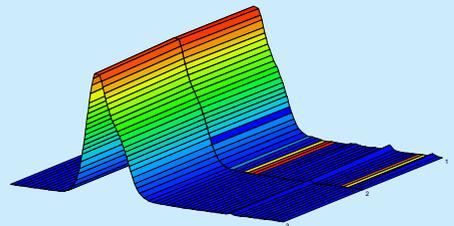


Molmassenverteilung der in Milz und Leber gespeicherten Hydroxyethylstärke (HES) bei Ratten nach intravenöser Applikation – Polymeranalytische Untersuchungen mittels Kopplung der Ausschluss-Chromatographie und Mehrwinkel-Laser-Streulicht-Detektion



INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

von
MARGIT WAGENBLAST

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2004

© 2004 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-07-3

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Experimentelle Anästhesiologie
des Zentrums der Anästhesiologie und Wiederbelebung
der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. Dr. H. Förster

Eingereicht über das Institut für Biochemie und Endokrinologie der
Justus - Liebig - Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. W. Schoner

**Molmassenverteilung der in Milz und Leber
gespeicherten Hydroxyethylstärke (HES) bei
Ratten nach intravenöser Applikation –
Polymeranalytische Untersuchungen mittels
Kopplung der Ausschluss-Chromatographie
und Mehrwinkel-Laser-Streulicht-Detektion**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Eingereicht von
MARGIT WAGENBLAST
Tierärztin aus Aalen

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Förster
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Schoner

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2004

Abkürzungsverzeichnis

I	Einleitung	1
<i>I.1</i>	<i>Kolloidale Volumenersatzmittel</i>	<i>1</i>
<i>I.1.1</i>	<i>Wirkprinzip</i>	<i>4</i>
<i>I.2</i>	<i>Charakterisierung des HES-Polymers</i>	<i>5</i>
<i>I.2.1</i>	<i>Substitution</i>	<i>5</i>
<i>I.2.2</i>	<i>Molmassenverteilung der HES</i>	<i>6</i>
<i>I.2.2.1</i>	<i>Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw)</i>	<i>7</i>
<i>I.2.2.2</i>	<i>Zahlenmittelwert der Molmasse (Mn)</i>	<i>8</i>
<i>I.2.2.3</i>	<i>Polydispersität</i>	<i>8</i>
<i>I.2.2.4</i>	<i>Molmasse im Peakmaximum (Mp)</i>	<i>8</i>
<i>I.3</i>	<i>Einsatz von HES bei Tieren</i>	<i>9</i>
<i>I.4</i>	<i>Pharmakokinetik und Metabolismus der HES</i>	<i>12</i>
<i>I.5</i>	<i>Fragestellung</i>	<i>19</i>
II	Material und Methoden	20
<i>II.1</i>	<i>Infusionslösungen</i>	<i>20</i>
<i>II.2</i>	<i>Tierversuche</i>	<i>20</i>
<i>II.2.1</i>	<i>Tierspezies und Haltungsbedingungen</i>	<i>20</i>
<i>II.2.2</i>	<i>Katheterinsertion</i>	<i>21</i>
<i>II.2.3</i>	<i>Infusion</i>	<i>21</i>
<i>II.2.3.1</i>	<i>Verfahren während der Infusion</i>	<i>21</i>
<i>II.2.3.2</i>	<i>Festlegung der Infusionsmengen</i>	<i>22</i>
<i>II.2.4</i>	<i>Versuchsaufbau</i>	<i>22</i>
<i>II.3</i>	<i>Biochemische Nachweismethoden</i>	<i>24</i>
<i>II.3.1</i>	<i>Hämoglobinkonzentration</i>	<i>24</i>
<i>II.3.2</i>	<i>Hämatokrit</i>	<i>24</i>
<i>II.4</i>	<i>Bestimmung der Molmassenverteilung</i>	<i>25</i>
<i>II.4.1</i>	<i>Theoretischer Hintergrund</i>	<i>25</i>
<i>II.4.1.1</i>	<i>Ausschlusschromatographie</i>	<i>25</i>
<i>II.4.1.2</i>	<i>Molmassendetektion</i>	<i>25</i>
<i>II.4.2</i>	<i>Geräte und Trennsäulen</i>	<i>29</i>

