagnostik

Ein generelles Problem in der Diagnostik der Sepsis stellt die vollständige Erfassung aller Erkrankten dar. Es besteht grundsätzlich ein Restrisiko, erkrankte Patienten nicht rechtzeitig zu erfassen. Betrachtet man Auswertungen der Blutkulturdiagnostik, so gelang nur in 55 % der Fälle ein Erregernachweis, obwohl zum Abnahmezeitpunkt bereits klinische Zeichen für eine schwere Sepsis vorlagen [10]. Zudem konnten auch Unterschiede in den Sepsis-1- bzw. Sepsis-3-Definitionen zu einer inadäquaten Erfassung relevanter Patienten beitragen [9]. Dazu sollte auch die Wichtigkeit von Biomarkern (z.B. PCT) und Entzündungsmediatoren (z.B. IL-1 β , IL-2, IL 6, IL-8, TNF- α , IL-10 usw.) erkannt und dieses Potential für die Patienten genutzt werden. Die frühzeitige Identifikation potenzieller Sepsis-Patienten und die Einleitung einer zielgerichteten effektiven Therapie sind folglich für die Patienten von enormer Bedeutung.

1.4 Antibiotische Therapie

Wie im „Sepsis Bundle“ [11] beschrieben, hat eine zielgerichtete Antibiotika Therapie bereits innerhalb der ersten Stunde nach Diagnosestellung zu erfolgen. Die aktuelle S3 Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften [12] greift diesen Aspekt auf und konkretisiert den Zeitraum bis zum Beginn der antiinfektiven Therapie. Dabei soll so bald als möglich, bis maximal 1 Stunde nach Diagnosestellung, mit der Therapie begonnen werden. Es sollte zunächst eine empirische Breitspektrum Therapie mit einem oder mehreren Antibiotika initiiert werden. Weitere wichtige Aspekte stellen die frühzeitige Deeskalation nach Anschlägen der Therapie, sowie die Sicherstellung adäquater Plasmaspiegel der eingesetzten Antiinfektiva dar (regelmäßige Kontrollen im klinischen Alltag). Auch im Hinblick auf die „Tarragona Strategie“, die die Grundsätze der

Antinfektivtherapie der Sepsis formuliert, weisen Engelmann et. al [13] auf die Bedeutung der „Hit early and hard“ Doktrin hin. Die Relevanz dieser Aussage bestätigen die Ergebnisse von Kumar et. al [14], wobei jede Stunde ohne Antibiotikatherapie (in den ersten sechs Stunden) die Überlebenschance um 7,6 % reduziert. In diesem Zusammenhang sollte darauf geachtet werden, eine Unterdosierung zu vermeiden und regelmäßige Spiegelbestimmungen durchzuführen, auch im Hinblick auf mögliche Volumenverschiebungen bei veränderter Hämodynamik, sowie veränderte Perfusion von Leber und Nieren.

Eine der am häufigsten verwendeten Substanzen auf deutschen Intensivstationen mit 146 Dosen auf 1.000 Patiententagen [15] ist Piperacillin/Tazobactam. Im Rahmen einer Kohortenstudie von Renschmidt et al. [15] wurde hierbei die Anwendungshäufigkeit mehrerer Antibiotika untersucht. Es wurde eine deutliche Zunahme der Piperacillin/Tazobactam - Anwendung (+ 247 %) gezeigt.

Schneider et al. [16] konnten kürzlich relevante Konzentrationsänderungen im Blutplasma von Schweinen für mannigfaltige Antibiotika nachweisen. Unter anderem wurden hier Anhaltspunkte für Interaktionen zwischen Cytosorb und Piperacillin beobachtet. Im Hinblick darauf ist es von Interesse, die Interaktionen von Piperacillin mit Cytosorb im menschlichen Plasma sowie „*in vitro*“ detaillierter zu untersuchen. Zudem spielt Piperacillin eine tragende Rolle in der antiinfektiven Therapie der Sepsis. Da Piperacillin als Kombinationspräparat mit Tazobactam Anwendung findet, lassen sich hier im Rahmen der Untersuchungen somit Aussagen über die Interaktion zweier in ihrer Größe unterschiedlicher Moleküle machen. Hierzu sind in Tabelle 3 einige pharmakologische Kennzahlen dargestellt. Die bakterizide Wirkung von Piperacillin beruht auf der Hemmung der Zellwandsynthese. Das Wirkspektrum umfasst sowohl grampositive als auch gramnegative, anaerobe und aerobe Bakterien, sowie Enterobacter und Pseudomonas aeruginosa. Um eine Wirkungsverminderung durch eine Inaktivierung der β -Lactamase zu verhindern, wird Piperacillin mit Tazobactam kombiniert. Tazobactam agiert hier als Inhibitor der β -Lactamase und verstärkt somit die Wirksamkeit von Piperacillin. Der strukturelle Aufbau ist in Abbildung 1 und Abbildung 2 dargestellt.

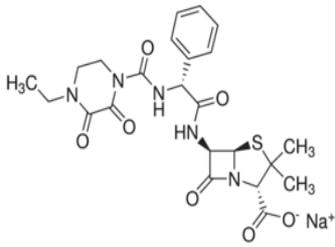


Abbildung 1: Strukturformel Piperacillin [17]

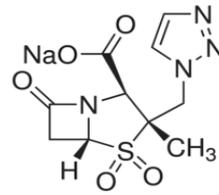


Abbildung 2: Strukturformel Tazobactam[18]

Als eine weitere Referenzsubstanz wurden Antibiotika der Wirkstoffgruppe Carbapeneme ausgewählt. So wurde neben Imipenem vor allem Meropenem untersucht, welches sich vor allem in seiner Größe deutlich von Piperacillin/Tazobactam unterscheidet. Hierbei können die Carbapeneme stellvertretend für kleinere Antibiotikamoleküle auf ihre Interaktion mit Cytosorb untersucht werden. Meropenem ist ein ebenfalls regelmäßig in der Intensivmedizin verwendetes Antibiotikum mit ca. 211 Patientendosen auf 1.000 Patiententage [15]. Seine Wirkung entfaltet Meropenem durch die Inhibierung Penicillin-bindender Proteine (Zellwandsynthese). Es wirkt ebenfalls bakterizid und wird sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Erreger eingesetzt. Im Folgenden sind die Strukturformel in Abbildung 3 sowie relevante pharmakologische Kennwerte in Tabelle 3 aufgeführt.

Um eine suffiziente Antibiotikatherapie sicherzustellen, werden die gemessenen Plasmaspiegel mit der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) abgeglichen. Die MHK stellt somit die untere Grenze für einen effizienten Antibiotika Spiegel im klinischen Setting dar. In Tabelle 4 und Tabelle 5 sind die MHK Werte sowohl für Piperacillin/Tazobactam als auch für Meropenem abgebildet. Im Weiteren werden die MHK Werte als Referenzwerte für einen ausreichend suffizienten Plasmaspiegel herangezogen.

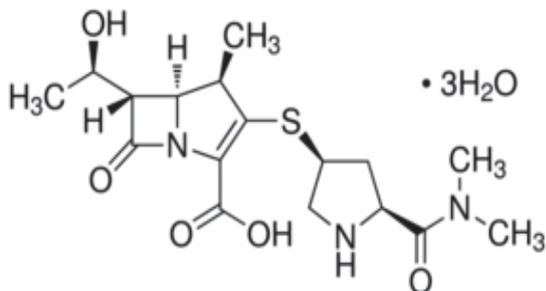


Abbildung 3. Strukturformel Meropenem [19]

Substanz	Piperacillin	Tazobactam	Meropenem
Hersteller /Dosis	Fresenius-Kabi / 4 g	Fresenius-Kabi / 500 mg	Hospira / 500mg
C _{max}	364 µg/ml	34,4 µg/ml	52 µg/ml
Serumhalbwertszeit	0,6-1,2h	0,7-1,2h	1,0 h
Serumproteinbindung	16-21 %	20-23 %	2 %
Elimination	70 % renal, 10-20 % biliär	80 % renal	70 % renal

Tabelle 3 Pharmakologische Kennzahlen Piperacillin/Tazobactam/ Meropenem entnommen aus [17][18]

Minimale Hemmkonzentration (MHK) in mg/l Piperacillin		
Erreger	sensitiv	resitent
Enterobacteriaceae	≤8	> 16
Pseudomonas aeruginosa	≤16	> 16
Grampositive Anaerobier	≤8	> 16
Gramnegative Anaerobia	≤8	> 16
Nicht- speziesbedingte Grenzwerte	≤4	> 16

Tabelle 4: Minimale Hemmkonzentration für Piperacillin, aus [14]

Minimale Hemmkonzentration (MHK) in mg/l Meropenem		
Erreger	sensitiv	resitent
Enterobacteriaceae	≤ 2	> 8
Pseudomonas aeruginosa	≤ 2	> 8
Grampositive Anaerobier (außer C. diff.)	≤ 2	> 8
Gramnegative Anaerobia	≤ 2	> 8
Nicht- speziesbedingte Grenzwerte	≤ 2	> 8

Tabelle 5: Minimale Hemmstoffkonzentration für Meropenem, aus [15]

1.5 Supportive Therapie

Mit Fortschreiten der Sepsis zeigen sich vielfältige Manifestationen der überschießenden Immunantwort mit weitreichenden Konsequenzen für die Gefäßmembranen und die Blutgerinnung. Zudem kommt es zu Mikrozirkulationsstörungen, welche schließlich im septischen Schock münden. Zu den betroffenen Organen zählen unter anderem Herz und Lunge sowie Leber und Nieren. Neben Diagnostik und medikamentöser Therapie benötigen Sepsispatienten zudem eine Volumentherapie, Kreislaufstabilisierung mit Katecholaminen und weitere supportive Maßnahmen [20]. Sollten die Patienten unter akutem Nierenversagen, Hyperhydratation oder pH - Entgleisungen leiden, so wird die Indikation zur Nierenersatztherapie gestellt. Vor allem bei hämodynamisch instabilen Patienten sollte einem kontinuierlichem Nierenersatzverfahren (CRRT/CVVHD) der Vorrang gegeben werden [5]. Wie Definition und Therapie der Sepsis, so durchlebt auch die supportive Therapie einen stetigen Wandel. Im Laufe der 1990er Jahre lag ein Schwerpunkt der supportiven Therapie im Bereich der Hämofiltration. Dazu kamen im Verlauf die „*High Volume Hemofiltration*“ sowie die Anwendung von „*High Cut off*“- Filtern, welche dann später um die Komponente der Hämoadsorption ergänzt wurde. Rimmelé et al [21] fassten die zu Grunde liegenden Mechanismen in den mehreren Thesen zusammen. Zunächst liegen die folgenden Annahmen bezüglich der Pathomechanismen zu Grunde:

Zum einen haben Zytokine als Vermittler von Entzündungsreaktionen potenziell zytotoxische Effekte auf ihre Zielzellen. Zum anderen kommt es bei fortgesetzter Freisetzung von Zytokinen zu einer „Immunparalyse“, unabhängig davon, ob eine virale oder bakterielle Infektion zu Grunde liegt.

Eine möglichst effektive Therapie sollte demnach auf die Reduktion proinflammatorischer Mediatoren abzielen. Rimmelé et al. [17] zeigten mehrere mögliche Ansatzpunkte auf. Ein möglicher Ansatz ist die Zytokinkonzentrationen vor allem zu Beginn zu senken, um eine weitere Aktivierung der Entzündungskaskade effizient zu unterbinden. Des Weiteren verweisen die Autoren darauf, dass eine Elimination von freien Zytokinen aus dem Plasma gleichzeitig auch die Zytokinspiegel im Gewebe senkt, da diese einem Konzentrationsgradienten unterliegen.

Eine ähnliche Option ist es, den lymphatischen Fluss im Gewebe z.B. mit großen Volumina unter einer „*Highflow Hämofiltration*“ (HVHF: Volumen >35 ml/kg/h) zu vergrößern, um somit ebenfalls eine Reduktion zellulärer Zytokine zu erreichen. Daraus resultierend entwickelte sich der Therapieansatz der Hämoadsorption. Ein Ziel hierbei ist es, durch die Adsorption von Zytokinen an einem Hämoadsorber vergleichbare Effekte bei niedrigerem Volumenumsatz zu erreichen. Viele Entzündungsmediatoren haben ein mittleres molekulares Gewicht im Bereich von 5- 60 kDA. Somit erscheint der Einsatz von Hämoadsorbern mit diesem Absorptionsspektrum vom Wirkprinzip her sinnvoll.

Um eine möglichst hohe Affinität für Zytokine zu erzeugen, wird eine Kombination unterschiedlichster Bindungskräfte genutzt. Hierbei kommen sowohl Wasserstoffbrückenbindungen als auch Van der Waals-Kräfte zum Einsatz. Zudem wirken auch Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen auf potenzielle Solventen. Seit einigen Jahren gibt es vermehrt Filter- und Adsorbersysteme, die vor allem bei Patienten im Multi-Organ-Versagen (MOV) Anwendung finden und für die Nutzung mit kontinuierlichen Nierenersatzverfahren zugelassen sind. Neben der Firma Cytosorb Inc. erlangte auch die Firma Baxter (Deerfield, IL, USA,) eine Zulassung für einen Hämoadsorptionsfilter („OXiris“) im Kampf gegen die globale Corona- Pandemie. So konnte, wenn auch noch mit kleinem Patientenkollektiv, die Effizienz einer Hämofiltrationstherapie bei durch virale Erreger ausgelöste Erkrankungen gezeigt werden [22, 23].

1.6 Cytosorb Therapie

Die Firma Cytosorb Inc. (NJ 08852 USA) entwickelte im Jahr 2012 ein neuartiges Filtersystem zur Elimination von Zytokinen [7] in Verbindung mit Hämodialyse und ECMO Geräten. Zur Anwendung kommt eine Kartusche mit 300 ml Fassungsvermögen, welche in den extrakorporalen Kreislauf der Dialyse bzw. der Membran-Oxygenierung integriert wird. Das Grundgerüst bilden hochporöse „adsorber beads“, bestehend aus Polystyrol-Divenylbenzol, in einer isotonischen Natriumchlorid Lösung (Abbildung 4 und Abbildung 5). Die Partikel haben eine Größe von durchschnittlich 450 µm Durchmesser sowie eine sehr große Oberfläche von

850 m²/g [24]. Weitere Referenzwerte sind in Tabelle 6 dargestellt. Unter Berücksichtigung dieser Werte ergibt sich für eine Cytosorb Kartusche eine Fläche von > 45.000 m² welche für die Adsorption von unterschiedlichsten inflammatorischen Substanzen zur Verfügung steht. Cytosorb bindet unter anderem Zytokine, DAMP (damage-associated molecular patterns), PAMP (pathogen-associated molecular patterns), Anaphylatoxine sowie Chemokine und Moleküle bis zu einer Größe von 60 kDa. Auch unterschiedliche Interleukine (IL-10, IL-8, IL-6 IL-1ra, IL-1a), Tumornekrosefaktor α und γ sowie Hämoglobin und Myoglobin werden gebunden [8].

Hierbei kommen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen zum Tragen. Die Adsorption erfolgt relativ unspezifisch, da vor allem die Molekülgröße maßgeblich über eine mögliche Adsorption entscheidet. In Analogie zum HVHF Verfahren erfolgt die Bindung an die Filtersubstanz in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradienten. Da mit fortschreitender Infektion vor allem Zytokine und andere Mediatoren höhere Plasmaspiegel aufweisen, erfolgt die rasche Adsorption dieser. Eine Elimination physiologischer Mediatoren, mit niedrigeren Plasmaspiegeln kann somit vermieden werden.

Die Zulassung der Cytosorbfilter umfasst die supportive Therapie von Sepsis- Patienten, mit und ohne Schock, im Rahmen einer Hämofiltration, darüber hinaus auch die Anwendung mit Herz-Lungen Maschine (HLM) und extrakorporaler Membran-Oxygenierung (ECMO)[25]. Zudem auch systemische Entzündungszustände, wie zum Beispiel nach ausgedehnten kardiochirurgischen Eingriffen (z. B. koronare Bypass-OPs). Auch die Elimination von nicht dialysefähigen Substanzen (z.B. Neuroleptika, Sedativa, Antidepressiva) im Falle einer Überdosierung wurde als ein mögliches Anwendungsgebiet der Cytosorb Filter diskutiert. So wurde kürzlich die Zulassung zur Anwendung bei Überdosierungen mit direkten oralen Antikoagulantien (z.B. Rivaroxaban) und Thrombozytenaggregationshemmern (z.B Ticagrelor) durch die US Zulassungsbehörde (FDA) [26] erteilt.

In der klinischen Anwendung können Cytosorbfilter bis zu 24 h kontinuierlich am Patienten eingesetzt werden. Dabei können Blutflussraten zwischen 150-700 ml/min erreicht werden. Eine umfangreiche Vorbereitung, die über den Einbau in den extrakorporalen Blutkreislauf hinausgeht, ist nicht notwendig. Weitere relevante Behandlungsdaten sind in Tabelle 6 dargestellt.

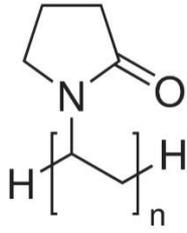


Abbildung 4: Polyvinylpyrrolidon als Strukturelement der substratbindenden Oberfläche von Cytosorb [27]

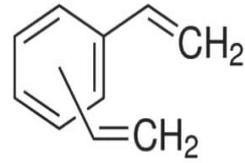


Abbildung 5: Divinylbenzol als weiteres Strukturelement der substratbindenden Oberfläche von Cytosorb [28]

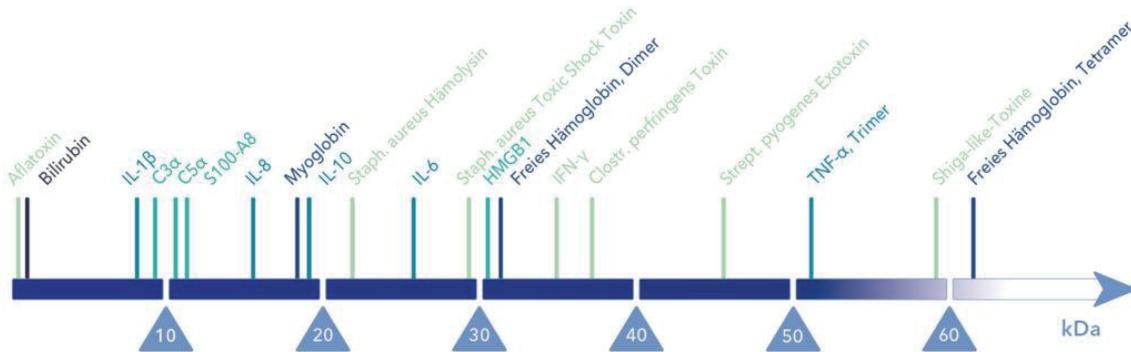


Abbildung 6: Absorptionsspektrum Cytosorb [8]

Legende: (grün- PAMPs, Dunkelblau- Stoffwechselprodukte, Türkis- Zytokine)

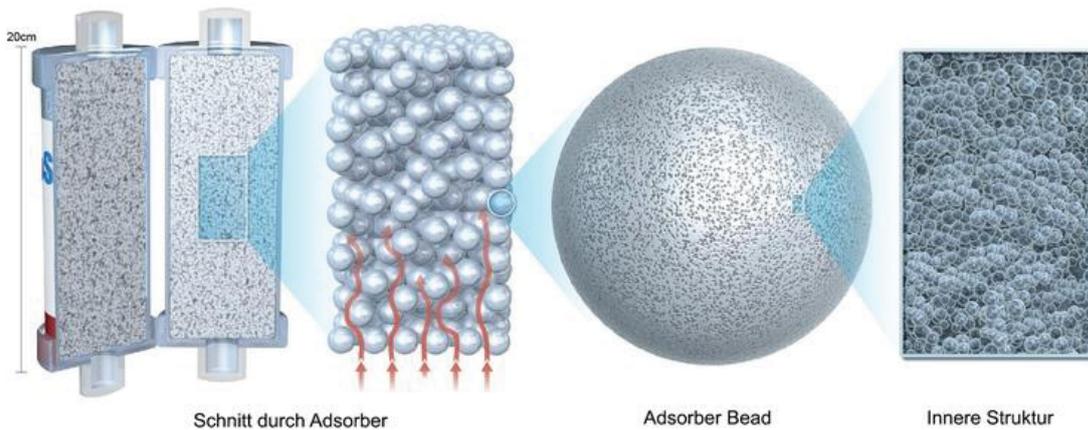


Abbildung 7: Aufbau Cytosorb [8]. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Referenzwerte Cytosorb	
Durchmesser	450 µm
Porösität	67 %
Dichte	1.02g/cm ³
Porendurchmesser	0.8-5 nm
Oberfläche	850 m ² /g
Absorptionsspektrum	10- 60 kDa

Tabelle 6: Referenzwerte Cytosorb [8]

Technische Details	
Extrakorporales Blutvolumen	150 ml
Blutflussrate min – max	100 – 700 ml/min
Empfohlene Blutflussrate	150 – 700 ml/min
Max. Behandlungsdauer	24 Stunden
Antikoagulation	Heparin oder Citrat möglich
Sterilisation	Gammasterilisation
Lagerungsbedingungen	1° bis 40°C; aufrecht lagern
Maximale Druckgrenze	760 mmHg
Flusswiderstand	(Hkt 23 +/- 3 % bei 37+/- 1°C) Qb <= 700 ml/min 140 mmHg Qb <= 500 ml/min 090 mmHg Qb <= 200 ml/min 030 mmHg
GMDN Code:	34422 – Haemoperfusion system adsorption column

Tabelle 7: Technische Daten des Cytosorb-Absorbers [8]

1.7 Studien zum klinischen Einsatz von Cytosorb

Mit dem zunehmenden Einsatz der Zytokinadsorbentien ergeben sich weitere Fragestellungen, welche Gegenstand der aktuellen Forschung sind. Nachdem ein positiver Effekt für Patienten im septischen Schock unter anderem durch Kogelmann et al [29], Rugg et al. [30] und Schultz et al. [31] nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage nach weiteren möglichen Anwendungsgebieten jenseits der Sepsis. Santer et. al. [32] zeigten hierbei die Möglichkeit zum Einsatz von Cytosorbfiltern nach kardiochirurgischen Eingriffen, wenn auch mit einer geringen Fallzahl. Ebenso scheint ein Einsatz zur Elimination von nicht dialysegängigen Substanzen in der Akutversorgung ein weiteres Anwendungsgebiet zu sein [33]. Willem et al [34] konnten positive Auswirkungen auf die 28 Tage Mortalität von Intensivpatienten im Septischen Schock zeigen. Einen guten Überblick über die aktuellen Anwendungsgebiete und der Effizienz der Cytosorbtherapie gibt auch das 2021 etablierte Cytosorb Register [35]. Dabei werden ebenfalls Anwendungen bei Leberversagen, Pankreatitis, Trauma und ARDS Patienten beschrieben.