II.4.3	Ausschlusschromatographie SEC _____	30
II.4.4	Geräteparameter und Kalibrierungen _____	30
II.4.4.1	Aufzeichnung und Auswertung der Detektorsignale _____	31
II.4.4.2	Grundkalibrierung mit HES-Lösungen _____	31
II.4.5	Isolierung der HES aus dem Serum _____	32
II.4.6	Isolierung der HES aus Leber und Milz _____	32
II.4.6.1	Validierung der Methode _____	32
II.4.6.2	Probenvorbereitung für die HPLC _____	33
II.5	<i>Statistische Auswertung</i> _____	35
III	Ergebnisse _____	36
III.1	<i>Eigenschaften der Infusionslösungen</i> _____	36
III.2	<i>Gewicht der Versuchstiere</i> _____	37
III.3	<i>Klinische Beobachtungen</i> _____	38
III.4	<i>Blutuntersuchungen</i> _____	39
III.4.1	Hämoglobinkonzentration _____	39
III.4.2	Hämatokrit _____	41
III.5	<i>Molmassenverteilung von HES</i> _____	42
III.5.1	Molmassenverteilung im Serum _____	42
III.5.1.1	Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw), HES im Serum _____	43
III.5.1.2	Zahlenmittelwert der Molmassen (Mn), HES im Serum _____	44
III.5.1.3	Polydispersität, HES im Serum _____	45
III.5.1.4	Molmasse im Peakmaximum (Mp), HES im Serum _____	46
III.5.2	Molmassenverteilung in der Leber _____	47
III.5.2.1	Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw), HES in der Leber _____	49
III.5.2.2	Zahlenmittelwert der Molmassen (Mn), HES in der Leber _____	51
III.5.2.3	Polydispersität, HES in der Leber _____	52
III.5.2.4	Molmasse im Peakmaximum (Mp), HES in der Leber _____	55
III.5.3	Molmassenverteilung in der Milz _____	56
III.5.3.1	Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw), HES in der Milz _____	57
III.5.3.2	Zahlenmittelwert der Molmassen (Mn), HES in der Milz _____	58
III.5.3.3	Polydispersität, HES in der Milz _____	59
III.5.3.4	Molmasse im Peakmaximum (Mp), HES in der Milz _____	60

Inhaltsverzeichnis

III.5.4	Molmassenverteilung in Serum, Leber und Milz im Vergleich _____	61
III.5.4.1	Serum-, Leber- und Milz-Werte nach Infusion von HES 450/0,7 _____	61
III.5.4.2	Serum-, Leber- und Milz-Werte nach Infusion von HES 200/0,5 _____	64
III.5.4.3	Serum-, Leber- und Milz-Werte nach Infusion von HES 130/0,4 _____	67
IV	Diskussion _____	69
<i>IV.1</i>	<i>Tierversuchsmodell und klinische Beobachtungen</i> _____	<i>69</i>
<i>IV.2</i>	<i>Molmassenverteilung der HES</i> _____	<i>71</i>
IV.2.1	Methodenentwicklung zur Molmassenbestimmung der HES _____	71
IV.2.2	HES in Serum, Leber und Milz _____	74
V	Zusammenfassung _____	81
	Summary _____	83
VI	Literaturverzeichnis _____	85
VII	Abbildungsverzeichnis _____	100
VIII	Tabellenverzeichnis _____	103
IX	Anhang _____	104
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A ₂	zweiter Virialkoeffizient
Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome, Erkrankung infolge Infektion mit dem humanen Immunsuffizienz-Virus
Anon.	Anonymus
B	Bestimmtheitsmaß
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
¹⁴ C	radioaktiv markiertes Kohlenstoffatom
c	Konzentration
C2, C3, C6	Kohlenstoffatom an der Position 2, 3 oder 6 des Glucoserings
ca.	circa
cm	Zentimeter
<i>d</i>	Durchmesser
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dL	Deziliter
dn/dc	Brechungsindexinkrement
DS	Substitutionsgrad
e	Basis des natürlichen Logarithmus
et al.	et alii
etc.	et cetera
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FELASA	Föderation der Europäischen Gesellschaften für Versuchstierkunde – Federation of European Laboratory Animal Science Associations
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung
GPC	Gelpermeationschromatographie

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobingehalt
HES	Hydroxyethylstärke
HES-Inf.	HES-Infusion
HKT	Hämatokrit
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPLC-SEC	Hochleistungs-Flüssig-Größenausschlusschromatographie
HsdCpb:WU	Rattenstamm (Wistar Unilever) nach Nomenklatur
I_0	Intensität des einfallenden Lichts
Inf.	Infusion
insb.	insbesondere
IU	international Units
k	Eliminationskonstante
K	optischer Kontrastfaktor
kcal	Kilokalorie
kDa	kilo-Dalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LALLS	Low Angle Laser Light Scattering (Kleinwinkel-Laser-Streulicht-Untersuchungen)
LDH	Laktat-Dehydrogenase
Ln	natürlicher Logarithmus
M	Molmasse
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering (Mehrwinkel-Laser-Streulicht-Untersuchungen)
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minuten
MJ	Megajoule
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

Abkürzungsverzeichnis

Mn	Zahlenmittelwert der Molmassen
Mp	Molmasse im Peakmaximum des Elutionsdiagramms
MS	molekulare Substitution
Mw	Gewichtsmittelwert der Molmassen
Mw/Mn	Polydispersitätsquotient
n	Anzahl
N	Stickstoff
N _A	Avogadro-Konstante
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
p	Wahrscheinlichkeit
p.A.	pro Analyti
PAS	Period acid SCHIFF (Perjodsäure), Reaktion z.B. zum Nachweis von Polysacchariden
PC	Personalcomputer
PVP	Polyvinylpyrrolidon
P _θ	Partikelstreuungsfunktion
r	Radius, Abstand des Detektors vom Streuvolumen
R _θ	Exzeß-Rayleigh-Verhältnis
R	Streuintensität (absolute Streuintensität R _θ , Streuintensität der Kolloidlösung R _{θL} , Streuintensität des Lösungsmittels R _{θ0})
RES	retikuloendotheliales System
RI	Differential-Refraktometer (Brechungsindex-Detektor)
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SEC	Size Exclusion Chromatographie (Größenausschlusschromatographie)
SEC-MALLS-HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Größenausschlusschromatographie mit gekoppelter Mehrwinkel-Laser-Streulicht-Untersuchung
sin	Sinus
sog.	sogenannte(r)

Abkürzungsverzeichnis

t	Zeitpunkt
Tab.	Tabelle
u.a.	und andere(s)
U/L	Units pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
V	Volumen
vs	versus
Y_0	fiktiver Ausgangswert
Y_i	Wert zu jedem beliebigen Zeitpunkt t
z.B.	zum Beispiel
ΔV_D	Volumenversatz
θ	Winkel (des Streulichts)
λ	Wellenlänge
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
\emptyset	durchschnittlich

I Einleitung

1.1 Kolloidale Volumenersatzmittel

Kolloidale Volumenersatzmittel sind im Bereich der Humanmedizin als Ersatz von Albumin unentbehrlich geworden. Vor allem in der Notfallmedizin wurde der Einsatz von humanen Blutprodukten aufgrund der Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten wie Hepatitis oder AIDS stark eingeschränkt [1, 2]. Das Risiko einer Infektion durch die Blutprodukte ist allerdings aufgrund aufwändiger Verfahren mittlerweile sehr gering [3, 4]. Als weitere Nachteile von Plasmaproteinen haben sich die begrenzte Verfügbarkeit und die eingeschränkte Haltbarkeit bei gleichzeitig sehr hohen Kosten erwiesen. Seit nunmehr etwa hundert Jahren werden daher alternativ körperfremde Plasmaersatzlösungen verwendet.

Die Entwicklung der Volumenersatztherapie nahm ihren Ausgang in einem Tierexperiment von Kranecker und Sander im Jahr 1879. Von diesen Autoren wurde bei einer Ziege nach Aderlass eine Kochsalzlösung intravenös zugeführt. Die erste erfolgreiche Kochsalzinfusion bei einem menschlichen Patienten im hypovolämischen Schock wurde 1881 von Landerer vorgenommen. 1896 entdeckte Starling die Bedeutung des durch die Eiweißkörper hervorgerufenen kolloidosmotischen Druckes für die intravasale Flüssigkeitsregulation [5].