Das zunehmend breite Einsatzgebiet von Cytosorb wirft die Frage auf, ob auch therapeutisch relevante Moleküle, insbesondere Arzneimittel, an Cytosorb adsorbiert und damit möglicherweise im Sinne einer unerwünschten Interaktion aus dem Blut entfernt werden. Dieser Fragestellung näherten sich Schneider et al [16]. Die Forschungsgruppe analysierte die Auswirkung der Therapie auf die Plasmaspiegel von antiinfektiven Substanzen. Im Rahmen der Untersuchung konnten Auswirkungen z.B. auf die Elimination von Piperacillin (+19 % unter Cytosorb Anwendung) gezeigt werden. In diesem Kontext konnten auch Auswirkungen auf andere klinisch häufig angewendete antibakterielle Substanzen wie z.B. Fluconazol, Metronidazol, Ceftriaxon und Flucloxacillin nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden am Schwein durchgeführt. Es ergibt sich hier die Notwendigkeit, diese Interaktionen sowohl am Patienten als auch in vitro näher zu analysieren.

2. Problemstellung

Der Effekt einer Cytosorbtherapie auf die Zytokinspiegel ist gut belegt. Auf Grund der großen Kontaktoberfläche der Cytosorb Kartusche und den vorbeschriebenen Bindungseigenschaften erscheint es aber wahrscheinlich, dass es auch zu relevanten Interaktionen mit anderen Substanzen kommt. Im Rahmen der Produktbeschreibung des Herstellers von Cytosorb wurde zudem von der Elimination vieler weiterer größerer Moleküle, unter anderem Hämoglobin, Myoglobin und Albumin, wie auch niedermolekularer Verbindungen berichtet. Im klinischen Setting sind vor allem Antiinfektiva von besonderem Interesse. Allerdings sind die Erfahrungen hierzu noch sehr gering.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher diese Fragestellung aufgegriffen und am Beispiel eines besonders häufig genutzten und bei der Sepsis wichtigen Breitbandantibiotikums (Piperacillin/Tazobactam) untersucht. Dabei wurden sowohl die Inkubationsbedingungen als auch die Auswirkungen, wie zum Beispiel reduzierte Plasmaspiegel auf Grund einer Nierenersatztherapie, berücksichtigt. Zusätzlich wurden weitere gebräuchliche Substanzen (z.B. Meropenem) unter gleichen Bedingungen untersucht. In diesem Zusammenhang wurden zusätzlich die Absorptionseigenschaften von Cytosorb mit der von Aktivkohle, einem sehr lange bekannten „klassischen“ Adsorber, verglichen. Hierbei wurde eine Sättigungskinetik zur Abschätzung der Filterkapazität durchgeführt. Um das Zusammenwirken der verschiedenen Determinanten zu analysieren, wurde ein stark vereinfachtes Modell entwickelt, das eine „*in vitro*“ Simulation ermöglicht. An diesem wurde auch die Reversibilität der Antibiotikabindung an Cytosorb untersucht.

2.1 Hypothesen

Es lassen sich aus der Problemstellung die folgenden Hypothesen ableiten:

1. Im Rahmen der Cytosorbtherapie kann es bei Patienten im septischen Schock unter CVVHD Therapie zu einer Reduktion der Plasmaspiegel angewendeter Antibiotika kommen.
2. Es erfolgt keine (allenfalls nur sehr geringe) Freisetzung der initial gebundenen Substanzen.
3. Die Antibiotikabindung an Cytosorb erfolgt mit einer mehr oder weniger großen Spezifität, d.h. nicht alle Antibiotika werden in gleichem Umfang gebunden.

3. Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und Versuchsanordnungen näher erläutert.

3.1 „*In vivo*“ Untersuchungen

Im Rahmen der für die vorliegende Arbeit durchgeführten „*in vivo*“ Untersuchungen wurden Patienten postoperativ nach verschiedenen medizinischen Eingriffen untersucht. Dazu wurden Patienten der chirurgischen Intensivstation (CI-A/B) der Universitätsklinik Düsseldorf im Zeitraum September 2015 bis Februar 2016 evaluiert und gemäß den untenstehenden Einschlusskriterien als Studienpatienten identifiziert. Ein Ethikvotum durch die Ethikkommission, welches bereits im Rahmen der von Prof. Dr med. Kindgen-Milles durchgeführten Studie positiv bewertet wurde, lag zum Zeitpunkt der Datenerhebung vor (Studiennummer: 4907R; ID 2014123037).

Für die vorliegende Arbeit wurden 24 Patienten untersucht, die die folgenden Kriterien erfüllten:

- Entscheidung zur antibiotischen Therapie < 24 Stunden
- Indikation zur Dialysetherapie (CVVHD)
- Anurie (Restausscheidung < 500 ml/24 Stunden)
- Patientenalter \geq 18 Jahre
- Ausschluss einer Schwangerschaft

Nicht untersucht wurden:

- hämodynamisch instabile Patienten
- Patienten, die eine Blutentnahme von > 50 ml/ 24 Stunden nicht kompensieren können,
- fehlende Einwilligung

Die Patienten wurden in verschiedenen Gruppen zusammengefasst, die in Tabelle 8 dargestellt sind.

Gruppe	Anzahl
CVVHD nativ	1
CVVHD mit Imipenem	10
CVVHD mit Piperacillin	5
CVVHD mit Imipenem + Cytosorb	7
CVVHD mit Piperacillin + Cytosorb	1
Gesamt:	24

Tabelle 8: Überblick der Patienten

Aufbau der „in vivo“ Untersuchungen

Entsprechend der klinischen Situation der Patienten erfolgte die Indikation zur Installation des Cytosorb - Filters an der CVVHD (Abbildung 8). Die Applikation des Piperacillin/Tazobactam erfolgte leitlinienkonform. Die i.v. Infusion wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden die Blutproben entnommen. Hierbei gab es je Entnahmezeitpunkt drei (ohne Cytosorb) bzw. mit Cytosorb vier Blutabnahmen (Abbildung 9). Im weiteren erfolgte eine stündliche Probenentnahme. Alle Proben wurden pseudonymisiert und nach Versuchsende in das Institut für Pharmakologie transportiert. Während der Probenentnahme wurden die Dialyseparameter möglichst konstant gehalten (Tabelle 9). Die Entnahme erfolgte an drei aufeinander folgenden Behandlungstagen über jeweils einen Behandlungszyklus mit Piperacillin/Tazobactam.

Dialyse

Für die klinischen Einsatz wurden ausschließlich CVVHD Geräte der Firma Fresenius genutzt. Dabei wurde der Cytosorbfilter in Reihe mit dem Dialysefilter angeschlossen und somit in den Dialysekreislauf integriert (Abbildung 8). Die Nutzungsdauer des Filters wurde auf 24 Stunden begrenzt. Die Antikoagulation während der CVVHD - Anwendung wurde mit Calciumcitrat durchgeführt. Zu Behandlungsbeginn wurden die initialen Dialyseparameter (Tabelle 9)

konfiguriert. Im weiteren Behandlungsverlauf wurden diese, wenn notwendig, individuell an den Patientenzustand angepasst.

Dialyseparameter zu Behandlungsbeginn	
Gerät	Fresenius Multi Filtrate
Blutfluss	80 – 120 ml/h
Dialysatfluss	1600 ml/h
Ultrafiltrat	200 ml/h
Filterstandzeit	0 – 24 h

Tabelle 9: Dialyseparameter CVVHD

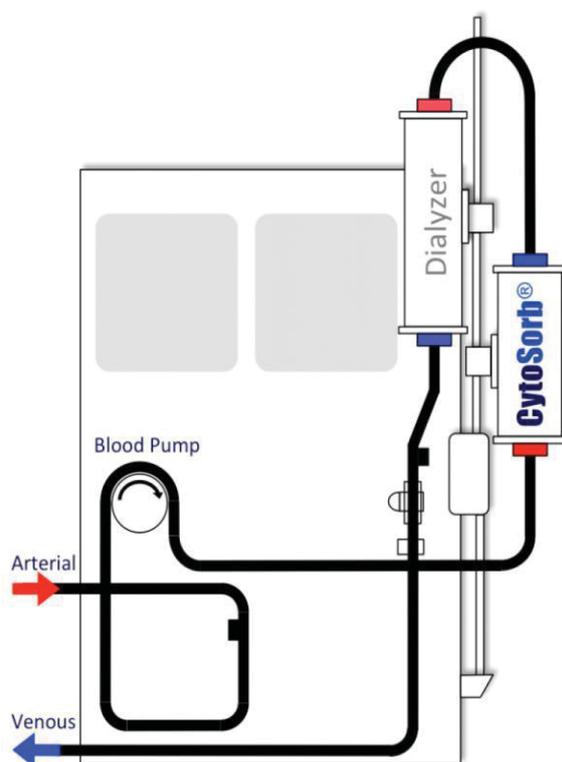


Abbildung 8: schematischer Dialysekreislauf [8]

Probenentnahme

Vor Beginn der Dialysebehandlung wurde eine erste Probe („Leerwert“) entnommen, um den Ausgangswert von Piperacillin/Tazobactam zu ermitteln. Die Antibiotikaapplikation erfolgte als Kurzinfusion mit einer Dauer von 30 Minuten. Im Weiteren erfolgten die repetitiven Gaben des Antibiotikums mittels Perfusor, um mögliche äußere Einflüsse zu minimieren und eine kontinuierliche Applikation zu gewährleisten.

Im Anschluss an die initiale Antibiotikagabe erfolgte die Entnahme der zweiten Probe (T0= unmittelbar nach Beendigung der Antibiotika Infusion). Alle weiteren Proben wurden stündlich mittels Vacutainer (Fa. Becton Dickinson) entnommen.

Zu jedem Entnahmezeitpunkt (T0 - T8) wurden Proben an drei bzw. vier Stellen des Dialysekreislaufs entnommen (Abbildung 9):

- Prä: abgehender Schenkel der Dialyse, direkt an der Konnektionsstelle
- CS: direkt nach Durchlaufen des Cytosorbfilters (nur bei der Gruppe mit Cytosorb)
- Post: zuführender Schenkel, unmittelbar an der Konnektionsstelle
- UF: Ultrafiltrat aus dem Dialysat

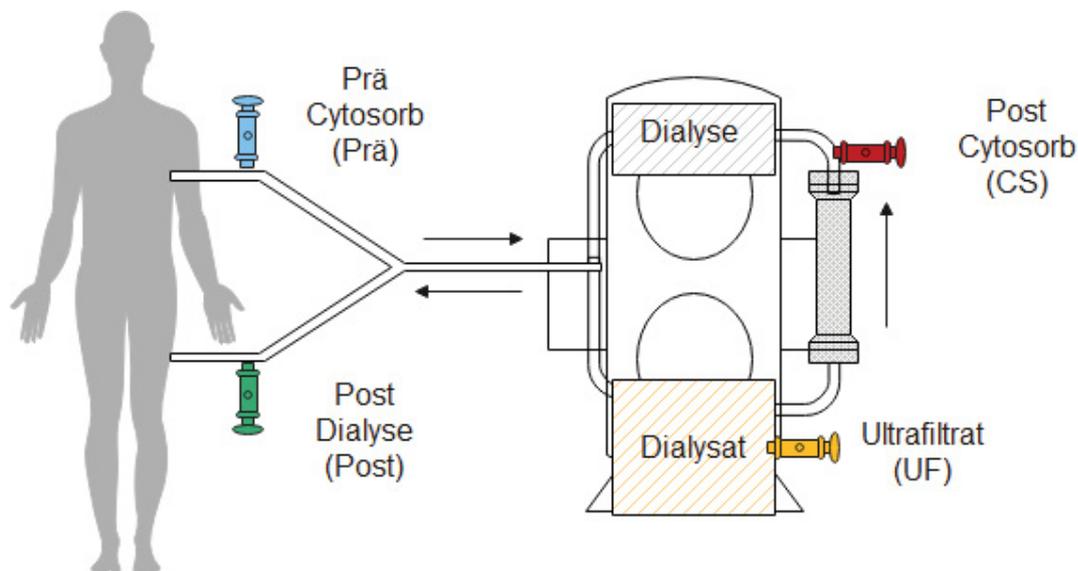


Abbildung 9: schematisierte Darstellung der Probenentnahmepunkte.
Die Flussrichtung des Blutes ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Im Anschluss erfolgte der Transport in das Institut für Pharmakologie. Zur weiteren Aufbereitung und anschließende Verarbeitung der Proben.

Aufbereitung der Proben aus der Klinik und der „in vitro“ Versuche

Nach Übernahme der Proben aus der Klinik wurden diese mit 1600xg für 10 Minuten zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei – 80 °C gelagert. Vor der Messung wurden die Proben proteinfrei präpariert. Dazu wurden 200 µl Plasma mit 200 µl NaCl gevortext. Im

Anschluss wurde das Protein mit 800µl 4 °C kaltem Acetonitril (ACN) mit 1520xg für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der proteinfreie Überstand wurde abgenommen und mit 2 ml Dichlormethan (DCM) für 30 Sekunden mittels Vortex ausgeschüttelt. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation mit 3000xg für 10 Minuten bei Raumtemperatur mittels Standzentrifuge. Nach dieser Extraktion wurde der daraus resultierende Überstand in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen.

Im Rahmen der „*in vivo*“ Untersuchungen ergaben sich die Hinweise auf eine mögliche Unterschreitung der therapeutischen Plasmaspiegel der Antibiotika (siehe Ergebnisse). Diese Unterschreitung zeigte sich ebenfalls bei den mit dem Cytosorbfilter behandelten Patienten. Infolgedessen wurden ins Detail gehende Untersuchungen unter strikt kontrollierten Bedingungen „*in vitro*“ durchgeführt.

3.2 „*in vitro*“ Versuche

Versuchsbedingungen und Versuchsaufbau

Das Ziel der Untersuchungen war es, die Bindung von Piperacillin und anderen β -Lactam-Antibiotika an Cytosorb zu untersuchen. In diesem Kontext mussten mehrere Faktoren Berücksichtigung finden (z.B. Temperatur, Inkubationszeit usw.). Zunächst wurde in Vorversuchen die optimale Versuchsdauer ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass bei einem Beobachtungszeitraum > 60 Minuten keine wesentlichen Änderungen der Interaktionen zwischen den Antibiotika und Cytosorb nachgewiesen werden konnten. Der für die Untersuchung der Interaktionen relevante Zeitraum war demnach das Zeitintervall zwischen 0- 60 Minuten. Infolgedessen wurden alle weiteren Versuche im Hinblick auf die Inkubationszeit mit 60 Minuten Inkubation durchgeführt. Zur Standardisierung der Inkubationsbedingungen wurde zudem die Auswirkung unterschiedlicher Temperaturen untersucht. Im Hinblick auf die klinische Anwendung von Cytosorb, welches als Filter an der CVVHD genutzt wird, erscheint es sinnvoll, die Messungen bei 25- 37°C, „*in vitro*“ durchzuführen. Um den regelmäßigen Durchfluss von Plasma zu simulieren, wurden alle Proben im Abstand von 15 Minuten mittels Vortex für 10 sec. durchmischt. Die Entnahme der Proben erfolgte 15 Minuten nach dem letzten Durchmischen.

Vorbereitung:

Für alle folgenden Versuche wurde eine Stammlösung der Antibiotika hergestellt. Hierzu wurden die Substanzen in einer Konzentration (80 mg/ml) vorbereitet und nach Bedarf entsprechend verdünnt. Die Standardlösung wurde als Charge abgefüllt und bei -80 °C gelagert. Je nach Versuchsansatz wurden die Antibiotika mit plättchenarmem Plasma (PAP-anonymisiertes Restmaterial für Forschungszwecke aus der Blutbank) oder isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) verdünnt und inkubiert. Für die Versuchsreihen mit Cytosorb wurde in 1,5 ml Eppendorf Cups je 500 mg Cytosorb eingewogen und mit 500 µl 0,9 % NaCl Lösung zur Lagerung überschichtet. Vor Versuchsbeginn wurde der NaCl-Überstand abgehoben und durch Antibiotika in entsprechender Zielkonzentration ersetzt. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Cytosorb - Überstand abgehoben und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Analoge Vorversuche wurden auch mit Penicillin G und Imipenem in unterschiedlichen Konzentrationen und Temperaturen durchgeführt

3.2.1 Sättigungskinetik

Sättigungskinetik mit Cytosorb

Zur Kapazitätsbestimmung wurden Versuche mit steigenden Konzentrationen Piperacillin/Tazobactam bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Es wurden je Doppelbestimmungen in entsprechenden Konzentrationen Piperacillin/Tazobactam und Meropenem (Tabelle 10) auf 500 mg Cytosorb gegeben, für 60 Minuten inkubiert und mittels Vortex aufgeschüttelt. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Überstand frei von Cytosorb abpipettiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels HPLC. Der Versuchsverlauf wurde dahingehend vereinfacht, dass die Proben im weiteren Verlauf bei vollständiger Absorption auf relevante Konzentrationen reduziert wurden. Parallel zur Bestimmung der Piperacillinspiegel erfolgte die Analyse der Tazobactamspiegel. Analog hierzu wurde weiterhin eine Sättigungskinetik für Meropenem durchgeführt.

Übersicht Konzentrationen [mg/ml]																	
Piperacillin	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5	1	1,45	2	4	5	6	8	10	20	30	40
Tazobactam	0,003125	0,00625	0,0125	0,025	0,1	0,1	0,125	0,18125	0,25	0,5	0,625	0,75	1	1,25	2,5	3,75	5
Meropenem	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5	1	2	10	20	30	40					

Tabelle 10: Konzentrationen Sättigungskinetik

Sättigungskinetik mit Aktivkohle

Analog zur Sättigungskinetik mit Cytosorb erfolgten weitere Vorversuche und Versuche mit Aktivkohle. Hierbei wurden 500 mg Aktivkohle in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit Piperacillin/Tazobactam für 60 Minuten inkubiert und alle 15 Minuten mittels Vortex aufgeschüttelt. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Überstände mittels HPLC.

Sättigungskinetik in verschiedenen Medien (NaCl/PAP)

Im Rahmen der Sättigungsversuche wurden unterschiedliche Versuchsreihen in NaCl 0,9 % bzw. plättchenarmem Plasma (PAP) inkubiert und die Konzentrationen im Überstand bestimmt.

3.3 Simulation einer CVVHD im Labormaßstab

Um die Konzentrationsveränderungen der CVVHD „in vitro“ zu analysieren, wurde ein vereinfachtes Modell etabliert (Abbildung 11). Es wurden dafür zwei Rollerpumpen, zwei Zellkulturgefäße (Volumen 200/500 ml), ein Stativ, sowie ein Magnetprüher und ein Ablaufgefäß verwendet. Die Verbindung der einzelnen Kompartimente erfolgte mittels Tygenschläuchen. Eine Cytosorb Kartusche (5 ml) (Abbildung 10) wurde aus zwei Einmalinjektionsspritzen (2 ml) nachgebildet. Das Verhältnis des zirkulierenden Blutvolumens zum Inhalt der Kartusche wurde entsprechend verkleinert. Die Elimination (Dialyse) wird in diesem System durch einen Ablauf, der durch eine Rollerpumpe konstant gehalten wird, simuliert (Abbildung 11). Die in diesem System gewählte „Dosierung“ wurde in Analogie an die klinische Dosierung unter Berücksichtigung des Modellmaßstabs (Verteilungsvolumen Patient vs. Verteilungsraum im Modell) angepasst.

Durchführung:

200 ml NaCl mit 325 µg/ml Piperacillin (entspricht c_{max} .) wurden vorbereitet und folgende Kompartimente wurden nachgebildet:

1. Zulauf: (0,2 l/h) = Medium: NaCl 0,9 %
2. Kreislauf: entsprechend dem zirkulierenden „Blutvolumen“ mit c_{max} . Piperacillin
3. Zirkulation über den Cytosorbfilter im Nebenschluss (5 ml/min)
4. Ablauf: Entspricht dem aus der Dialyse erzeugtem Ultrafiltrat.

Da alle Patienten keine relevante Restharnausscheidung aufwiesen (siehe Einschlusskriterien oben), entspricht das hier erzeugte Ultrafiltrat der Ausscheidung (= Elimination).

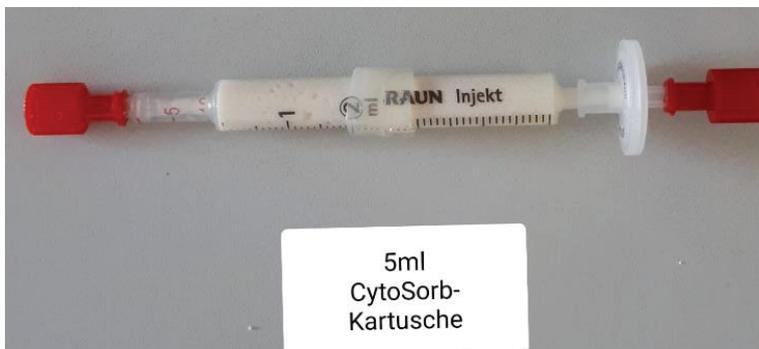


Abbildung 10: Cytosorb Kartusche(Eigenherstellung).

Die zwei Kunststoffteile der Spritzen wurden durch einen kurzen Silikonschlauch verbunden.

Versuchsaufbau:

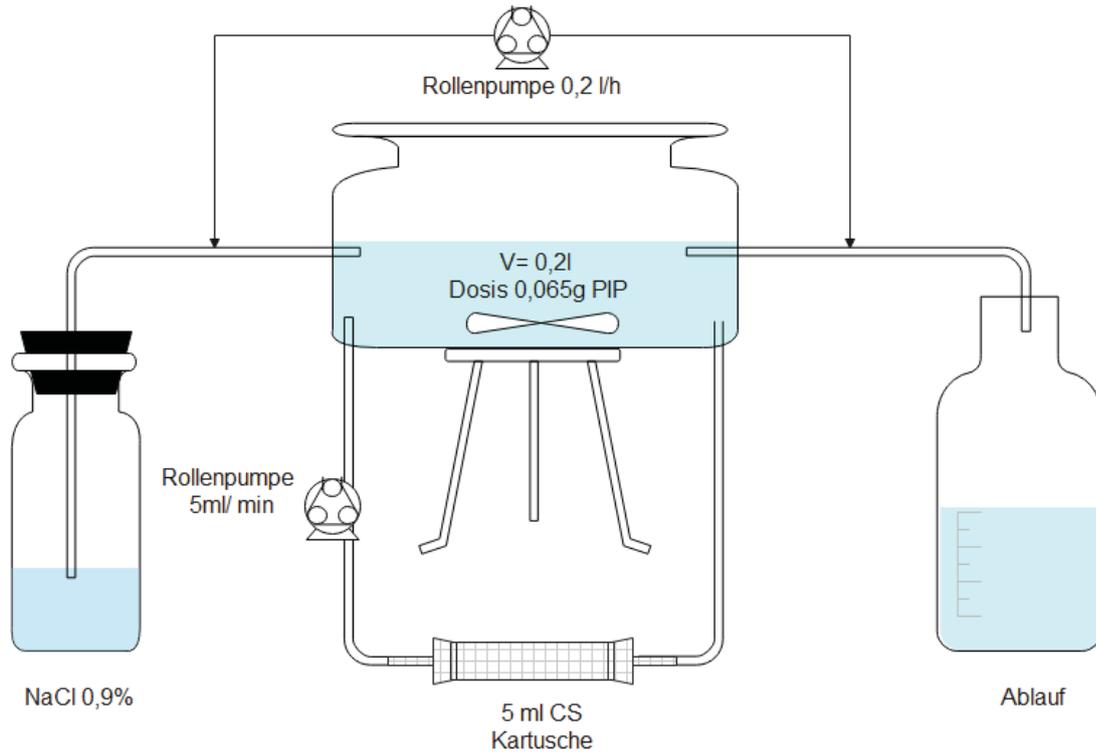


Abbildung 11: Schematische Darstellung Simulationsversuch PIP

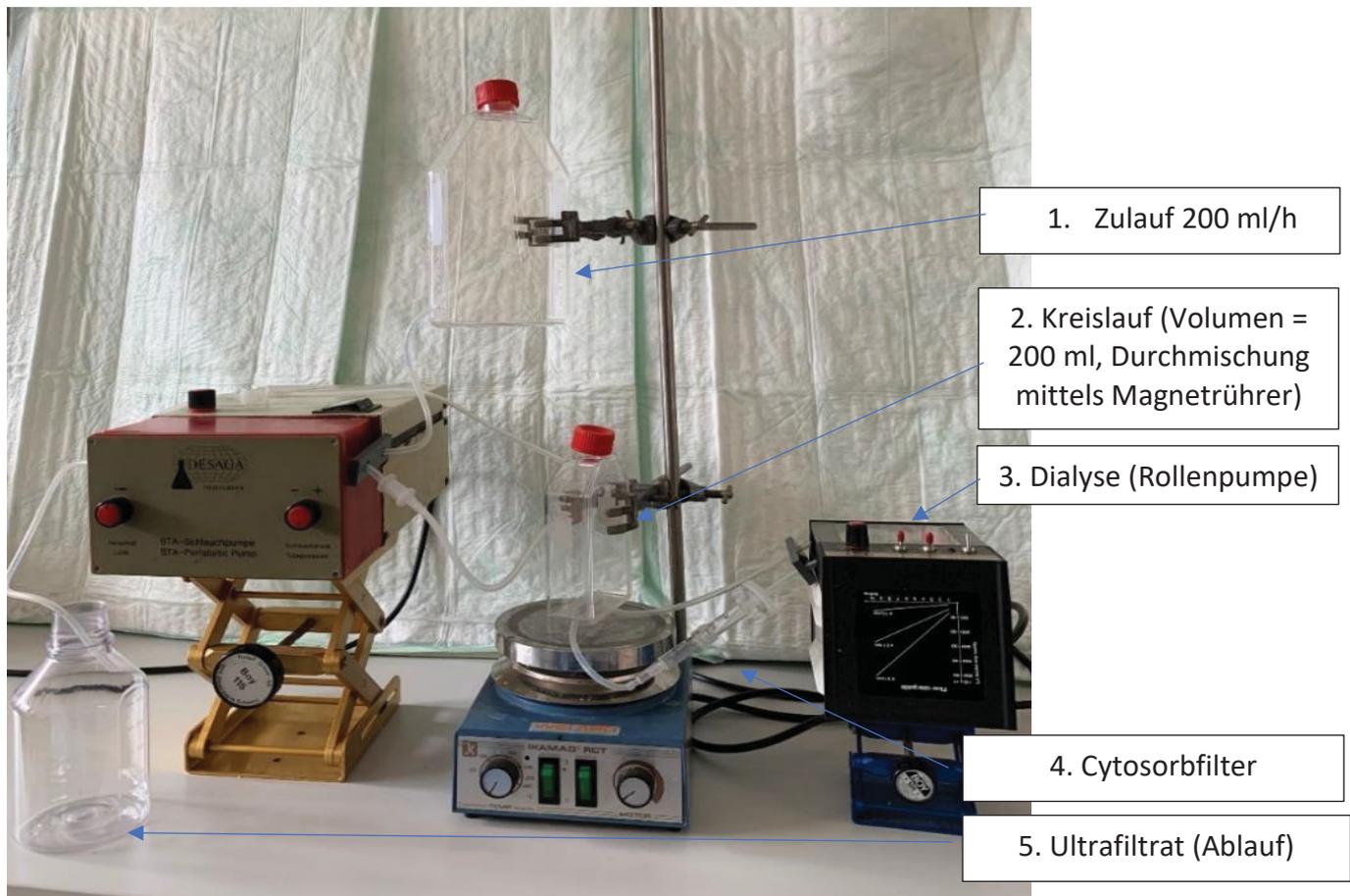


Abbildung 12: Versuchsaufbau Piperacillin/Tazobactam im Umlaufversuch

Untersuchung zur Reversibilität der Cytosorb Bindung

Die über Nacht bei 4- 8 °C gelagerte Kartusche wurde am nächsten Versuchstag in ein antibiotikafreies System eingebaut. Im Anschluss erfolgte eine Spülung mit Plasma/ 0,9 % NaCl für einen Zeitraum von 360 Minuten mit 1 ml/min bei RT. Entnahmezeitpunkte waren 0-15-30-45-60-90-120-180-240-300-360 Minuten. Die Bestimmung der Piperacillin Konzentration erfolgte mittels HPLC.

Langzeitsimulation mit Cytosorb

Im klinischen Setting erfolgte die intravenöse Antibiotikaapplikation alle 480 Minuten. Da im Zeitraum zwischen 360 Minuten bis 480 Minuten die Plasmaspiegel konstant waren, wurde für den „*in vitro*“ Versuch ein Zeitraum von 360 Minuten festgelegt. Während eines Simulationsdurchlaufs von 360 Minuten wurden zu den Zeitpunkten 0-15-30-45-60-90-120-180-240-300-360 Minuten je 200 µl aus dem Reservoir entnommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels HPLC. Die Simulation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. In Analogie dazu erfolgte die Inkubation mit Cytosorb. Nach Beendigung des Versuchsdurchlaufes wurde die Cytosorb Kartusche über Nacht bei 4- 8 °C im Dunkeln gelagert und am nächsten Versuchstag unter gleichen Bedingungen wieder verwendet.

Es erfolgten kumulativ 12 Durchläufe. Im Hinblick auf den erheblichen Versuchsaufwand (lange Versuchsdauer) wurde dieser Versuch einmalig durchgeführt.

3.4 „*In vivo*“/ „*in vitro*“ Versuche mit Imipenem

Im Rahmen der mit Imipenem durchgeführten Vorversuche konnten zuverlässige Messwerte im Hinblick Temperatur und Versuchsdauer („*in vitro*“) ermittelt werden. Im klinischen Setting jedoch konnte auch unter optimierten Bedingungen (zügigere Probenanalyse) keine validen Messwerte ermittelt werden. So dass die Messungen nicht weiter fortgesetzt wurden.

3.5 Bestimmung der Antibiotikakonzentrationen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bestimmung Piperacillin/Tazobactam:

Folgende Komponenten wurden für das HPLC - System verwendet:

- Merck Hitachi La Chrom Pumpe L-7100
- Thermo Fischer Spectras System UV1000 Detektor,
- Nucleodur C18 Gravity Säule (250 mm/4,6 mm, 5 µm)
- Nucleodur Vorsäule (gleiches Material)

Die Verarbeitung der Messdaten erfolgte mittels Chromulan – Software (Fa. PIKRON, Prag).

Zur Bestimmung von PIP/TAZ wurde ein Gradient mit einem Eluenten A: 97 % 10 mM NaH₂PO₄ (mit Phosphorsäure auf pH 2,7 eingestellt) und 3 % Acetonitril (v/v) sowie mit einem Eluenten B: 10 % 10 mM NaH₂PO₄ (mit Phosphorsäure auf pH 2,7 eingestellt) und 90 % Acetonitril (v/v) verwendet.

Die Eluenten wurden mittels Membranfilter (0,2 µm- ZAPCAP-CR, Sigma) gefiltert und mit Helium entgast. Das Chromatogramm wurde mit einem linearen Gradienten von 95 % Eluent A und 5 % Eluent B zu 50 % Eluent A und 50 % Eluent B in 14 Minuten gefahren. In einem weiteren linearen Verlauf wurde das Chromatogramm in 2 Minuten wieder auf 95 % Eluent A und 5 % Eluent B zurückgefahren. Die Flussrate betrug 1,5 ml/min, das Probenvolumen von 20 µl wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur. 100 µg/ml Penicillin G wurde als interner Standard eingesetzt.

Bestimmung Meropenem

Folgende Komponenten wurden für das HPLC System verwendet:

- Merck Hitachi La Chrom Pumpe L- 7100
- Merck Hitachi La Chrom Autosampler L-7250
- Merck Hitachi La Chrom Säulenofen L-7360
- Merck Hitachi La Chrom Dioden Array Detektor L- 7455
- Merck Hitachi La Chrom Interface D-7000 mit HSM Software
- Nucleodur C 18 Gravity Säule (250 mm/4,6 mm 5 µm)
- Nucleodur Vorsäule (gleiches Material)

Die mobile Phase bestand aus 90 % 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4 (mit 10 mM NaOH eingestellt) und 10 % Acetonitril (v/v). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Das Probenvolumen von 20 µl wurde bei einer Wellenlänge von 300 nm detektiert. Die Trennung erfolgte bei 40 °C. Es wurden 40 µg/ml Ciprofloxacin als interner Standard verwendet.

3.6 Dokumentation & Statistik

Die Aufbereitung und Verarbeitung der Messdaten erfolgte mit:

- Microsoft Office 365, (Word, Excel, PowerPoint)
- Endnote (V. 10),
- Sigma Plot (V.11),
- GraphPad Prism (V. 9.5) für grafische Darstellungen und statistische Auswertungen

Statistische Auswertung und Berechnung:

Für wiederholte Messungen werden die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistischen Auswertungen wurden ebenfalls mit GraphPad Prism durchgeführt.

Folgende statistische Verfahren wurden angewendet:

T- Test (ungepaart), ANOVA (Zweiweg, sofern eine Normalverteilung nachgewiesen wurde).

Als Nullhypothese wurde jeweils angenommen, dass kein Unterschied für Messungen mit Cytosorb gegenüber ohne Cytosorb bestand. Für die Sättigungskinetiken, welche keine Normalverteilung der Daten aufwiesen, wurde der Wilcoxon Test angewendet.

Für die Berechnung der AUC sowie der Eliminationshalbwertszeiten im Zirkulationsmodell wurden ebenfalls GraphPad Prism verwendet. Auf Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov Test geprüft. Für die Vergleiche zwischen den Eliminationskurven (im Simulationsversuch) wurden nichtlineare Regression (für die Beschreibung der Elimination im 1- Kompartimentmodell), sowie eine Zweiweg- ANOVA für den Vergleich der Eliminationskurven an verschiedenen Messtagen verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Verlaufskontrollen

Im Rahmen der Datenerhebung wurden 30 Patienten der chirurgischen Intensivstation CIA/CIB identifiziert, von denen sechs Patienten ausgewählt wurden, bei denen im Rahmen der klinischen Routine Kontrollen der Plasmaspiegel unter Antibiotikatherapie durchgeführt worden waren. So dass diese Daten, im Hinblick auf die die Auswirkung von Nierenersatzverfahren bzw. Hämoadsorptionstherapie mit Cytosorb untersucht werden konnten. Diese sind in Abbildung 13 dargestellt. Es handelt sich um Plasmaspiegelbestimmungen bei 6 Patienten unter Piperacillin Therapie.

Hierbei zeigte sich, dass die Plasmaspiegel unter CVVHD (im zuführenden Dialyseschenkel) nach der Initialdosis im Mittel bei einem Maximum von 340,8 µg/ml lagen. Im Verlauf der folgenden 8 h fielen die Plasmakonzentrationen auf 90,8 µg/ml ab (Abbildung 13). Bei allen 6 Patienten wurde die Erstdosis von 4 mg Piperacillin/ 0,5 mg Tazobactam zugleich mit dem Start der Dialysetherapie gegeben. Alle Patienten litten zum Aufnahmezeitpunkt unter einem prärenalen Nierenversagen, so dass davon auszugehen ist, dass zu keinem Zeitpunkt eine renale Elimination der Substanzen aus dem Plasma stattfand. Da Piperacillin weit überwiegend renal eliminiert wird (Tabelle 3), sind die hier beobachteten Veränderungen der Plasmaspiegel im Wesentlichen auf die CVVHD Therapie zurückzuführen. Unter Berücksichtigung der MHK für Piperacillin, welche bei 16 µg/ml (respektive 16 mg/l) liegt [36], konnte im Dosierungsintervall somit zwar eine erhebliche Reduktion der zirkulierenden Plasmaspiegel unter CVVHD beobachtet werden, es kam aber zu keiner Unterschreitung der Plasmazielkonzentration für Piperacillin.

Im Verlauf wurden die Patienten ebenfalls während der Therapie mit CVVHD und Cytosorb untersucht, um mögliche Auswirkungen der CVVHD Therapie in Kombination mit Cytosorb Filtern zu erkennen. Hierbei zeigte sich in (Abbildung 14 sowie in Abbildung 15), dass die gemessenen Spiegel mit Cytosorbfiltern deutlich unter denen zuvor beschriebenen Patienten ohne Filter lagen. So lag der Plasmaspiegel 60 min nach Therapiebeginn im Mittel bei

239,84 µg/ml ohne Cytosorb. Unter Cytosorbtherapie wurden zum gleichen Zeitpunkt nur 107,94 µg/ml gemessen. Die Abnahme erfolgte hier direkt am zuführenden Dialyseschenkel (arteriell) vor dem Zufluss in das Dialysegerät (Abbildung 9). Im abgehenden Dialyseschenkel (venös) zeigten sich vergleichbare Werte (Abbildung 15). So betrug hier das Maximum nach 60 Minuten 164,0 µg/ml ohne Cytosorb. Dem stand mit Cytosorb eine mittlere Konzentration von 61,7 µg/ml im zuführenden Dialyseschenkel mit Cytosorb gegenüber. Dies deutet darauf hin, dass Cytosorb unter CVVHD Therapie die Plasmaspiegel deutlich herabsetzt. So reduzieren sich diese von initial 107,94 µg/ml auf 14,5 µg/ml (prä CS, arteriell). Im gleichen Zeitraum konnten im abgehenden Dialyseschenkel direkt hinter dem Cytosorbfilter (post CS) ein Anstieg der Piperacillin-Konzentration auf 13,2 µg/ml nachgewiesen werden. Die Plasmakonzentrationen vor Cytosorb nähern sich im Verlauf der CVVHD Therapie (8 h) denen hinter dem Cytosorb an und liegen zu Therapieende auf vergleichbarem Niveau.