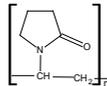
Das erste zum Volumenersatz verwendete Kolloid, die Gelatine, wurde bereits während des ersten Weltkrieges eingesetzt [6]. Zur Infusion geeignete, niedermolekulare Gelatine wird jedoch in der Niere rasch glomerulär filtriert. Ein weiteres Kolloid, das Gummi arabicum, wurde ebenfalls bereits während des ersten Weltkrieges als Volumenersatzmittel eingesetzt [7]. Kaum zu vermeidende Nebenwirkungen nach Applikation des pflanzlichen Polysaccharids Gummi arabicum beendete allerdings die Bemühungen, dieses Hydrokolloid therapeutisch einzusetzen.

Seit dieser Zeit wurde kontinuierlich an der Weiterentwicklung und Verbesserung von Gelatinelösungen gearbeitet. So entwickelte Campell 1950 die Oxy-polygelatine [8]. Doch bleibt die Vergrößerung der Molmassen bei Gelatinederivaten

in Grenzen. Aufgrund ihrer entsprechend sehr kurzen Wirkdauer haben Präparate auf Gelatine-Basis stets eine untergeordnete Rolle für den Volumenersatz gespielt.

Durch Fortschritte in der Chemie makromolekularer Produkte und durch die Entwicklung neuartiger Analysemethoden kam es gegen Mitte des 20. Jahrhunderts zur Entwicklung von mehreren synthetischen kolloidalen Volumenersatzmitteln.

Im zweiten Weltkrieg wurde mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) zunächst ein künstliches Hydrokolloid mit der Struktur



entwickelt, welches als Periston oder Kollidon bezeichnet wurde [9]. Im Tierversuch wurden Speicherungsphänomene in den Organen Niere („Kollidonniere“), Milz, Lunge und Leber festgestellt [10]. Durch Nierenversagen infolge der Speicherung von PVP und durch Diskussionen um die Kanzerogenität dieser Substanz kam es zum Verschwinden des PVP aus dem klinischen Gebrauch [11, 12].

Das Polysaccharid Dextran (s. Abb. I- 1) ist bis heute im klinischen Einsatz. Die Ausgangssubstanz Dextran war schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts als eine Verunreinigung der Saccharose nach Infektion durch das Bakterium *Leuconostoc mesenteroides* bekannt. Die Entwicklung der Substanz als volumenwirksames Hydrokolloid erfolgte 1943 in Schweden [13]. Die Anwendung von Dextran wird durch die Existenz von präformierten Antikörpern und damit der Gefahr von anaphylaktoiden Reaktionen erschwert [14]. Das für die Antikörperentwicklung gegen Dextran wirksame Antigen entsteht in der Mundhöhle bei der Umwandlung von Rohrzucker in Dextran durch Bakterien. Extrazelluläre bakterielle Enzyme bewirken eine Umlagerung der relativ energiereichen diglykosidischen Bindung von Saccharose in die relativ energiearme glykosidische Bindung von Dextran, zusätzlich entsteht freie Glucose. Dieses Dextran kann im Bereich der Zahnhöhle und des Zahnfleisches durch Mikroläsionen einmassiert werden und dadurch als Antigen wirksam werden [15]. Die vorangehende Applikation von Haptenen (d.h. von niedermolekularem Dextran) hat diese Nebenwirkung nicht vollständig aufheben können [16].

Auch im veterinärmedizinischen Bereich sind derartige Unverträglichkeitsreaktionen nicht auszuschließen. In einer Studie an Hunden waren bei vielen Tieren präformierte, dextranreaktive Antikörper im Serum nachweisbar. Nach intravenöser Applikation von 1 mL Dextran 60 traten bei 62% der Hunde anaphylaktische Reaktionen auf [17]. Bei der Verwendung von Dextran wird zudem auf die Gefahr von Nierenfunktionsstörungen hingewiesen [18].

Als weiteres Polysaccharid kommt Stärke als kolloidales Volumenersatzmittel infrage. Im Gegensatz zu dominierenden 1,6-Bindungen von Dextran sind die Glucosemoleküle bei der Stärke vorwiegend aus α -1-4 glykosidischen Bindungen aufgebaut (s. Abb.I- 1). Die pflanzliche Stärke, bestehend aus Amylopektin und Amylose, ist chemisch mit dem körpereigenen Glycogen vergleichbar. Native hochmolekulare Stärke erlaubt jedoch wegen geringer Löslichkeit infolge von innermolekularen und von intermolekularen Wechselwirkungen keine Herstellung infusionsgeeigneter Lösungen. Daher sind Modifikationen der Stärke erforderlich.

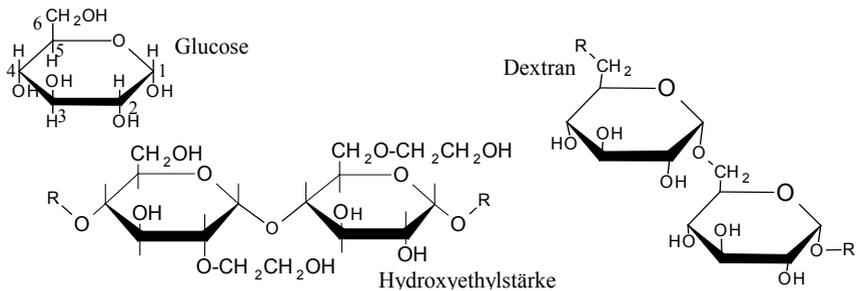


Abb.I- 1: Glucose und Ausschnitt aus Dextran sowie einem an C2 bzw. C6 hydroxyethyliertem Glucosepolymer mit α 1-4 glycosidischer Bindung.

Von Wiedersheim [19] wurden erste Versuche mit substituierter Stärke vorgenommen. Eingesetzt wurde eine Oxostärke. Von Thompson et al. [20] wurden mehrere Substituenten auf ihre Eignung zur Herstellung von infusionsgeeigneten Präparaten untersucht. Dabei haben sich hydroxyethylierte Glucosepolymere (s. Abb.I- 1) im Tierexperiment als am besten geeignet herausgestellt. Die gute Verträglichkeit und gute Wirksamkeit der Hydroxyethylstärke (HES) konnte in weiteren tierexperimentellen Studien [21, 22] sowie anhand klinischer Studien [23, 24] frühzeitig nachgewiesen werden.

Hydroxyethylstärke ist in Japan und in den USA seit 1973 und in der Bundesrepublik Deutschland seit 1974 als Volumenersatzmittel zugelassen. Unter den in der Humanmedizin angewandten Plasmaexpandern hat HES in Deutschland die wichtigste Rolle eingenommen.

Neben der Anwendung als Volumenersatzmittel (z.B. bei hämorrhagischem Schock) wird HES zur Hämodilution in der Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit verwendet [25]. Ferner kommt es zur Verbesserung der Rheologie bei Durchblutungsstörungen [26, 27] sowie beim zerebralem Insult [28] zum Einsatz. Die Wirksamkeit der hypervolämischen Hämodilution mit HES beim Schlaganfall ist allerdings umstritten [29]. Ein weiteres Einsatzgebiet von HES ist die Behandlung der koronaren Herzkrankheit [30]. Eine prinzipielle Eignung als kolloidosmotisch wirksame Substanz bei der Peritonealdialyse wurde tierexperimentell nachgewiesen [31].

Eine häufig beschriebene Nebenwirkung der HES stellt ein vor allem nach Verabreichung hoher Dosen HES auftretender Juckreiz dar [32, 33, 34, 35]. Im Gegensatz zu Dextran (Inzidenz 0,273%) ist HES jedoch kaum (Inzidenz 0,058%) mit der Gefahr anaphylaktischer Reaktionen verbunden [36].

1.1.1 Wirkprinzip

Das intravasale Flüssigkeitsvolumen wird über den kolloidosmotischen Druck und über das Wasserbindungsvermögen der Eiweißbestandteile des Blutes geregelt. Die wichtigste Rolle kommt hierbei dem hydrophilen Albumin zu. Der hydrophile Charakter unterscheidet Albumin von anderen Plasmaproteinen wie zum Beispiel Globulinen [37]. Eine weitere wichtige Bedeutung hat das Plasmaprotein Albumin für die Fließfähigkeit des Blutes, die Blutviskosität.

Kolloidale Volumenersatzmittel haben die Aufgabe, Albumin in seinen Eigenschaften zu ersetzen. Man benötigt daher hydrophile Makromoleküle wie beispielsweise HES. Hydrokolloide sind aufgrund ihres kolloidosmotischen (onkotischen) Druckes in der Lage einerseits Wasser im intravasalen Raum zu halten und andererseits die Blutviskosität zu verbessern.