Zusammengefasst geben die Beobachtungen Anlass zu vermuten, dass es unter der Therapie mit Cytosorb zu einer „Unterdosierung“ von Piperacillin kommen könnte, indem Cytosorb durch die Bindung der Antibiotika die Plasmakonzentrationen herabsetzt und so möglicherweise dazu führt, dass der Zielspiegel für Piperacillin nicht mehr erreicht wird.

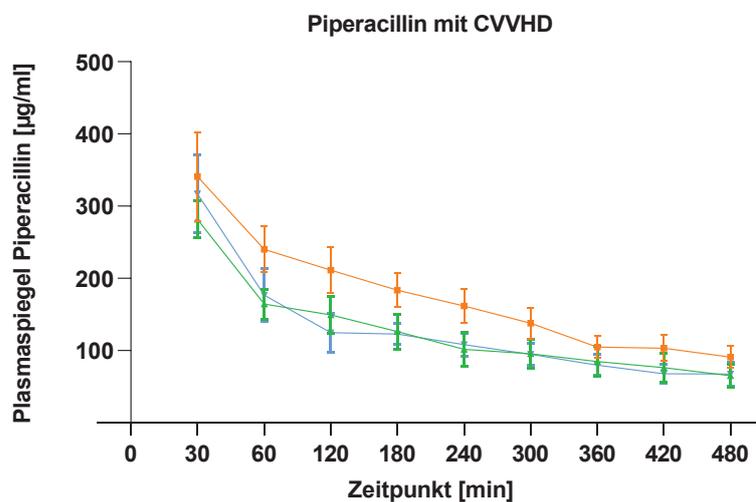


Abbildung 13: Piperacillin bei Patienten mit CVVHD

Nach Infusion von 4 mg Piperacillin/ 0,5 mg Tazobactam wurden die folgenden Plasmaspiegel gemessen. Dargestellt ist auf der Y-Achse die Plasmakonzentrationen von Piperacillin in [µg/ml] sowie der Zeitliche Verlauf auf der X- Achse in Minuten [min]. Die unterschiedlichen Abnahmeorte wurden durch die folgenden Kurven gekennzeichnet: zuführender Dialyseschenkel (-■-), abführender Dialyseschenkel (-▲-) sowie Ultrafiltrat (-■-). Im Folgenden fallen die Spiegel aller Messwerte ab. (Mean +/- SD; n=5)

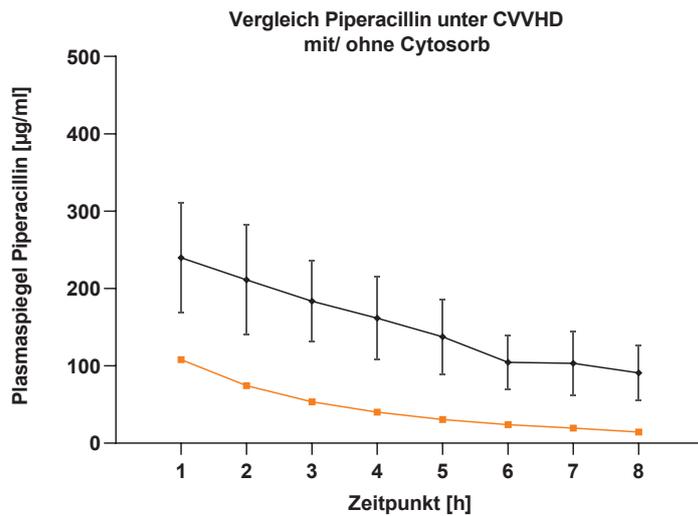


Abbildung 14: Piperacillinspiegel im Vergleich mit und ohne CS im zuführenden Dialyseschenkel (prä CS)
 Nach Infusion von 4 mg Piperacillin/ 0,5 mg Tazobactam wurden die folgenden Plasmaspiegel gemessen. Dargestellt ist auf der Y-Achse die Plasmakonzentrationen von Piperacillin in [µg/ml] sowie der Zeitliche Verlauf auf der X- Achse in [h]. Abgebildet sind die Referenzgruppe ohne Cytosorb (-◆-, n= 5) sowie eine Messreihe mit Cytosorb (-■-, n=1). Die Werte der Referenzgruppe liegen durchgehend über denen der Gruppe mit Cytosorb. Nach 8h Versuchsdauer konnten noch 90,8 µg/ml Piperacillin ohne Cytosorb und 14,5 µg/ml nachgewiesen werden.

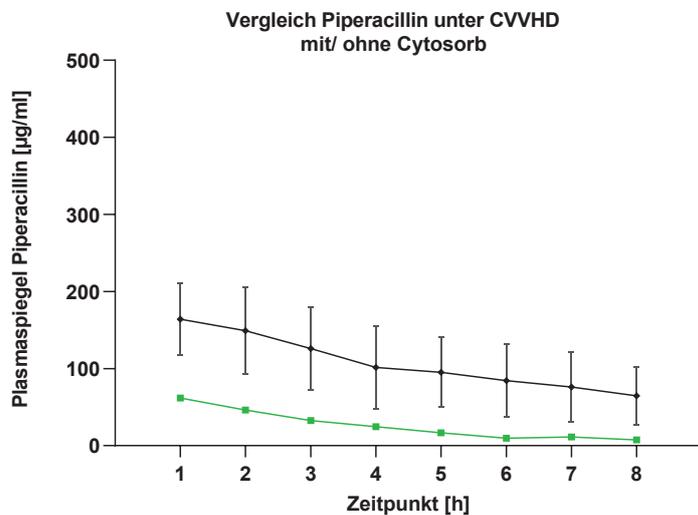


Abbildung 15: Piperacillinspiegel im Vergleich mit und ohne Cytosorb im abgehenden Dialyseschenkel (post CS)
 Nach Infusion von 4mg Piperacillin/ 0,5 mg Tazobactam wurden die folgenden Plasmaspiegel gemessen. Dargestellt ist auf der Y-Achse die Plasmakonzentrationen von Piperacillin in [µg/ml] sowie der Zeitliche Verlauf auf der X- Achse in [h]. Abgebildet sind die Referenzgruppe ohne Cytosorb (-◆-, n= 5) sowie eine Messreihe mit Cytosorb (-■-, n=1). Die Werte der Referenzgruppe liegen durchgehend über denen der Gruppe mit Cytosorb. Nach 8h Versuchsdauer konnten noch 64,8 µg/ml Piperacillin ohne Cytosorb und 7,6 µg/ml nachgewiesen werden.

4.2 Ergebnisse der klinischen Verlaufskontrollen mit Imipenem

Im Laufe der Patientenbeobachtung zeichneten sich mehrere interessante Aspekte auch bei Patienten unter Imipenem Therapie ab, die in die Untersuchungen mit einbezogen wurden. In Abbildung 16 dargestellt sind die Plasmaspiegel von 5 Patienten unter Imipenem Therapie in Kombination mit einer CVVHD Therapie. Es zeigt sich, dass die Plasmaspiegel nach einer Infusion von 500 mg Imipenem zunächst ein Maximum von 32,7 µg/ml erreichen und dann im Verlauf der nächsten 8 Stunden auf 8,9 µg/ml abfallen (Abbildung 16). Auch diese Patienten litten zum Zeitpunkt der Therapie unter Anurie, sodass davon auszugehen ist, dass keine oder eine stark reduzierte renale Elimination stattfand [37]. Analog zur Analyse mit Piperacillin wurden auch hier die Plasmaspiegel der Patienten mit CVVHD ohne Cytosorb mit einem Patienten mit CVVHD verglichen, der mit Cytosorb behandelt wurde. Die Imipenem-Spiegel mit Cytosorb Therapie lagen auch in diesem Fall unter der Referenzgruppe ohne Filter (ohne Abbildung). Jedoch kommt es im Hinblick auf den MHK- Wert von Imipenem (2 µg/ml) zu keiner Zeit zu einer relevanten Unterschreitung der Minimalkonzentrationen.

Zusammenfassend könnte Cytosorb auch die Plasmaspiegel von Imipenem herabsetzen. Da die Imipenem-Bestimmungen im Plasma mittels HPLC teils zu widersprüchlichen Ergebnissen führten (Aufteilung in mehrere Peaks infolge von Instabilität), konzentriert sich die vorliegende Dissertation auf Piperacillin. Es wurden keine weiteren Bestimmungen an Plasmaproben von Patienten unter Behandlung mit Imipenem durchgeführt.

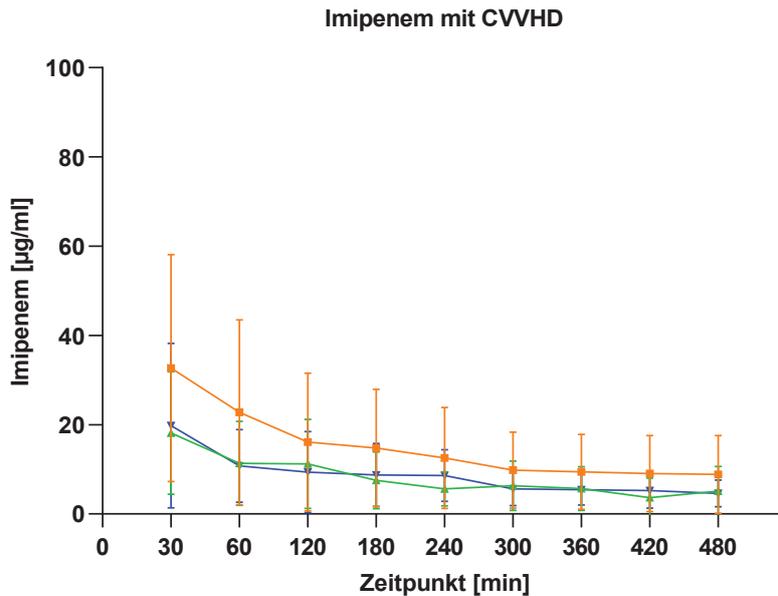


Abbildung 16: Imipenem unter CVVHD Therapie (n=5)

Nach Infusion von 1g Imipenem wurden die folgenden Plasmaspiegel gemessen. Dargestellt ist auf der Y-Achse die Plasmakonzentrationen von Imipenem in $[\mu\text{g/ml}]$ sowie der Zeitliche Verlauf auf der X- Achse in Minuten [min]. Die unterschiedlichen Abnahmeorte wurden durch die folgenden Kurven gekennzeichnet: zuführender Dialyseschenkel (—■—), abführender Dialyseschenkel (—▲—) sowie Ultrafiltrat (—■—). Im Folgenden fallen die Spiegel aller Messwerte ab.

4.3 In vitro Untersuchungen der Cytosorb Kinetik

Aufbauend auf den vorstehend beschriebenen Beobachtungen an einzelnen Patienten wurden im Folgenden in vitro Experimente durchgeführt, die die Hypothese prüfen, dass Cytosorb Piperacillin und ggf. andere Betalactam-Antibiotika bindet und dadurch die erzielten Plasmakonzentrationen reduziert. Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um den für die erwartete Bindung von Piperacillin relevanten Zeitraum zu bestimmen. Dabei wurde Cytosorb-Material mit Piperacillin (0- 40 mg/ml) inkubiert und die freie Konzentration im Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Das Zeitintervall, in welchem eine Bindung erfolgt, konnte auf 60 min eingegrenzt werden. Eine längere Inkubation führte zu keiner weiteren Änderung (nicht gezeigt). Bei Temperaturen zwischen 25- 40°C zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Messwerten, sodass die weiteren Versuche vor allem bei 25 °C durchgeführt wurden.

4.3.1 Auswirkungen unterschiedlicher Medien auf die Plasmaspiegel

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor der Interaktion von Antibiotika mit Cytosorb könnte das Probenmedium sein. Während alle Analysen klinischer Blutproben aus Vollblut erfolgten, wurden die in vitro Versuche entweder mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) oder Blutplasma aus einem Pool von gesunden Spendern durchgeführt. Hierbei wurden Konzentrationen im jeweiligen Medium bei 37 °C bestimmt und verglichen. In Abwesenheit von Cytosorb (Abbildung 17) wurden vergleichbare Konzentration in beiden Medien erreicht. So lagen die nach Zugabe von 10 mg/ml Piperacillin gemessenen Spiegel bei 9,9 mg/ml in NaCl gegenüber 9,2 mg/ml im Plasma. In Anwesenheit von Cytosorb (Abbildung 18) wurden demgegenüber deutlich niedrigere Spiegel nachgewiesen als zu erwarten gewesen wäre. Bei Zugabe von 20 mg/ml fand sich beispielsweise im Überstand nur noch eine Konzentration von ca. 2 mg/ml in beiden eingesetzten Medien, entsprechend einer Reduktion der Konzentration im Überstand um ca. 90 %. Dies zeigt, dass Cytosorb einen erheblichen Anteil des zugesetzten Piperacillin bindet. Bei Zusatz von mehr als 20 µg/ml stiegen die gemessenen Konzentrationen allerdings stark an. Hier lagen die gemessenen Konzentrationen im NaCl zudem deutlich über denen im PAP.

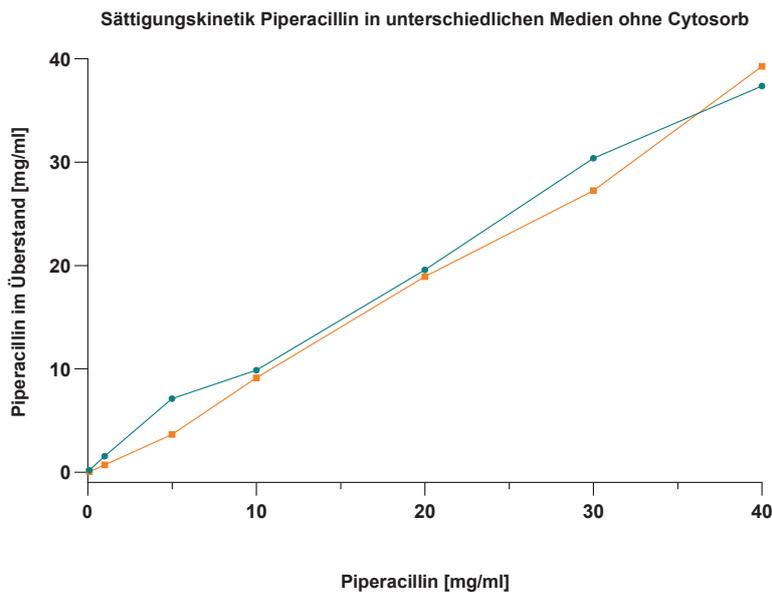


Abbildung 17: Piperacillin-Konzentration in unterschiedlichen Medien

Es erfolgte die Inkubation von Piperacillin bei 37 °C für eine Stunde in unterschiedlichen Medien. Dargestellt ist die Piperacillin Konzentration im Überstand in [mg/ml] auf der Y-Achse sowie die hinzugegebene Konzentration Piperacillin auf der X-Achse. Die Messungen wurden in physiologischer Kochsalzlösung (-●-) und in Plasma (-■-) durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationen stimmen in beiden Medien im Wesentlichen überein (n=1).

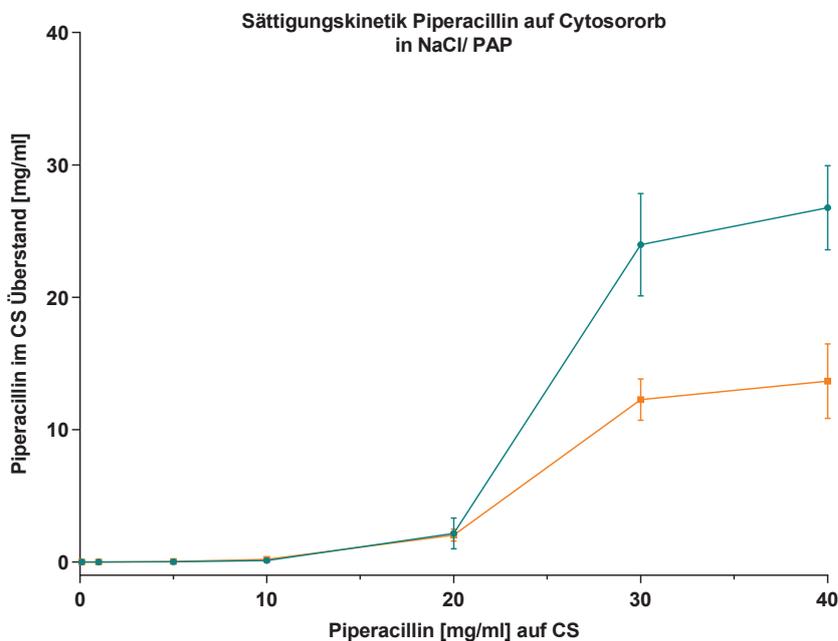


Abbildung 18: Sättigungskinetik Piperacillin mit Cytosorb auf unterschiedlichen Medien

Es erfolgte die Inkubation von Piperacillin bei 37 °C für eine Stunde in unterschiedlichen Medien auf Cytosorb (n= 4). Dargestellt ist die Piperacillin Konzentration im Überstand in [mg/ml] auf der Y-Achse sowie die hinzugegebene Konzentration Piperacillin auf der X-Achse. Die Messungen wurden in physiologischer Kochsalzlösung (-●-) sowie in plättchenarmen Plasma (-■-) durchgeführt. Bis zu einer Konzentration von 20 mg/ml verlaufen die Konzentrationen gleich. Im weiteren liegen die im NaCl gemessenen Konzentrationen deutlich über denen im Plasma.

4.3.2 Sättigung der Bindung von Piperacillin und anderen Antibiotika an Cytosorb

Um die Kapazität von Cytosorb näherungsweise zu ermitteln, wurden Sättigungskinetiken mit verschiedenen Antibiotika durchgeführt. Dabei erfolgte die Inkubation von 500 mg Cytosorb mit unterschiedlichen Antiinfektiva - Konzentrationen für 1 h. Im Hinblick auf die physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus wurde hierfür eine Temperatur von 37 °C (Abbildung 19) gewählt. Wurden im Überstand von Cytosorb Piperacillin in Konzentrationen bis zu 2 mg/ml zugegeben, so war im Überstand kein Piperacillin nachweisbar, was einer annähernd vollständigen Bindung dieser Substanz an Cytosorb entsprach. Bei Zusatz von 4 mg/ml fanden sich 56,6 µg/ml, bei 8 mg/ml 125,1 µg/ml im Überstand. Bei Konzentrationen > 8 mg/ml ergab sich ein steiler Anstieg der Konzentrationen im Überstand. So stiegen die Konzentrationen ab 10 mg/ml (301,1 µg/ml) deutlich bis auf 10 mg/ml bei 40 mg/ml an. Dies spricht für eine Sättigung der Bindungsstellen am Cytosorb. Betrachtet man die Gesamtabsorption, so kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung von Piperacillin einer Sättigung unterliegt. Dem entsprechend sind bei einer zugegebenen Konzentration von 40 mg/ml Piperacillin nur noch ca. 75 % des Wirkstoffes an Cytosorb gebunden.

Im Hinblick auf die Interaktionen von Cytosorb mit Tazobactam, ergibt sich ein vergleichbares Bild (Abbildung 20). Da Tazobactam ein β -Lactamase Inhibitor ist und keine eigenständige antibakterielle Aktivität hat, kann hier kein Vergleich mit einem klinisch relevanten MHK-Wert gezogen werden. Im klinischen Setting kann von Konzentrationen von 34,4 µg/ml bei einer Dosis von 500 mg/ 70 kg Tazobactam ausgegangen werden [36]. Auch hier waren die im Überstand gemessenen Konzentrationen durchweg niedriger als aufgrund der zugesetzten Menge zu erwarten wäre. So ergab sich bei Zusatz von 5 mg/ml im Überstand eine Konzentration von 2,9 mg/ml. Für alle untersuchten Konzentrationen ergab sich eine ca. 50 %ige Bindung von Tazobactam an Cytosorb. Es konnte für diese Substanz folglich keine Sättigung der Bindung nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden Sättigungskinetiken mit Meropenem, einem Vertreter der Carbapeneme, durchgeführt. Die vorliegenden Daten zeigen eine ebenfalls deutliche Bindung von Meropenem (Abbildung 20). Betrachtet man die in der klinischen Anwendung üblichen Plasmaspitzenpiegel (c_{\max}) [29], welche bei 1 mg Meropenem ca. 115 µg/ml betragen, so zeigt sich ein ähnlicher Verlauf wie bei Piperacillin. So können bis zu einer zugesetzten Menge von 2 mg/ml im Überstand eine Konzentration von 256,50 µg/ml nachgewiesen werden. Dies entspricht einer fast vollständigen Bindung von Meropenem an Cytosorb. Bei Zusatz von 10 mg/ml (4735,5 µg/ml im Überstand) und darüber zeigt sich ebenfalls die beginnende Sättigung des Cytosorb. Im Gegensatz zu Piperacillin findet, bei dieser Konzentration, nur noch eine Bindung von 18 % der zugesetzten Meropenem Menge statt. Im Vergleich zur Sättigungskinetik mit Piperacillin setzt der Sättigungseffekt von Cytosorb bei Meropenem etwas früher ein, erkennbar an einer weiter links und höher verlaufenden Sättigungskurve (Abbildung 20).