1.2 Charakterisierung des HES-Polymers

Hydroxyethylstärke leitet sich von dem pflanzlichen verzweigt-kettigen Glucosepolysaccharid Amylopektin ab, welches eine enge Verwandtschaft zum körpereigenen Glycogen aufweist. Amylopektin muss chemisch modifiziert werden um stabile Lösungen herstellen zu können deren Konzentrationen onkotisch wirksam sind. Dies geschieht z.B. durch Einbringen von Hydroxyethylgruppen, die an die Hydroxygruppen der Kohlenstoffatome C2, C3 und C6 des Glucoserings gebunden werden (s. Abb.I- 1).

Molmassenverteilung und Substitution der Stärke charakterisieren die HES für den klinischen Gebrauch. HES wird dementsprechend anhand ihres mittleren Molekulargewichts und ihrer Substitution gekennzeichnet. So handelt es sich bei HES 200/0,5 um eine HES mit einem Molmassenmittelwert (M_w) von 200.000 Dalton und einer molaren Substitution (MS) von 50%. Eingeteilt werden die verschiedenen Präparate zum einen nach ihrem M_w (hochmolekular (~ 450 kDa), mittelmolekular (~200 kDa) und niedermolekular (~70 kDa)) zum anderen nach ihrem MS (hochsubstituiert (0,7), mittelsubstituiert (0,5) und niedrigsubstituiert (0,4)).

HES, wie sie in den Lösungen für den kolloidalen Volumenersatz enthalten ist, stellt wie alle anderen synthetischen Kolloide keine einheitliche Substanz dar, sondern besteht aus vielen verschiedenen Molekülen mit einer erheblichen Verteilungsbreite des Molekulargewichtes und der Verteilung der Substituenten. Unter vergleichbaren Bezeichnungen können sich somit HES-Präparate verbergen, die in ihren Spezifikationen erheblich voneinander abweichen können.

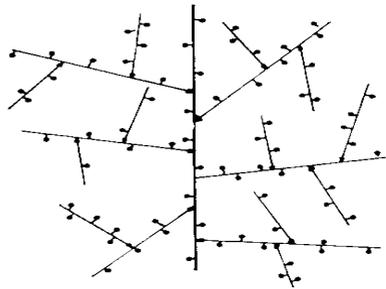
1.2.1 Substitution

Die Ausgangssubstanz Stärke wird nach Teilhydrolyse durch Substitution von Hydroxygruppen der Zuckerreste mit Hydroxyethylgruppen modifiziert. Die Strukturänderung führt zu zwei wesentlichen und erwünschten Änderungen der Eigenschaften [38]:

- Verbesserung der Löslichkeit durch Aufspreizung der baumartig verzweigten Grundstruktur (s. Abb.I- 2)



Amylopektin



Hydroxyethylstärke

Abb.I- 2: Wirkung der Substitution auf das Verhalten von Stärke (stark vereinfacht): das Molekül wird „aufgebläht“ [aus 38].

- Verlangsamter Abbau durch Glykosidasen im Blutplasma, da durch körpereigene Glykosidasen (insb. Amylase) sowohl Amylose als auch Amylopektin rasch zu Oligosacchariden, Maltose, Glukose und Isomaltose abgebaut werden können.

Die Begriffe „Substitution“ und „Substitutionsgrad“ werden noch immer vielfach ungenau verwendet, sie wurden jedoch bereits von Banks et al. 1973 [39] genauer definiert. Die molare Substitution (MS) ist definiert als das Verhältnis der Anzahl Hydroxyethylgruppen pro Anhydroglucoseeinheit (= ein „Glucosemolekül“). Der Substitutionsgrad (DS) beschreibt das Verhältnis der Anzahl substituerter Anhydroglucoseeinheiten zur Gesamtzahl der verfügbaren Anhydroglucoseeinheiten. Sie werden als dimensionslose Zahl angegeben.

I.2.2 Molmassenverteilung der HES

Im Gegensatz zu Albumin ist Hydroxyethylstärke wie andere künstliche Kolloide keine einheitliche Substanz mit einheitlichem Molekulargewicht. Stattdessen liegt immer ein polydisperses Gemisch unterschiedlich großer Moleküle vor; das Gemisch hat also eine Molmassenverteilung [40]. Durch unterschiedliche Herstellungs- und Reinigungsverfahren können die Breite und die Lage des Maximum

der Molmassenverteilung beeinflusst werden [41]. Folglich ergibt sich die Notwendigkeit der exakten Aufklärung der jeweils vorliegenden Molmassenverteilung, um eine gleichbleibende Qualität der Präparate absichern zu können.