Zusammenfassend kommt es im Bereich der klinisch relevanten Konzentrationen von Piperacillin, Tazobactam und Meropenem somit zu einer nahezu vollständigen Absorption

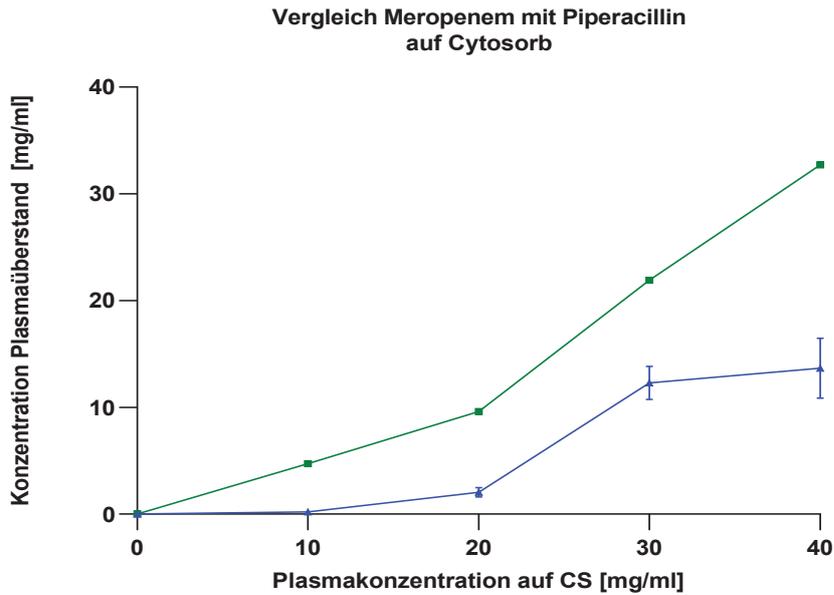


Abbildung 19: Vergleich Sättigungskinetik Meropenem mit Piperacillin auf Cytosorb (n=4)
 Es erfolgte die Inkubation von Meropenem / Piperacillin auf CS für 1 h bei 37°C in Plasma. Dargestellt sind die Plasmakonzentrationen der Substanzen in [mg/ml] auf der Y- Achse sowie die hinzugegebenen Konzentrationen in [mg/ml] auf der X- Achse. Die mit Meropenem (-■-) gemessenen Plasmaspiegel liegen konstant über denen mit Piperacillin (-▲-). So lassen sich im Maximum 32,7 +/- 2,9 mg/ml Meropenem und 13,67 +/- 2,8 mg/ml nachweisen.

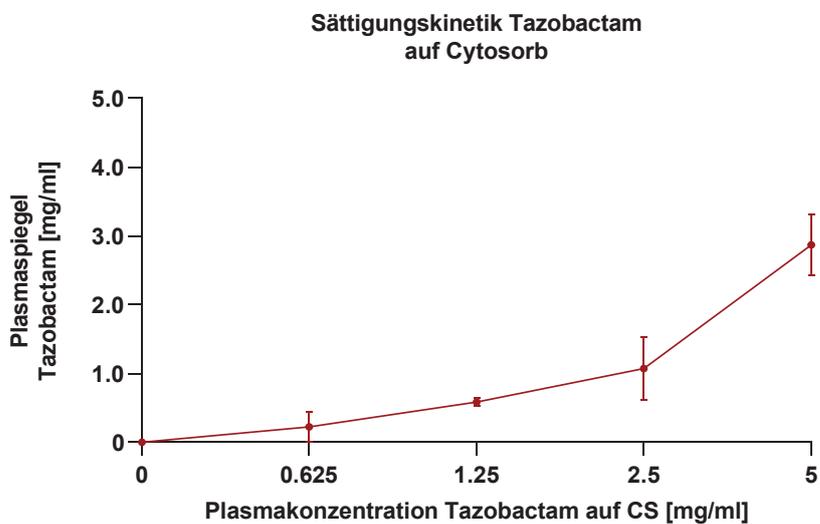


Abbildung 20: Sättigungskinetik Tazobactam auf Cytosorb (n=4)
 Es erfolgte die Inkubation unterschiedlicher Konzentrationen Tazobactam in plättchenarmen Plasma. Die im Überstand gemessenen Plasmaspiegel Tazobactam [mg/ml] sind auf der Y- Achse dargestellt. Die hinzugegebenen Tazobactam Konzentrationen in [mg/ml] auf der X- Achse. Es konnten maximal 2,8 +/- 0,4 mg/ml nachgewiesen werden.

4.3.3 Vergleich der Bindung an Cytosorb mit der Bindung an Aktivkohle

Eine effektive und medizinisch wichtige Adsorber Substanz ist die Aktivkohle. In den folgenden Versuchen wurde die Interaktion von Aktivkohle mit Piperacillin untersucht und Cytosorb gegenübergestellt.

Wenn als Medium Plasma eingesetzt wurde, zeigte sich für die Bindungskinetik an Aktivkohle ein dem Cytosorb annähernd vergleichbares Verhalten (Abbildung 21). Bei Konzentrationen von Piperacillin bis 20 mg/ml liegen die im Überstand gemessenen Konzentrationen mit Cytosorb geringfügig über denen, die in Gegenwart von Aktivkohle bestimmt wurden. Im Bereich von > 30 mg/ml scheint die Absorptionsfähigkeit der Aktivkohle gegenüber Cytosorb etwas geringer, sodass in diesem Bereich die Cytosorb Absorption über der Kapazität der Aktivkohle liegt (40 mg/ml: 17,1 mg/ml (Aktivkohle) vs. 13,7 mg/ml (Cytosorb)).

Zudem wurde auch die Auswirkung unterschiedlicher Medien auf die Interaktionen von Aktivkohle mit Piperacillin verglichen (Abbildung 22 und Abbildung 21). Hierbei zeigten sich deutlich höhere Konzentrationen mit physiologischer Kochsalzlösung. Der Einfluss des Mediums auf die Bindung bei Aktivkohle ist ähnlich dem Einfluss des Mediums auf die Bindung an Cytosorb, wo ebenfalls höhere Konzentrationen für NaCl gegenüber Plasma beobachtet wurden (Abbildung 18).

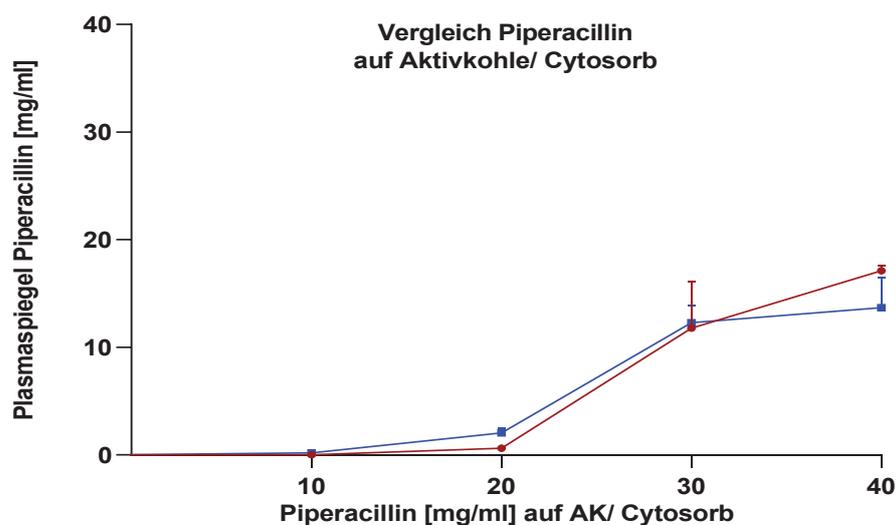


Abbildung 21: Vergleich der Sättigungskinetik Piperacillin auf unterschiedlichen Filtersubstanzen (n=4).

Es wurden je 0,5 mg Aktivkohle/Cytosorb mit unterschiedlichen Konzentrationen Piperacillin für 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf der Y-Achse sind die im Überstand gemessenen Piperacillinspiegel in [mg/ml] dargestellt. Auf der X- Achse die applizierten Piperacillin Dosen in [mg/ml]. Die gemessenen Konzentrationen steigen im Verlauf an, wobei zunächst die Messwerte auf Aktivkohle (- ● -) unter denen mit Cytosorb (- ■ -) liegen. Bei Konzentrationen > 30 mg/ml liegen die gemessenen Spiegel der Aktivkohle 17,10 +/- 0,49 mg/ml über denen mit Cytosorb 13,67 +/- 2,8 mg/ml.

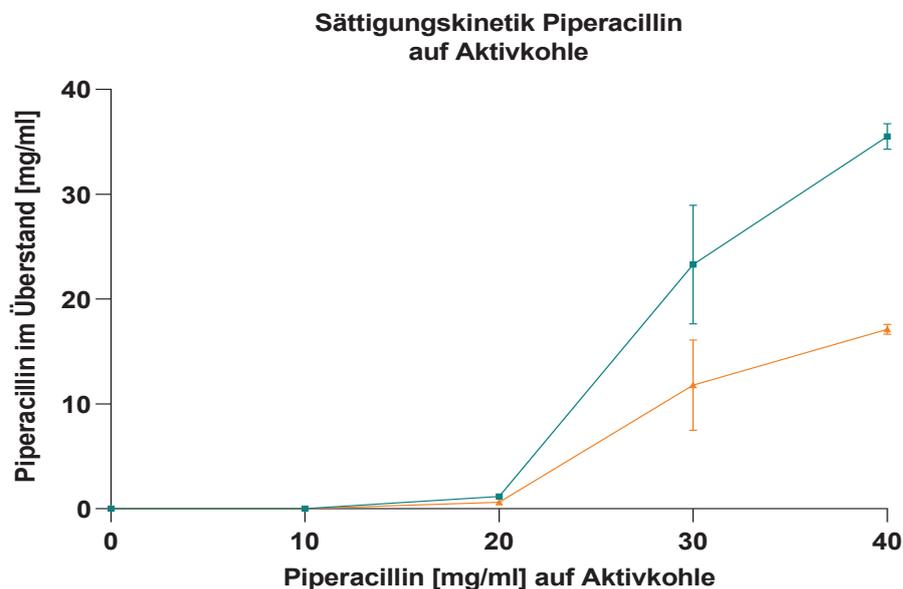


Abbildung 22: Sättigungskinetik Piperacillin auf Aktivkohle in unterschiedlichen Medien (n=4)

Es erfolgte die Inkubation von 0,5 mg Aktivkohle mit unterschiedlichen Konzentrationen Piperacillin. Auf der Y-Achse ist die Piperacillinspiegel im Überstand [mg/ml] abgebildet. Auf der X- Achse sind die applizierten Piperacillin Konzentrationen in [mg/ml] dargestellt. Zunächst verlaufen die Plasmakonzentrationen in NaCl (- ● -) vergleichbar mit denen in plättchenarmen Plasma (- ▲ -). Bei Konzentrationen > 20 mg/ml liegen die in NaCl gemessenen Konzentrationen (35,5 +/- 1,2 mg/ml) deutlich über den im Plasma (17,1 +/- 0,5 mg/ml)

4.4 Reversibilität der Bindung an Cytosorb

In Abschnitt 4.3 wurde Cytosorb im Hinblick auf die Absorption von verschiedenen Substanzen (Piperacillin/Tazobactam und Meropenem) untersucht. In Anbetracht der potenziell absorbierten Mengen stellt sich im Weiteren die Frage, inwiefern Cytosorb die einmal gebundenen Substanzen wieder freisetzt. So wurden die Plasmaspiegel nach Inkubation mit denen nach einer weiteren Stunde im Piperacillin-freien Medium (NaCl 0,9 %) verglichen (Abbildung 23). Unter Laborbedingungen konnte nach zwei Stunden Inkubation eine Liberation nur eines kleinen Teils der ehemals gebundenen Substanz nachgewiesen werden. Die gemessenen Spiegel lagen bei 97 µg/ml bei 10 mg/ml, 611 µg/ml bei 20 mg/ml sowie 1,8 mg/ml bei 30 mg/ml. Unter der höchsten Konzentration (40 mg/ml) konnten 3,2 mg/ml nachgewiesen werden. Zum Vergleich finden sich die entsprechenden Messungen bei Inkubation mit Piperacillin in Abbildung 19

Für Tazobactam (Abbildung 24) zeigte sich ein anderer Verlauf, hier war die Freisetzung nach einer Stunde Inkubation mit substanzfreiem Medium höher: 0,2 mg/ml (im Überstand) vs. 0,1 mg/ml (nach weiterer Inkubation). Im Weiteren zeigen die Kurven vergleichbare Verläufe. Somit scheint die Bindung von Tazobactam an Cytosorb ebenfalls reversibel zu sein.

Für Meropenem (Abbildung 25) zeigte sich ebenfalls eine Freisetzung nach erneuter Inkubation. So konnten nach 1-stündiger Inkubation mit substanzfreiem Medium noch 1,1 mg/ml bei 8 mg/ml, 4,6 mg/ml bei 20 mg/ml, sowie 8,6 mg/ml bei 30 mg/ml nachgewiesen werden.

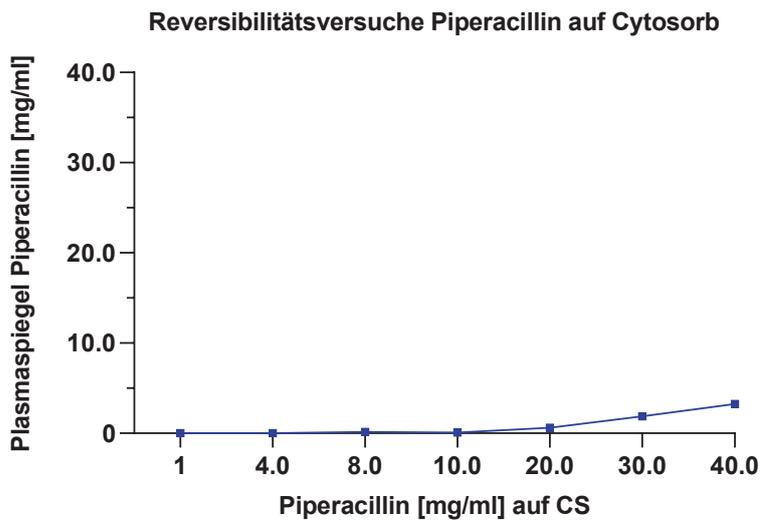


Abbildung 23: Reversibilitätsversuch mit Piperacillin (n=2).

Es erfolgte die Inkubation von Piperacillin für eine Stunde bei 25 °C, der Überstand wurde entfernt und durch Antibiotika freies Medium ersetzt und erneut für 1 h inkubiert. Auf der Y- Achse sind die gemessene Plasmakonzentration nach der Inkubation [mg/ml] dargestellt. Auf der X- Achse die hinzugegeben Piperacillin Konzentrationen. Die gemessenen Konzentrationen zeigen die freigesetzte Menge Piperacillin nach erneuter Inkubation

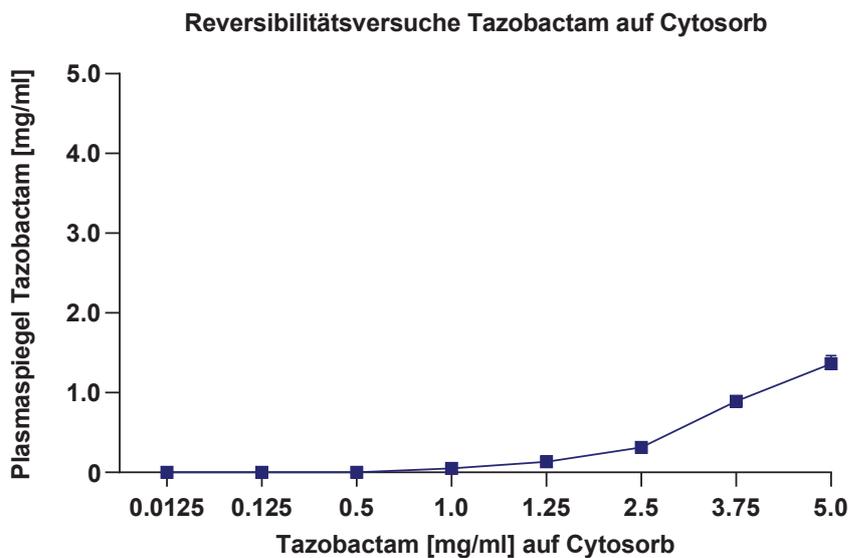


Abbildung 24: Reversibilitätsversuche mit Tazobactam (n=2)

Es erfolgte die Inkubation von Tazobactam für eine Stunde bei 25 °C, der Überstand wurde entfernt und durch Antibiotika freies Medium ersetzt und erneut für 1 h inkubiert. Auf der X- Achse sind applizierten Plasmakonzentration [mg/ml] dargestellt. Auf der Y-Achse die gemessenen Plasmaspiegel im Überstand. Die gemessenen Konzentrationen zeigen die freigesetzte Menge Tazobactam nach erneuter Inkubation

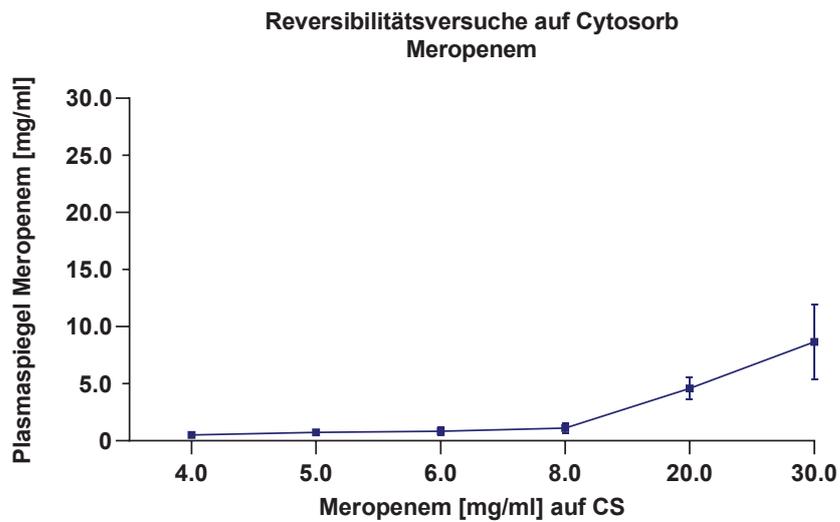


Abbildung 25: Reversibilitätsversuch mit Meropenem (n=2)

Es erfolgte die Inkubation von Meropenem für eine Stunde bei 25 °C, der Überstand wurde entfernt und durch Antibiotika freies Medium ersetzt und erneut für 1 h inkubiert. Auf der X- Achse sind applizierten Plasmakonzentration [mg/ml] dargestellt. Auf der Y-Achse die gemessenen Plasmaspiegel im Überstand. Die gemessenen Konzentrationen zeigen die freigesetzte Menge Meropenem nach erneuter Inkubation

4.5 Simulationsversuche mit Piperacillin in einem pharmakokinetischen Modell

Im Hinblick auf die zuvor beschriebene Bindung der untersuchten Antiinfektiva an Cytosorb stellt sich die Frage, inwiefern die untersuchten Effekte in einem dem klinischen Einsatz nachempfundenen Zirkulationssystem Auswirkungen auf die Konzentrationen im Medium haben können. Infolgedessen wurde in einem Modell (siehe Abschnitt 3.3) je ein „Behandlungszyklus“ mit initialer Substanzgabe und anschließender Eliminationsphase über 360 min simuliert (Abbildung 26). Dabei wurden Behandlungszyklen sowohl mit als auch ohne Cytosorb-Kartusche simuliert.

Die in diesem Modell gemessenen Konzentrationsverläufe von Piperacillin sind in Abbildung 26 dargestellt. Nach „Injektion“ von Piperacillin in das Reservoir des Modellsystems ergab sich eine Initialkonzentration von 443,1 mg/ml ohne Cytosorb bzw. von im Mittel 436,3 mg/ml mit Cytosorb (am 1. Versuchstag). Erwartungsgemäß hatte der Adsorber hierauf keinen Einfluss. Anschließend fielen die Konzentrationen entsprechend der simulierten Elimination im Sinne der klassischen Eliminationskinetik eines 1-Kompartimentmodells ab. Die Eliminationshalbwertszeit betrug ohne Cytosorbfilter 45 min. In den Versuchen mit Cytosorbfilter war die Eliminationshalbwertszeit mit 22 min kürzer, was durch die im statischen Versuchsansatz (oben) gezeigte Bindung an Cytosorb bestätigt. Entsprechend lagen die in Gegenwart von Cytosorb gemessenen Konzentrationen innerhalb der ersten Stunden der Zirkulation deutlich unter denen der Referenzversuche ohne Cytosorb. Was sich auch in der AUC für beide Kurvenverläufe widerspiegelt. So beträgt die AUC für den ersten Versuchsdurchlauf ohne Cytosorb 296,0 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ hingegen in Anwesenheit von Cytosorb nur 153,0 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$.

Im Verlauf der Versuchszeit zeigte sich nach ca. 70 min eine Unterschreitung der MHK von Piperacillin für *Pseudomonas aeruginosa* (MHK PSAER: 16 $\mu\text{g/ml}$) mit Cytosorb. In den Referenzversuchen ohne Cytosorb wurde die MHK ca. 80 min später unterschritten. Der entsprechende Abschnitt ist in Abbildung 26 vergrößert dargestellt.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Absorptionsfähigkeit von Cytosorb (Abbildung 28) unter Piperacillin, so scheint die Absorption mit zunehmender Behandlungsdauer deutlich abzunehmen. So kann ein deutlicher Anstieg der AUC von initial 153,0 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ an Tag 1 auf 239,1 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ an Tag 5 und im Verlauf auf 291,3 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ beobachtet werden. Somit liegt diese am Ende des Experiments nach 10 Behandlungsdurchläufen nur noch knapp unter der ohne CS gemessenen Ausgangs AUC von 296,0 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Zudem lässt sich auch nach insgesamt 12 Tagen noch eine Unterschreitung der MHK PIP (16 $\mu\text{g/ml}$) nachweisen, wenn auch erst nach 4 h Versuchsdauer. Diese Beobachtungen lassen sich ebenfalls für die Eliminationshalbwertszeit machen. So steigen die Werte von initial 22 min nach 5 Tagen bzw. auf 31,0 min nach 10 Tagen und liegen somit auch deutlich näher am Ausgangswert von 44,8 min ohne Cytosorb.

In Analogie zu den für Piperacillin gezeigten Werten stellen sich auch die Kurven für Tazobactam dar (Abbildung 27). Allerdings weichen die ohne Cytosorb gemessenen Konzentrationen nicht so deutlich von denen unter Cytosorb ab. So betragen die Eliminationshalbwertszeiten hier 47,4 min ohne Cytosorb und 37,5 min. mit Cytosorb. Betrachtet man die AUC des Gesamtverlaufs, so zeigen sich hier nur kleine Unterschiede (23,5 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ ohne Cytosorb vs. 24,1 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ mit Cytosorb). Auch hier verlaufen die Werte ab der 3. Stunde nach Experimentbeginn auf einem nahezu identischen Niveau.

Im Hinblick auf das Absorptionsverhalten im zeitlichen Verlauf (Abbildung 29) zeigen sich deutlich andere Werte. So zeigt sich im Verlauf eine Zunahme der AUC von 24,09 an Tag 1 auf 25,4 an Tag 5 und 26,5 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ an Tag 10. So liegt die AUC am Ende der Versuchsdurchläufe mit 26,2 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$ über der ohne Cytosorb mit 23,5 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{h}$. Dies lässt sich ebenfalls im Hinblick auf die Eliminationshalbwertszeiten bestätigen. So werden am ersten Versuchstag noch 37,5 min errechnet, wohingegen die Eliminationshalbwertszeit zu Versuchsende bei 51,2 min liegt. Damit scheint die Elimination von Tazobactam langsamer als in der Ausgangsmessung ohne Cytosorb (47,4 min) abzulaufen

Insgesamt scheint die Absorptionsfähigkeit von Cytosorb für Piperacillin im Modell also deutlich länger anzuhalten als die durchschnittliche Anwendung im klinischen Setting dauert.

Dabei wird der Filter am Patienten alle 24 h getauscht, sodass davon auszugehen ist, dass der Filter immer das Maximum der applizierten Antiinfektiva bindet. Für Tazobactam hingegen scheint sich eine geringere Gesamtabsorption sowie eine prolongierte Freisetzung im Sinne eines „Memoryeffekts“ zu zeigen

Im Anschluss an die Versuchsdurchläufe wurden die Cytosorb Kartuschen am Folgetag mit physiologischer Kochsalzlösung über weitere 6 h bei unveränderter Flussrate ausgewaschen, um die Freisetzung des an Cytosorb gebundenen Piperacillin zu analysieren (Abbildung 30). Bereits 30 min nach Beginn dieser „Auswaschphase“ konnten 7,5 µg/ml Piperacillin im Medium nachgewiesen werden. Nach 180 min langer Perfusion konnten 13,4 µg/ml Piperacillin gemessen werden. Für die restliche Versuchsdauer blieben die gemessenen Konzentrationen annähernd konstant, sodass es offenbar zu keiner weiteren Freisetzung aus dem Cytosorb kam.

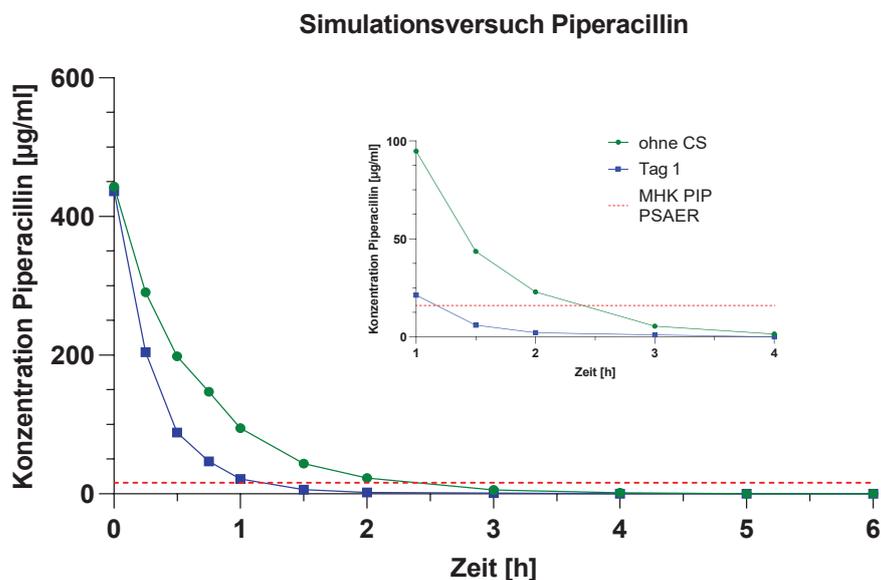


Abbildung 26: Simulationsversuch Piperacillin

Es wurde eine 5 ml Cytosorbkartusche im Kreislauf mit Zu- und Ablauf von 5ml/NaCl mit 65mg PIP-TAZ/200ml (entsprechend 325 µg/ml PIP bzw. 40,625 µg TAZ) für 6 h inkubiert. Es wurden 12 Behandlungsdurchläufe simuliert. Dargestellt sind auf der Y- Achse Piperacillin Konzentrationen in [µg/ml] sowie der zeitliche Verlauf auf der X- Achse in Stunden [h]. Es zeigt sich, dass die MHK für Piperacillin für *Pseudomonas aeruginosa* nach 150 min ohne Cytosorb (-●-) bzw. nach 70 min Versuchsdauer mit Cytosorb (-■-) unterschritten wird (siehe Ausschnitt rechts oben).

Simulationsversuch Tazobactam

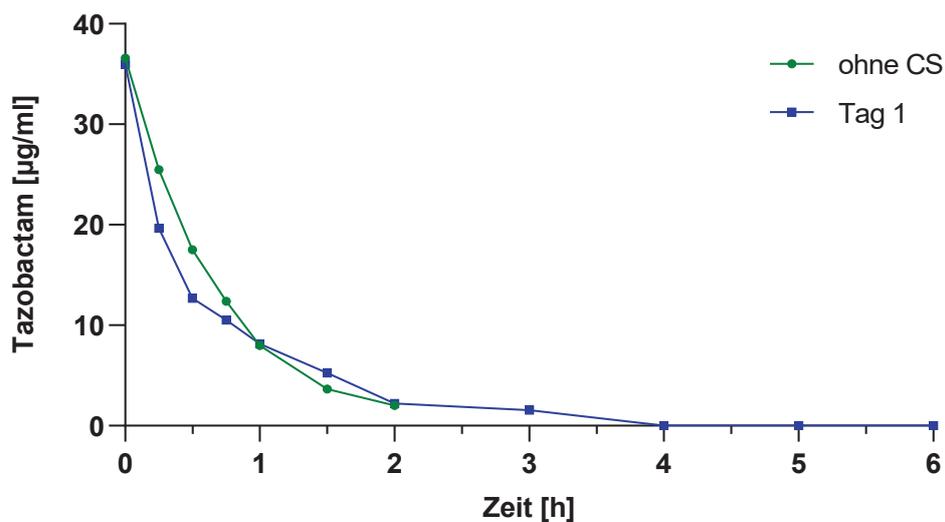


Abbildung 27: Simulationsversuch Tazobactam.

Es wurde eine 5 ml Cytosorbkartusche im Kreislauf mit Zu- und Ablauf von 5 ml/NaCl mit 65 mg PIP-TAZ/200 ml (entsprechend 325 µg/ml PIP bzw. 40,625 µg TAZ) für 6 h inkubiert. Es wurden 12 Behandlungsdurchläufe simuliert. Dargestellt sind auf der X- Achse Tazobactam Konzentrationen in [µg/ml] sowie der zeitliche Verlauf auf der Y- Achse in Stunden [h]. Es zeigt ein ähnlicher Kurvenverlauf. Die gemessenen Werte liegen ab der 2 h auf identischem Niveau.

Simulationsversuch Piperacillin

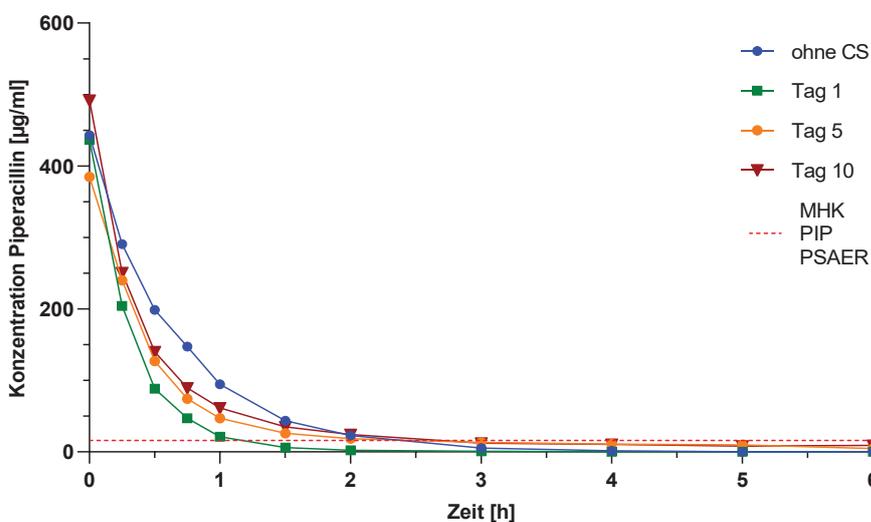


Abbildung 28: Simulationsversuch Piperacillin im zeitlichen Verlauf.

Es wurde eine 5 ml Cytosorbkartusche im Kreislauf mit Zu- und Ablauf von 5 ml/NaCl mit 65 mg PIP-TAZ/200 ml (entsprechend 325 µg/ml PIP bzw. 40,625 µg TAZ) für 6 h inkubiert. Es wurden 12 Behandlungsdurchläufe simuliert. Dargestellt sind auf der Y- Achse Piperacillin Konzentrationen in [µg/ml] sowie der zeitliche Verlauf auf der X- Achse in Stunden [h]. Es zeigt sich, dass die MHK für Piperacillin für *Pseudomonas aeruginosa* auch nach mehreren Versuchsdurchläufen mit Cytosorb noch unterschritten wird, wenn auch deutlich später (3 h nach Versuchsstart an Tag 10).

Simulationsversuch Tazobactam

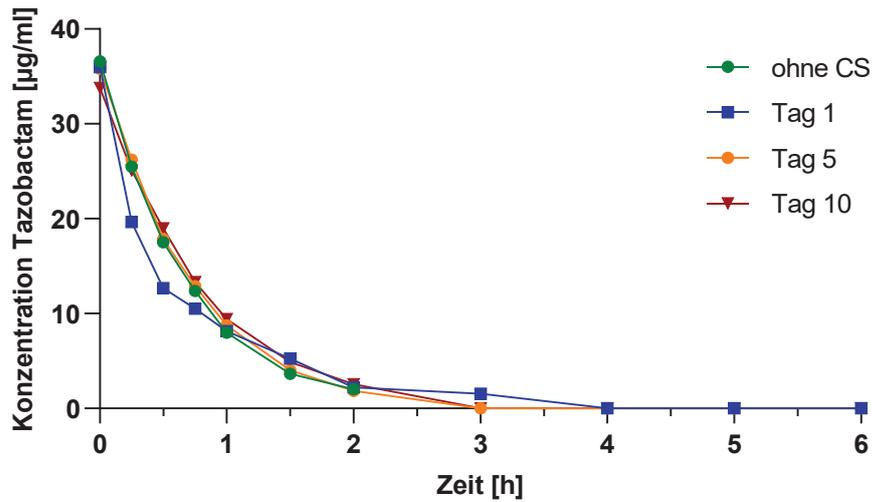


Abbildung 29: Simulationsversuch Tazobactam im zeitlichen Verlauf

Es wurde eine 5 ml Cytosorbkartusche im Kreislauf mit Zu- und Ablauf von 5 ml/NaCl mit 65 mg PIP-TAZ/200ml (entsprechend 325 µg/ml PIP bzw. 40,625 µg TAZ) für 6 h inkubiert. Es wurden 12 Behandlungsdurchläufe simuliert. Dargestellt sind auf der X- Achse Tazobactam Konzentrationen in [µg/ml] sowie der zeitliche Verlauf auf der Y- Achse in Stunden [h]. Es zeigt sich, dass die Konzentrationen im zeitlichen Verlauf ab dem 3. Versuchstag über der Referenzgruppe ohne Cytosorb liegen (-•-)

Freisetzung Piperacillin

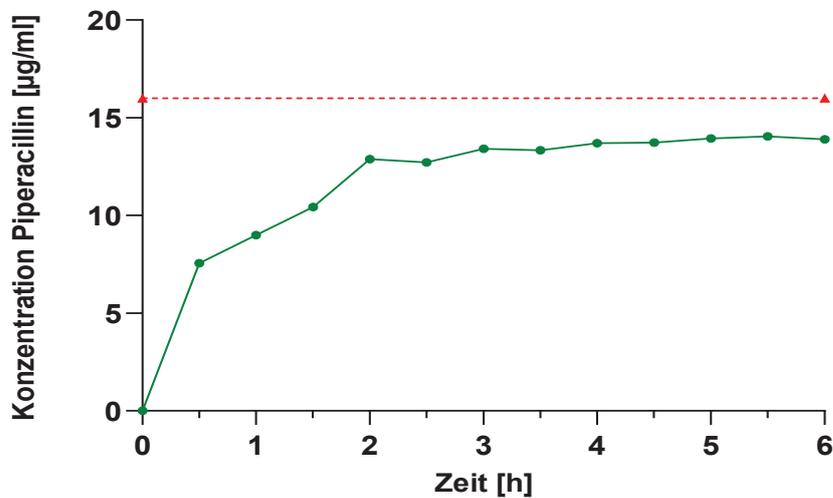


Abbildung 30: Freisetzung Piperacillin im Umlaufversuch

0,5 ml Cytosorb mit 325 µg/ml PIP und 40,625 µg/ml TAZ über 6 Stunden im Umlauf (1 ml/min) gesättigt. Auf der Y- Achse ist die im Überstand bestimmte Konzentration dargestellt sowie der zeitliche Verlauf auf der X- Achse in Stunden. Es erfolgte das Auswaschen der Kartusche mit NaCl ohne Antibiotikum im Umlauf mit 1 ml/min über 6 Stunden. Im Anschluss an die Inkubation von Piperacillin mit Cytosorb im Umlauf Versuch wurde die Freisetzung von Piperacillin aus Cytosorb untersucht (-•-) Es zeigt sich eine zunehmende Freisetzung im Verlauf. Die maximalen Konzentrationen beliefen sich auf 14,04 µg/ml und blieben somit unter dem MHK Piperacillin für Pseudomonas aeruginosa (---)

5 Diskussion

Im Hinblick auf die eingangs erwähnten Kennzahlen stellt die Sepsis auch heute noch in den westlichen Industrienationen mit 47,3 % [2] eine Krankheit mit einer hohen Letalität dar. Im Rahmen der sich weiterentwickelnden Forschung rund um die Sepsis Therapie wurden neuartige Zytokin Filter entwickelt und in ihrer Wirksamkeit untersucht. Diese sind in Bezug auf die Fähigkeit Entzündungsmediatoren zu binden effektiv. Dabei wurden bis heute nur wenige Untersuchungen zu möglichen Interaktionen mit Medikamenten angestellt. Im Fokus dieser Arbeit liegen die Leitsubstanz Piperacillin/Tazobactam sowie Meropenem und Imipenem. Gerade für Piperacillin/Tazobactam konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass es eine gute Abdeckung für unterschiedliche Infektionsherde z.B. nosokomiale Pneumonien aber auch Abdominal- oder Weichteilinfektionen gibt [38]. Dabei werden sowohl aerobe als anaerobe Erreger effektiv abgedeckt. Um eine effizientere Wirkung, auch bei β -Lactamase produzierenden Erregern zu erreichen, erfolgt die Applikation von Piperacillin mit Tazobactam, welches als β -Lactamase-Inhibitor fungiert. Die unterschiedlichen Dosierungsregime sind immer noch Gegenstand der anhaltenden Forschung, wobei die prolongierte Applikation der Bolusgabe überlegen scheint [39]. Im klinischen Alltag zeichnet sich Piperacillin vor allem durch eine gute Verträglichkeit sowie eine effiziente Wirkung in der Therapie der Sepsis aus. Folglich ist Piperacillin/Tazobactam eine der Leitsubstanzen der Sepsis Therapie und sollte auch im Hinblick auf seine möglichen Interaktionen mit Cytosorb genauer untersucht werden. Diese wurden sowohl im klinischen Setting als auch „*in vitro*“ untersucht. Voraussetzung für die klinische Wirksamkeit der Antibiotika ist allerdings, dass sie effektive Konzentrationen am Wirkort erreichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen konnten nachweisen, dass der Cytosorb-Adsorber zu einer deutlichen Reduktion der zirkulierenden Antiinfektiva Moleküle führen kann. Es zeigten sich Anhaltspunkte für eine klinisch potenziell relevante Unterschreitung der MHK- Werte für Piperacillin unter alleiniger CVVHD Therapie sowie in Gegenwart des Cytosorbfilters. Varghese et. al. [40] konnten zwar zeigen, dass unter einer repetitiven Substanzgabe (alle 8 h), eine kontinuierliche Dialysetherapie einen deutlichen Effekt auf die Menge an freien Piperacillin Molekülen hat, allerdings eine ausreichende Zielkonzentration

dennoch erreicht werden kann. Im Hinblick auf ein alternatives Infusionsregime konnten mit einer kontinuierlichen Infusion für 4 h Konzentrationen deutlich oberhalb der MHK von 16 mg/l auch unter CVVHD erreicht werden [41]. Im Hinblick auf das während unserer Patientenbeobachtung angewandte Infusionsregime der prolongierten Piperacillin Infusion über 1 h alle 8 h zeigten sich zumindest unter CVVHD Therapie suffiziente Plasmaspiegel. Im direkten Vergleich zeigte sich unter Anwendung von Cytosorb allerdings eine deutliche ausgeprägte Reduktion der Plasmaspiegel. Während der Patientenbeobachtung unter CVVHD in Kombination mit Cytosorb kam es ab 5 h nach dem Ende der Infusion zur Unterschreitung der MHK-Werte im Patientenplasma (Abbildung 15).