Mit der Verwendung von HES als Volumenersatzmittel stieg das Interesse an der Aufklärung der makromolekularen Struktur, einer genauen Bestimmung der Molmassenverteilungen der unterschiedlichen Präparate sowie deren Veränderung während und nach Infusion. Zur sinnvollen Charakterisierung der Hydrokolloide werden verschiedene statistische Mittelwerte der Molmasse (M_w und M_n), der Polydispersitätsquotient M_w/M_n und die Molmasse im Peakmaximum M_p angegeben. Am genauesten wäre die Angabe der gesamten Molmassenverteilung im Kurvendiagramm. In Abb.I- 3 ist die Lage der Polymerkenndaten der Verteilungsfunktion im Kurvendiagramm verdeutlicht.

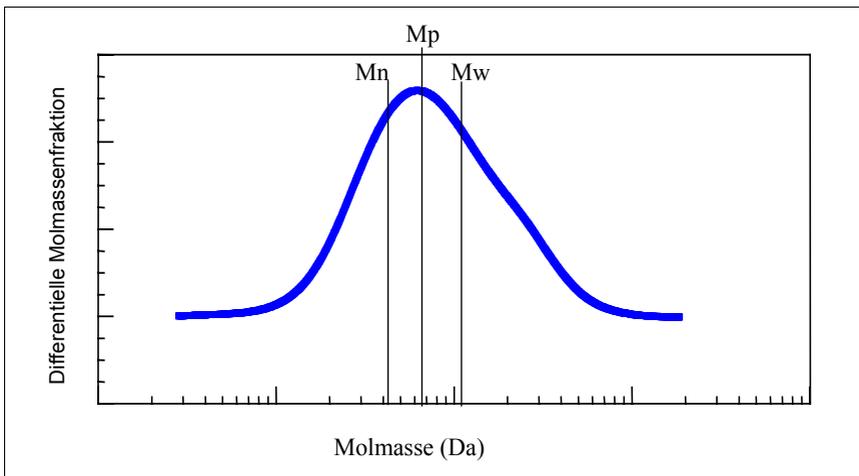


Abb.I- 3: Halblogarithmische Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung mit Angabe der zur Beschreibung der Verteilung verwendeten Molmassenmittelwerte: Zahlenmittel M_n , Molmasse im Peakmaximum M_p und Gewichtsmittelwert M_w .

1.2.2.1 Gewichtsmittelwert der Molmassen (M_w)

Der Gewichtsmittelwert der Molmassen wird häufig auch vereinfachend als „Molmassenmittelwert“ beschrieben. Der Gewichtsmittelwert M_w der Molmassenverteilung wird über die Lichtstreuung erfasst. Bei der Berechnung des M_w werden die

einzelnen Fraktionen an der Bildung der Gesamtmasse nicht im Verhältnis der vorliegenden Teilchenzahlen aufsummiert werden, sondern entsprechend dem Massenanteil ihrer Fraktion. Die Masse der einzelnen Teilchen fließt bei der Berechnung des M_w stärker ein als bei der Berechnung des M_n .

1.2.2.2 Zahlenmittelwert der Molmasse (M_n)

M_n ist der Zahlenmittelwert der Molmassenverteilung und kann über Osmometrie direkt bestimmt werden. Bei der Mittelwertbildung wird die unterschiedliche Anzahl der einzelnen Teilchen im Polymergemisch berücksichtigt. Mathematisch ermittelt wird M_n , indem zunächst formal das Polymergemisch in molekulareinheitliche Fraktionen aufgeteilt wird. Die partiellen Massenanteile werden summiert und durch die Summe aller Teilchen dividiert [42]. Hier spielt die Anzahl der Teilchen eine größere Rolle, während bei M_w der Massenanteil bestimmend ist. Daher ist M_n auch stets kleiner, maximal gleich M_w . Mit Hilfe beider Werte lässt sich eine Aussage über die Verteilungsbreite der Molmassenverteilung abschätzen.