Die Kapazität eines Cytosorbfilters für die Bindung von Piperacillin lässt sich aus den zuvor gemessenen Parametern berechnen. Eine Cytosorb Kartusche hat ein Gesamtvolumen von 300 ml. Davon entfallen 150 ml auf das Cytosorb-Material. Weitere 150 ml stehen somit als Medium zur Verteilung der Antibiotika zur Verfügung. Auf dieser Grundlage lassen sich die folgenden Werte errechnen (Abbildung 31). Im Vergleich der Substanzen zeigt sich, dass sowohl Piperacillin (Tabelle 11), Tazobactam als auch Meropenem für den Bereich der klinisch relevanten Konzentrationen zu > 95 % an Cytosorb absorbiert werden. Die Absorption von Tazobactam liegt im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen bei > 96 %, fällt aber in höheren Konzentrationen auf rund 50 % ab. In einer Konzentration von 40 mg/ml liegt die Absorption von Piperacillin dagegen immer noch im Bereich von 75 %. Meropenem wird in einer Konzentration von 40 mg/ml nur zu 18 % an Cytosorb gebunden.

Im Weiteren konnten neben Piperacillin/Tazobactam noch weitere, häufig in der Klinik verwendete Antiinfektiva untersucht werden (Tabelle 11). So konnte auch für Oxacillin und Penicillin G eine vollständige Absorption an Cytosorb nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigte sich für Amoxicillin, Ceftazidim und Ceftriaxon eine über 90 % Absorption sowohl im plättchenarmen Plasma als auch in physiologischer Kochsalzlösung.

Betrachtet man die absolut an Cytosorb adsorbierte Menge, so beträgt die Gesamtkapazität einer Kartusche für Piperacillin etwa 4,5 g, 1,1 g für Meropenem sowie 0,32 g für Tazobactam.

Die üblichen Einzeldosen der Präparate liegen bei 4 g Piperacillin, 0,5 g Tazobactam sowie 1 g Meropenem. Somit kann zumindest für Piperacillin und Meropenem eine Bindung von mehr als der üblichen Einzeldosis beobachtet werden. Tazobactam hingegen wird nicht in diesem Maße absorbiert. Im Hinblick auf die absolute Absorption von Aktivkohle lässt sich feststellen, dass diese bei allen Konzentrationen eine noch etwas höhere Absorption aufweist. So zeigt sich bei 40 mg/ml Piperacillin eine absolute Aufnahme von 6,0 mg gegenüber 4,5 mg auf Cytosorb. Dabei konnte kein deutlicher Sättigungseffekt in den gemessenen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Substanz	Absorption in NaCl [%]	Absorption in PAP [%]
Piperacillin	99,93 +/- 0,12	99,58 +/- 0,05
Tazobactam	92,87 +/- 1,34	89,10 +/- 1,41
Amoxicillin	97,98 +/- 0,94	100,00 +/- 0,00
Oxacillin	100,00 +/- 0,00	99,27 +/- 0,16
Penicilin G	100,00 +/- 0,00	100,00 +/- 0,00
Cetazidim	98,10 +/- 0,36	96,23 +/- 0,25
Ceftriaxon	99,39 +/- 0,13	93,64 +/- 0,82

Tabelle 11: Absorption verschiedener Antiinfektiva an Cytosorb (eigene Messungen)

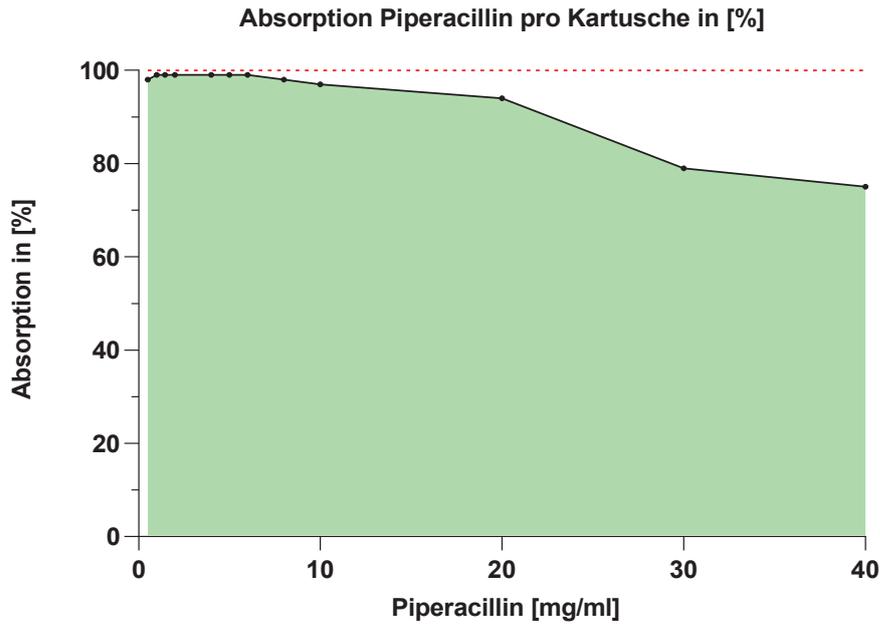


Abbildung 31: Absorption von Piperacillin/Kartusche in Prozent bei 37 °C
 Dargestellt sind auf der Y-Achse die Absorption in [%] sowie die applizierten Plasmakonzentrationen in [mg/ml] auf der X-Achse. Zunächst kommt es bei Konzentrationen bis 8 mg/ml Piperacillin zu einer 99 % Absorption mit beginnender Sättigung fällt die Absorption auf 97 % bei 10 mg/ml bzw. 94 % bei 20mg/ml und im weiteren Verlauf auf 79 % bei 30 mg/ml bzw. 75 % bei 40 mg/ml

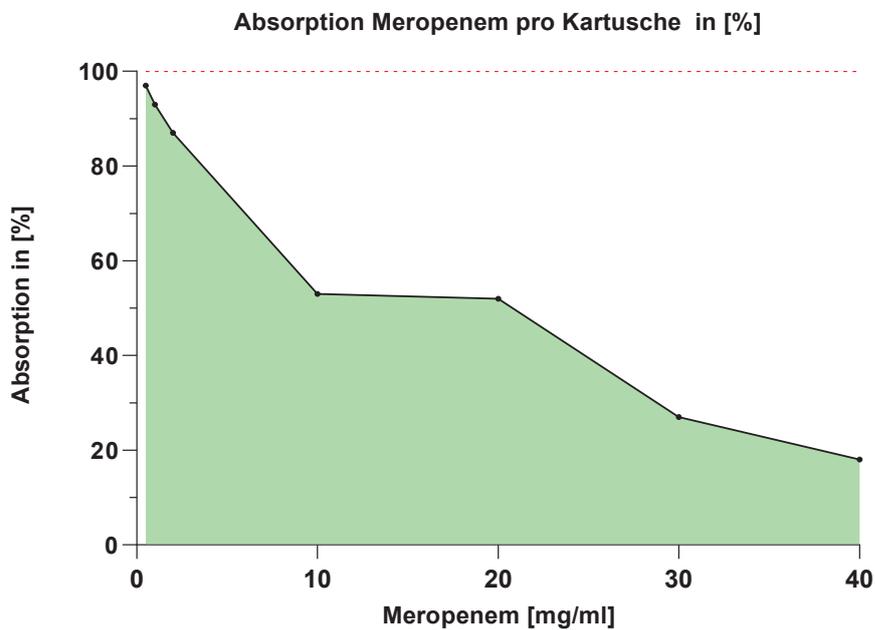


Abbildung 32: Absorption von Meropenem/ Kartusche in Prozent bei 37 °C
 Dargestellt sind auf der Y-Achse die Absorption in [%] sowie die applizierten Plasmakonzentrationen in [mg/ml] auf der X-Achse. Es kommt zu einem deutlichen Abfall der Absorption. Im Bereich 10-20 mg/ml werden rund 52 % des Antibiotikums gebunden. Bei 40 mg/ml werden noch 18 % der Substanz absorbiert.

Vergleichbare Werte zeigen sich auch in den durchgeführten Simulationsversuchen mit Hilfe eines die Pharmakokinetik vereinfacht abbildenden Modellsystems (Abbildung 26 und folgende). Dabei kam es 70 min nach der (simulierten) Infusion zur Unterschreitung der MHK für Piperacillin in Anwesenheit von Cytosorb sowie nach 150 min unter alleiniger (simulierter) CVVHD-Therapie. Demnach scheint die Abnahme der Plasmakonzentrationen von Piperacillin unter Cytosorb deutlich schneller abzulaufen als bisher angenommen. Sollte sich dies auch am Patienten so darstellen (zukünftige Studien), wäre eine entsprechende Anpassung des Therapie-Regimes zu erwägen, mit Kontrolle der aktuellen Plasmakonzentrationen von Piperacillin im Sinne eines „therapeutic drug monitoring“ und ggf. entsprechender Anpassung der Dosierung.

Betrachtet man in diesem Modell die Konzentrationsverläufe von Tazobactam unter CVVHD, so zeigt sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der Plasmaspiegel durch Cytosorb, wobei die Interaktion hier weniger stark ausfällt. So liegen zwischen 60 und 120 min (Versuchsdauer) die in der Simulation gemessenen Spiegel über denen der Verlaufsgruppe ohne Cytosorb. Im weiteren Verlauf fallen beide Konzentrationen vergleichbar ab (Abbildung 27 und Abbildung 29). Ein möglicher Faktor für diesen Unterschied könnte die Molekülgröße sowie die Anzahl der freien Bindungsstellen sein. Da Tazobactam als reiner β -Lactamase-Inhibitor fungiert, liegen keine MHK-Werte zur Bewertung der Plasmaspiegel vor.

Im Hinblick auf die Interaktionen mit Carbapenemen kann ebenfalls eine Reduktion der Plasmaspiegel im Beobachtungszeitraum gezeigt werden. Allerdings kommt es zu keinem Zeitpunkt zu einer Unterschreitung der MHK für Imipenem. Dabei hat die Anwendung von Cytosorb jedoch anscheinend nur eine geringere Auswirkung auf die Plasmaspiegel von Imipenem.

Nur wenige vorausgehende Untersuchungen haben sich der Bindung von Antiinfektiva an Zytokinadsorber im Kontext der Sepsis gewidmet. Scharf et. al [42] untersuchten den Einfluss der Cytosorb Therapie an septischen Patienten unter Vancomycin-Therapie. Auch mit Vancomycin konnte eine deutliche Reduktion der Exposition nachgewiesen werden. So zeigte sich, dass eine Kartusche Cytosorb bis zu 572 mg Vancomycin bindet. Dementsprechend

empfehlen die Autoren eine Anpassung des Dosisregimes. Im Vergleich zu den vorliegenden Daten handelt es sich bei der Untersuchung um eine *an Sepsis-Patienten* durchgeführte Studie an 7 Patienten, ohne Untersuchung der langfristigen Absorptionsfähigkeit. Somit dürften auch für Vancomycin weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Bindung an Cytosorb notwendig sein.

Mit den Auswirkungen einer Cytosorb-Therapie auf die Plasmaspiegel verschiedener Antiinfektiva im Tiermodell an Schweinen befassten sich Schneider et. al [16]. Dabei wurden im Rahmen einer experimentellen Interventionsstudie insgesamt 24 Schweine mit unterschiedlichen Antiinfektiva behandelt und analysiert. So wurden unter anderem Piperacillin und auch Meropenem sowie 15 weitere Substanzen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Gesamt-Clearance in der Gruppe mit der Hämoadsorption deutlich über der ohne Hämoadsorption lag (Ausnahme: Ganciclovir). Bei Fluconazol und Linezolid war die Auswirkung auf die Clearance am deutlichsten. Im Verlauf konnten die Autoren eine Korrelation zwischen der Lipophilie der Arzneimittel und deren Adsorption beobachten. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen konnte eine für Piperacillin um 19,5 %, sowie für Meropenem 6,3 % erhöhte Clearance im Beobachtungszeitraum festgestellt werden. Dabei beschränkte sich der Beobachtungszeitraum ebenfalls auf 360 min.

Mit den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Sättigungskinetiken konnte eine hohe Kapazität der Cytosorbfilter für die Bindung von Piperacillin ermittelt werden. So zeigte sich, dass im Bereich der klinisch relevanten Konzentrationen 99,9 % des applizierten Piperacillin, sowie 92,9 % des Tazobactam, durch Cytosorb gebunden werden. Vergleichbare Absorptionswerte zeigten sich auch für andere Penicilline, welche alle zu mehr als 90 % an Cytosorb gebunden wurden (Tabelle 11). Für Meropenem als einen Vertreter der Carbapeneme konnte eine Absorption von 93,0 % ermittelt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch König et. al in einer im Jahr 2019 durchgeführten Studie [43]. Hier zeigten sich Absorptionen von rund 94 % für Piperacillin sowie 95 % für Meropenem in 0,9 % NaCl Lösung. Diese Untersuchung konnte ebenfalls auch Reduktionen der Plasmaspiegel für verschiedene andere Antiinfektiva (z.B. Flucloxacillin, Fluconazol, Ciprofloxacin) nachweisen und bestätigt in dieser Hinsicht die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse.

Im Hinblick auf die GesamtabSORption einer Cytosorb-Kartusche zeigte sich für die untersuchten Substanzen eine so große Absorption, dass die Möglichkeit besteht, dass zumindest die Erstdosis der Antibiotika vollständig absorbiert wird. Allerdings handelt es sich bei den vorliegenden Daten um errechnete Kapazitäten. Um die Gesamtkapazität des Cytosorbfilters eingehender zu erfassen, sind weitere Untersuchungen im „full-scale“ Maßstab sowie klinische Studien an Patienten notwendig.

Eine im klinischen Alltag häufig zur Elimination von Toxinen und Medikamenten verwendete Substanz ist die Aktivkohle. Vor dem Hintergrund der hohen Bindungskapazität wurden in den vorliegenden Versuchen die Interaktionen von Cytosorb mit denen der Aktivkohle verglichen. Dabei zeigt sich eine etwa vergleichbar hohe Kapazität. Der Vergleich mit Aktivkohle, einem weithin bekannten und für viele Substanzen überaus effektiven Adsorber, dokumentiert eindrucksvoll die beachtliche Absorption von Piperacillin und anderen Antiinfektiva durch Cytosorb.

In diesem Zusammenhang zeigte eine Untersuchung des Fraunhofer Instituts von Körtge et. al [33], dass Cytosorb auch therapeutisch zur Elimination von Medikamenten bei Überdosierung oder Intoxikation eingesetzt werden könnte. Dabei konnte vor allem für Diazepam, Digoxin, Quetiapin und Amitriptylin eine starke Absorption (87,7- 96,9 %) nachgewiesen werden. Auch weniger starke Interaktionen mit Ibuprofen, Paracetamol und Amiodaron zeigten sich (13- 59 % Absorption). Dabei könnte das Absorptionsspektrum von Cytosorb auch weitere Substanzen umfassen, wie zum Beispiel Neuroleptika, Kardiaka und Hypnotika sowie unterschiedliche Toxine (u.a. Schlangengifte) [44].

Ein möglicherweise vorhandener Einflussfaktor für die Bindungsinteraktion könnte die Proteinbindung sein. Im Abgleich mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich eine stärkere Absorption von Piperacillin/Tazobactam mit einer Plasmaeiweißbindung von 30 % [36] im Vergleich zu Meropenem mit einer Plasmaproteinbindung von 2 % [45] zeigen (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).

Diese Hypothese lässt sich auch auf die vorliegenden Experimente zum Einfluss des Mediums auf die Absorption der Antibiotika an Cytosorb übertragen. In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich gerade im Bereich klinischer Konzentrationen eine stärkere Absorption von Piperacillin im Plasma sowohl in der Interaktion mit Cytosorb als auch mit Aktivkohle (Abbildung 18). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass eine Bindung von Plasmaproteinen an diese Absorptionsmedien neue, vorher noch nicht vorhandene Bindungsstellen für Piperacillin zugänglich macht. Somit könnte im Hinblick auf das mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführte Rezirkulationsmodell die tatsächliche Absorption im Patientenplasma noch höher sein.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt der Antibiotika Absorption ist die Frage nach der Reversibilität der initial gebunden Substanzen. Diese könnten protrahiert wieder freigesetzt werden, so dass die Bindung an den Cytosorb- Adsorber dann als speicherndes Kompartiment anzusehen wäre. In einer aktuellen Literaturrecherche konnten keine Aussagen diesbezüglich gefunden werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden daher auch Versuche zur Liberation gebundener Moleküle durchgeführt. Dabei zeigte sich bei klinisch relevanten Konzentrationen für keine der untersuchten Substanzen eine Freisetzung relevanter Mengen aus der Bindung an Cytosorb. Nur außerhalb der klinischen Bereiche, d.h. bei sehr hohen Konzentrationen sowie bei maximalen Sättigungseffekten, ließen sich noch 24,7 % der Initialdosis von Piperacillin, 57,8 % von Tazobactam sowie 81,7 % von Meropenem im Plasma nachweisen. Dementsprechend besteht offenbar eine partielle Reversibilität, die möglicherweise aber ohne klinische Relevanz ist.

Um die eingehenden Patientenbeobachtungen sowie die im Verlauf durchgeführten Versuche zu komplettieren, erfolgten mehrere Durchläufe mit einem vereinfachten Rezirkulationsmodell (siehe 3.3). Wie bereits weiter oben in der Diskussion ausgeführt, konnten in Anwesenheit von Cytosorb ebenfalls deutlich verringerte Spiegel für Piperacillin und Tazobactam nachgewiesen werden. Somit kann zumindest im Modell die eingangs erwähnte Beobachtung, dass es im Rahmen der CVVHD Therapie mit Cytosorb zur Unterschreitung der Antibiotikazielkonzentration kommt, bestätigt werden. Es zeigte sich im Modell eine Unterschreitung der Zielkonzentrationen (MHK Piperacillin) in Abwesenheit von

Cytosorb nach 150 min Versuchsdauer. Bei Anwesenheit des Cytosorbfilters im System kam es jedoch zu einer Unterschreitung der MHK bereits nach 70 min. Somit lässt sich auch in diesem Modell eine schnellere und stärkere Reduktion der Plasmakonzentration von Piperacillin/Tazobactam durch Cytosorb nachweisen. Diese hält auch über mehrere Tage hinweg an (12 Tage) und bestätigt somit die im statischen Experiment gezeigte, geringe Reversibilität (Abbildung 28)

Das hier angewendete Modell zeichnet sich durch einen einfachen Aufbau aus. Im Wesentlichen wurden hier relevante Bestandteile der Therapie (siehe 3.3) nachgebaut, auch wenn eventuelle Interaktionen der Dialyse auf die Elimination des Wirkstoffes nicht unmittelbar berücksichtigt werden und keine weiteren Interaktionen mit Plasmaproteinen oder Dialysat Lösungen abgebildet werden. Ein weiterer Aspekt ist, dass der Simulationsversuch hier aus verfahrenstechnischen Gründen in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt wurde. Dementsprechend könnten die hier gemessenen Antibiotikaspiegel noch deutlicher über denen der tatsächlichen Plasmaspiegel liegen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Absorption im Patienten noch ausgeprägter ist, da die Plasmaeiweißbindung als ein relevanter Einflussfaktor hier nicht berücksichtigt werden konnte.

Wie weiter oben bereits erwähnt, konnten Schneider et. al [16] im Tierversuch eine um 19.5 % erhöhte Clearance für Piperacillin nachweisen. Allerdings wurden in diesem Kontext keine Aussagen zur etwaigen Unterschreitung von Antibiotikazielkonzentrationen getätigt. Erwartungsgemäß berücksichtigt der Tierversuch Faktoren, die in dem hier verwendeten Modell nicht mit einbezogen werden konnten. So wurden die Untersuchungen im Unterschied zu dieser Dissertation mit Vollblut durchgeführt. Außerdem erfolgten die „*in vivo*“ Versuche unter Normothermie (37 °C), das hier verwendete Medium wurde hingegen unter Raumtemperatur zirkuliert. Zudem beinhaltet der lebende Organismus bei weitem komplexere Verteilungsräume als das in der vorliegenden Untersuchung verwendete Modell. Zusammenfassend aber decken sich die wesentlichen Aspekte der vorliegenden Arbeit mit den bereits durch Schneider et. al [16] veröffentlichten Ergebnissen.

Der in der vorliegenden Dissertation gezeigten unerwünschten Bindung und Inaktivierung von Antiinfektiva durch den Zytokinadsorber steht der mögliche therapeutische Nutzen bei Sepsis Patienten gegenüber. Mehrere Studien haben die Wirksamkeit der Zytokinadsorption im Kontext der Sepsis-Therapie untersucht. Hawchar et al. [46] kamen in einer größer angelegten Studie zu dem Ergebnis, dass eine Zytokin Reduktion für septische Patienten, auch ohne ein kontinuierliches Nierenersatzverfahren, einen sinnvollen Therapieansatz darstellt. Allerdings war die Anzahl der Patienten doch sehr begrenzt. So konnten nur 20 von 716 akquirierten Patienten tatsächlich für die Studie ausgewertet werden. Gleichwohl interpretierten die Autoren die Ergebnisse als klare Evidenz für den Einsatz von Zytokinfiltern.

Gruda et. al [47] untersuchten die Auswirkung einer Cytosorbtherapie auf Pathogen- und Schädigungs-assoziierte Proteinmuster (PAMP und DAMP Moleküle). Hierbei handelte es sich um eine *in vitro* Studie mit einem dem für diese Arbeit verwendeten Rezirkulationssystem vergleichbaren Modell. Ziel war es dabei, die Elimination der Entzündungsmediatoren genauer zu analysieren. In diesem Versuchsaufbau wurden präparierte Proteine mit Cytosorb in Kontakt gebracht und die zirkulierenden Plasmaspiegel gegenüber Vergleichsexperimenten untersucht. Es konnte hierbei eine deutliche Reduktion der PAMP und DAMP Spiegel (> 50 %) nachgewiesen werden. Es sollte dabei in Betracht gezogen werden, dass es sich um „*in vitro*“ Untersuchungen mit gesundem Probandenblut handelte, sodass Rückschlüsse auf einen möglichen Krankheitsverlauf nicht möglich sind.

In einer weiteren Arbeit von Chelazzi et al. [48] wurde der Einfluss von High-Cut-Off Hämodialyse (HCO- CVVHD) auf Patienten mit Sepsis und akutem Nierenversagen (AKI) untersucht. Im Rahmen einer retrospektiven Fall Kontrollstudie konnten von 837 Patienten, die auf einer Intensivstation aufgenommen wurden, nur 24 Patienten ausgewertet werden. Aus diesem Kollektiv wurden dann 16 Patienten mit HCO- CVVHD sowie 8 Patienten mit Highflow CVVHDF (HF-CVVHDF) ausgewählt. Als Zielparameter wurden hierbei die Dauer der künstlichen Beatmung, der Vasopressor Bedarf sowie die Dauer der CRRT definiert. Primäre Fragestellung war, ob diese Patienten von einer Therapie mit einer High Cut Off Hämodialyse im Gegensatz zu einer Therapie mit einer High Flow CVVHD profitieren. Im Hinblick auf die

Zielparameter konnte für die Beatmungsdauer und den Vasopressor Bedarf eine Reduktion nachgewiesen werden. Zu den Auswirkungen auf die Verweildauer auf einer Intensivstation konnten keine signifikanten Aussagen getroffen werden. In diesem Kontext wiesen Chelazzi et al. auch die möglichen Nebenwirkungen der HF-CVVHD, im Hinblick auf Reduktion von zirkulierenden Nährstoffen und Antibiotika hin. Ein möglicher Grund für ein besseres Abschneiden der HCO CVVHD schien in dieser Arbeit eine effektivere Elimination zirkulierender Zytokine zu sein. Somit könnte dies ein Hinweis sein, dass Sepsis Patienten vom Einsatz eines Zytokinfilters profitieren.

Weitere kleine Studien konnten ebenfalls keine Evidenz für einen klinischen Vorteil der Zytokinadsorption in verschiedenen anderen Indikationsgebieten liefern.

Zusammenfassend ist die bisherige Evidenz für einen klinischen Nutzen von Zytokinadsorbern damit noch gering. In einer von Hawchar et al [35] veröffentlichten Übersichtsarbeit konnten 1434 Patienten (davon 936 mit Sepsis) in ein zentrales Cytosorb Register aufgenommen werden. Dabei erfolgte in 96 % der Fälle eine Kombination der CVVHD Therapie mit einem Cytosorbfilter. Insgesamt konnte allerdings keine signifikante Verbesserung im Hinblick auf die Mortalität nachgewiesen werden. Es bleibt abzuwarten, ob künftige Studien mehr positive Evidenz für die Zytokinadsorption als Behandlungsansatz der Sepsis erbringen, so dass dies die Nachteile – wie die Verminderung der Wirkspiegel von Antiinfektiva – überwiegt.

6 Ausblick

Unter der anhaltenden Forschung der letzten Jahre kommen immer neue Hämoadsorptionstechnologien auf den Markt. Dabei weisen diese teilweise erhebliche Unterschiede auf, gerade im Hinblick auf Adsorptionscharakteristika und Adsorptionsspektren. Krenn und Stelzer weisen in ihrem Übersichtspaper zurecht auf deutliche Unterschiede der einzelnen Verfahren hin [25]. In diesem Zusammenhang wurde Cytosorb vergleichsweise häufig für Untersuchungen verwendet. Außer den bereits zugelassenen Anwendungsbereichen zeichnen sich unter der aktuellen Forschung weitere klinische Möglichkeiten ab. Eine mögliche Anwendung wäre die Behandlung von Intoxikationen mit Medikamenten, wie z.B. mit direkten oralen Antikoagulantien (DOAK) oder Digitalis Präparaten [33]. Unter der anhaltenden COVID-19 Pandemie wurden zudem auch Studien mit Corona positiven Patienten durchgeführt. In diesem Kontext zeichnen sich möglicher positive Effekte der Cytosorbtherapie ab [49], wobei die Autoren zu dem Ergebnis kommen, dass auch bei diesen Anwendungen noch weitere Untersuchungen notwendig sind.

7 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. med. Thomas Hohlfeld für die unzähligen Gespräche, Hintergrundinformationen und der Betreuung während der gesamten Promotionsdauer. Zudem möchte ich mich auch bei Professor Dr. med. Detlef Kindgen-Milles und Dr. med. Thomas Dimski für die Betreuung und Unterstützung während der klinischen Phasen bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Kirsten Bartkowski für ihre herzliche Betreuung im Labor, die vielen hilfreichen Informationen sowie Unterstützung und Vorbereitung der Versuche sowie deren Dokumentation. Schließlich möchte ich all jenen danken, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben, sei es mit Gesprächen, hilfreichen Tipps oder auch ehrlichem Feedback.

8 Geräte:

Materialliste	2015- 2020	
Produkt	Hersteller	Typ
Schlauchpumpe	Desaga	STA- Schlauchpumpe
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer 5436
Pipette	Gilson	Pipetman (10-1000µl)
Vortex	Heidolph	Reax 2000
Zentrifuge	Heraeus Sepatech	Minifuge RF
Zentrifuge	Hettich	Mikro 200R
HPLC	Merk Hitachi LaChrom	L-7455 Dioden Array Detector
Diode	Merk Hitachi LaChrom	L-7360 Column Oven
HPLC	Merk Hitachi LaChrom	L-7250 Autosampler
HPLC	Merk Hitachi LaChrom	L-7100 Pump (2 Stück)
HPLC	Merk Hitachi LaChrom	D-7000 Interface
HPLC	Merk Hitachi LaChrom	L-7420 UV-VIS Detector
HPLC	Degasys uniflow	DG-2410
Feinwaage	Mettler-Toledo	XS204 Delta Range
HPLC	Spectra System	UV 1000
Magnetrührer	Welabo	IKAMAG RCT
Rollenpumpe	Pharmacia fine chemicals	Peristaltic Pump P1
Falconröhrchen	Greiner	15/ 50 ml
Eppendorf Cups	Eppendorf	1,5 ml / 0,5ml
Cytosorb 300	CytoSorbents INC	
Nanofilter	PALL Life Science	Nanosep 3K OMEGA
Bottletop Filter	Sigma	Whatmann ZapCap-CR, Nylon, 0,2µm, Lösungsmittelresistent
HPLC-Säule	Macherey-Nagel	Nucleodur C18 Pyramid (250mm/4.6, 5µm)
HPLC-Vorsäule	Macherey-Nagel	EC 4/3 Nucleodur C18 Gravity, 5µm
Injektor	Hamilton	100µl
Zellkulturflaschen	Greiner	25ml / 250ml / 500ml
Micro-Insert	Greiner	0,2ml (30,75x5mm, clear,)

9 Substanzverzeichnis

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Acetonitril (ACN)	VWR Chemicals	83639.820
Dichlormethan (DCM)	VWR Chemicals	83623.320
DMSO	Sigma-Aldrich	27.043-1
Imipenem	Sigma-Aldrich	I0160
Penicilin G	Sigma-Aldrich	1375
Piperacillin/Tazobactam (4 mg/ 0,5mg)	Kabi Fresenius	
Piperacillin (4g)	Kabi Fresenius	
Phosphorsäure	Merck	1.00573
Meropenem	Sigma-Aldrich	M2574
Meropenem (1000mg)	Inresa	
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	6580
Natriumazid	Merck	1.06688.0100
NaCl	Merck	1.06404.1000
Ultracarbon Granulat	Merck, P&G Health Germany	

Literaturverzeichnis

Publikation

1. Brunkhorst, F. and R. Schmitz, *Sepsis – Epidemiologie, Biomarker und mikrobiologische Diagnostik*. Der Klinikarzt, 2014. 43(06): p. 284-288.
2. Bracht, H. et al. , [*Sepsis Update: Definition and Epidemiology*]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2019. 54(1): p. 10-20.
3. Auskunftsdienst des Bundes, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes - RKI & Destatis*.
4. Singer, M. et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. *JAMA*, 2016. 315(8): p. 801-10.
5. Schubert A.K. et al., *Grundlagen der Nierenersatztherapie in der perioperativen Intensivmedizin*. *Aästh Intensivmed* 2018;
6. Ricci, Z. et al., *Organ dysfunction during continuous veno-venous high cut-off hemodialysis in patients with septic acute kidney injury: A prospective observational study*. *Plos One*, 2017. 12(2).
7. James A Brady et al., *Patent Cytosorb; US 8,329,388 B2*, U.S. Patent, Editor. 2012.
9. SepNet Critical Care Trials, G., *Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study*. *Intensive Care Med*, 2016. 42(12): p. 1980-1989.
10. Brunkhorst, F.M. et al., *Effect of empirical treatment with moxifloxacin and meropenem vs meropenem on sepsis-related organ dysfunction in patients with severe sepsis: a randomized trial*. *JAMA*, 2012. 307(22): p. 2390-9.
11. Levy, M.M. et. al, *The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update*. *Intensive Care Med*, 2018. 44(6): p. 925-928.
12. Brunkhorst FM et.al, *S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge*. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), 2019.
13. Engelmann, L. et al. [*Tarragona strategy--appropriate antibiotic therapy in the ICU*]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2014. 109(3): p. 156-61.
14. Kumar, A. et al., *Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*. *Crit Care Med*, 2006. 34(6): p. 1589-96.
15. Remschmidt, C. et al., *Surveillance of Antibiotic Use and Resistance in Intensive Care Units (SARI)*. *Dtsch Arztebl Int*, 2017. 114(50): p. 858-865.
16. Schneider, A.G. et al., *Pharmacokinetics of anti-infective agents during CytoSorb hemoabsorption*. *Sci Rep*, 2021. 11(1): p. 10493.
20. Briegel, J. et. al, [*Surviving Sepsis Campaign update 2018: the 1 h bundle : Background to the new recommendations*]. *Anaesthesist*, 2019. 68(4): p. 204-207.
21. Rimmele, T. et al., *Clinical review: blood purification for sepsis*. *Crit Care*, 2011. 15(1): p. 205.
22. Raina, R., et al., *The Emergency Use of the oXiris Device with Continuous Kidney Replacement Therapy in COVID-19 Patients with Acute Kidney Injury*. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 2021. 05(04).
23. Fengmin, S., et al., *The absorbing filter Oxiris in severe COVID-19 patients: A case series*. *Artif Organs*, 2020.

24. Kimmel, J.D., et al., *IL-6 adsorption dynamics in hemoadsorption beads studied using confocal laser scanning microscopy*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010. 92(2): p. 390-6.
25. Krenn, C.G. et. al, *Hemoadsorption for blood purification-incomparability of clinically available procedures*. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2021. 116(5): p. 449-453.
26. Jackson, R., et.al, *Hemadsorption for removal of ticagrelor and direct oral anticoagulants in cardiac surgery*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2022. 20(2): p. 141-150.
29. Kogelmann, K., et al., *Hemoadsorption by CytoSorb in septic patients: a case series*. Crit Care, 2017. 21(1): p. 74.
30. Rugg, C., et al., *Hemoadsorption with CytoSorb in Septic Shock Reduces Catecholamine Requirements and In-Hospital Mortality: A Single-Center Retrospective 'Genetic' Matched Analysis*. Biomedicines, 2020. 8(12).
31. Schultz, P., et al., *High-dose CytoSorb hemoadsorption is associated with improved survival in patients with septic shock: A retrospective cohort study*. J Crit Care, 2021. 64: p. 184-192.
32. Santer, D., et al., *Hemoadsorption during Cardiopulmonary Bypass in Patients with Endocarditis Undergoing Valve Surgery: A Retrospective Single-Center Study*. J Clin Med, 2021. 10(4).
33. Andreas Körtge, et al. *Removal capability of Cytosorb Heamadsorption in Columns for selected prescription Drugs frequently related to Drug overdose*. 2017.
34. Willem Pieter Brouwer, et al., *Hemoadsorption with CytoSorb shows a decreased observed versus expected 28day all-cause mortality in ICU patients with septic shock: a propensity-score-weighted retrospective study*. Crit Care, 2019.
35. Hawchar, F., et al., *Hemoadsorption in the critically ill-Final results of the International CytoSorb Registry*. PLoS One, 2022. 17(10): p. e0274315.
38. Bryson, H.M. et al., *Piperacillin/tazobactam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential*. Drugs, 1994. 47(3): p. 506-35.
39. Yang, H., et al., *Clinical outcomes with alternative dosing strategies for piperacillin/tazobactam: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2015. 10(1): p. e0116769.
40. Varghese, J.M., et al., *Pharmacokinetics of piperacillin and tazobactam in plasma and subcutaneous interstitial fluid in critically ill patients receiving continuous venovenous haemodiafiltration*. Int J Antimicrob Agents, 2014. 43(4): p. 343-8.
41. Awissi, D.K., et al., *Pharmacokinetics of an extended 4-hour infusion of piperacillin-tazobactam in critically ill patients undergoing continuous renal replacement therapy*. Pharmacotherapy, 2015. 35(6): p. 600-7.
42. Scharf, C., et al., *Does the cytokine adsorber CytoSorb((R)) reduce vancomycin exposure in critically ill patients with sepsis or septic shock? a prospective observational study*. Ann Intensive Care, 2022. 12(1): p. 44.
43. König, C., et al., *In vitro removal of anti-infective agents by a novel cytokine adsorbent system*. Int J Artif Organs, 2019. 42(2): p. 57-64.
44. Kohler, T., et al., *Therapeutic Modulation of the Host Defense by Hemoadsorption with CytoSorb((R))-Basics, Indications and Perspectives-A Scoping Review*. Int J Mol Sci, 2021. 22(23).
46. Hawchar, F., et al., *Extracorporeal cytokine adsorption in septic shock: A proof of concept randomized, controlled pilot study*. J Crit Care, 2019. 49: p. 172-178.

47. Gruda, M.C., et al., *Broad adsorption of sepsis-related PAMP and DAMP molecules, mycotoxins, and cytokines from whole blood using CytoSorb(R) sorbent porous polymer beads*. PLoS One, 2018. 13(1): p. e0191676.
48. Chelazzi, C., et al., *Hemodialysis with High Cut-Off Hemodialyzers in Patients with Multi-Drug Resistant Gram-Negative Sepsis and Acute Kidney Injury: A Retrospective, Case-Control Study*. Blood Purif, 2016. 42(3): p. 186-93.
49. Ruiz-Rodriguez, J.C., et al., *The Use of CytoSorb Therapy in Critically Ill COVID-19 Patients: Review of the Rationale and Current Clinical Experiences*. Crit Care Res Pract, 2021. 2021: p. 7769516.

Webseiten

8. *Cytosorb Therapie*. Website: <https://cytosorb-therapy.com/de/der-adsorber/>, letzter Zugriff 28.02.2023.

Fachinformationen

36. Fresenius Kabi AG, *Fachinformation Piperacillin/Tazobactam*. Compendium CH, 2020.
37. Fa. Merck, Sharp & Dohme., *Fachinformation ZIENAM*. 2021.
45. Fa. Pfizer, *Fachinformation Meronem*. 2020.

Abbildungen

17. Fa. Sigma Aldrich, *Piperacillin*. 2020.
18. Fa. Sigma Aldrich, *Tazobactam*. 2020.
19. Fa. Sigma Aldrich, *Meropenem*. 2020.
27. Fa. Sigma Aldrich, *Polyvinylpyrrolidon*. 2023.
28. Fa. Sigma Aldrich, *Divinylbenzol*. 2023.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Strukturformel [17]	6
Abbildung 2 Strukturformel Tazobactam[18]	6
Abbildung 3. Strukturformel Meropenem [19]	6
Abbildung 4: Polyvinylpyrrolidon [27]	11
Abbildung 5: Divinylbenzol [28]	11
Abbildung 7: Absorptionsspektrum Cytosorb [8]	11
Abbildung 8: Aufbau Cytosorb[8]	11
Abbildung 9: schematischer Dialysekreislauf.....	18
Abbildung 10: Probenentnahme	19
Abbildung 11: Cytosorb Kartusche	23
Abbildung 12: Schematische Darstellung Simulationsversuch PIP	24
Abbildung 13: Versuchsaufbau Piperacillin/Tazobactam im Umlaufversuch	24
Abbildung 14: Piperacillin bei Patienten mit CVVHD	30
Abbildung 15 Piperacillinspiegel im Vergleich mit und ohne CS im zuführenden Dialyseschenkel (prä CS).....	31
Abbildung 16 Piperacillinspiegel im Vergleich mit und ohne Cytosorb im abgehenden Dialyseschenkel (post CS)	31
Abbildung 17 Imipenem unter CVVHD Therapie	33
Abbildung 18 Piperacillin-Konzentration in unterschiedlichen Medien	35
Abbildung 19 Sättigungskinetik Piperacillin mit Cytosorb auf unterschiedlichen Medien.....	35
Abbildung 20 Vergleich Sättigungskinetik Meropenem mit Piperacillin auf Cytosorb (n=4) ..	38
Abbildung 21 Sättigungskinetik Tazobactam auf Cytosorb (n=4)	38
Abbildung 22 Vergleich der Sättigungskinetik Piperacillin auf unterschiedlichen Filtersubstanzen (n=4).....	40
Abbildung 23 Sättigungskinetik Piperacillin auf Aktivkohle in unterschiedlichen Medien (n=4)	40
Abbildung 24:Reversibilitätsversuch mit Piperacillin (n=2).	42
Abbildung 25: Reversibilitätsversuche mit Tazobactam (n=2).....	42
Abbildung 26: Reversibilitätsversuch mit Meropenem (n=2)	43
Abbildung 27: Simulationsversuch Piperacillin	46
Abbildung 28 Simulationsversuch Tazobactam.	47
Abbildung 29: Simulationsversuch Piperacillin im zeitlichen Verlauf.	47
Abbildung 30 Simulationsversuch Tazobactam im zeitlichen Verlauf	48
Abbildung 31: Freisetzung Piperacillin im Umlaufversuch.....	48
Abbildung 32: Absorption von Piperacillin/Kartusche in Prozent bei 37°C:	52
Abbildung 33: Absorption von Meropenem/ Kartusche in Prozent bei 37°C.....	52