1.2.2.3 Polydispersität

Der Polydispersitätsquotient M_w/M_n ist ein Maß für die Breite der Verteilung. Für eine monodisperse Probe gilt $M_w/M_n = 1$. Je weiter das Verhältnis von 1 entfernt ist, desto breiter sind die Molekulargewichte verteilt. Eine breit verteilte HES enthält bei gleichem M_w wesentlich mehr hochmolekulare und niedermolekulare Anteile als eine eng verteilte HES.

1.2.2.4 Molmasse im Peakmaximum (M_p)

Die Molmasse im Peakmaximum M_p entspricht der Molmasse mit dem größten Massenanteil und wird in einem Kurvendiagramm mit Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung (s. Abb.I- 3) durch das Peakmaximum repräsentiert. In einer Molmassenverteilung liegen die Teilchen mit dieser Molmasse in der größten Konzentration vor.

1.3 Einsatz von HES bei Tieren

In der Therapie von Haus- und Heimtieren hat Hydroxyethylstärke als Volumenersatz noch keine mit der Humanmedizin vergleichbare Bedeutung gefunden, obwohl anhand zahlreicher, im Folgenden aufgeführter Tierexperimente die Wirksamkeit und Verträglichkeit von HES nachgewiesen worden ist.

Nach Einmalinfusion von HES 6% bei Nagern stellten Roberts und Pagonés [43] höhere Serumkonzentrationen als nach Infusion von 6%igem Dextran fest. Auch eine im Vergleich zu Dextran verlangsamte Serumelimination von HES wurde dabei beschrieben, allerdings wurden beide Präparate nicht näher spezifiziert. 1966 wurden von Vineyard et al. fünf verschiedene Präparate, Ringer-Lactat, Dextran, niedermolekulares Dextran, homologes Plasma und nicht genauer spezifizierte HES, auf ihre Effektivität bei der Behandlung eines experimentellen hämorrhagischen Schocks an Hunden untersucht. Hinsichtlich des Volumeneffektes und der Überlebensrate zeigte sich HES hierbei den anderen Prüflösungen überlegen [44].

Von Maurer und Bernadelli [45] wurde 1968 das Fehlen immunogener Effekte von HES im Gegensatz zu Dextran erstmals bei Meerschweinchen, Kaninchen und beim Menschen nachgewiesen.

Während einer Studie, in deren Verlauf hochmolekulares Dextran 60 und hochsubstituierte HES 450/0,7 zur Hämodilution im Entblutungsschock bei der Ratte verwendet wurde fanden sich gleichwertige Ergebnisse im Hinblick auf die Normalisierung der Blutwerte und auf die Überlebensrate [46].

Von Heidenreich et al. [21] wurden HES und Dextran 60 zur Wiederherstellung der Nierenfunktion am Modell des akuten hämorrhagischen Schocks beim Hund verwendet. Die Wirkungen beider Lösungen waren dabei als nahezu gleichwertig einzustufen. Nähere Angaben zur Spezifikation der HES fehlen, es handelte sich aber wahrscheinlich um ein höhersubstituiertes Präparat. Ebenfalls am akuten Schockmodell beim Hund wurde von Hartung et al. [47] nach Verabreichung einer mittelsubstituierten HES 40/0,5 eine Volumenwirksamkeit der verwendeten HES über drei bis vier Stunden gemessen. In weiteren Untersuchungen im Schockmodell konnte

bei Hunden erst bei Zufuhr der mehr als vierfachen Menge kristalloider Lösungen (Ringer-Lactat und hyperonkotische Kochsalzlösung 1,3%) ein zu 6%iger hochsubstituierter HES 450/0,7 vergleichbarer Volumeneffekt erzielt werden [48].

Von Brückner und Messmer [49] wurden splenektomierte Beagle-Hunde mit 6%igem Dextran 70 und alternativ mit 6%iger hochsubstituierter HES 200/0,6 isovolämisch bis zu einem Hämatokrit von 20% diluiert. Bei Anwendung beider Kolloide blieb eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes erhalten. Bosman et al. [50] infundierten Hunden in einem hypovolämischen Schockmodell alternativ Eigenblut, 6%ige HES (Mw 200 kDa) und stromafreies bovines Hämoglobin (11 g/100 mL). Im Vergleich zu Eigenblut konnte auch mit HES bei Verabreichung der gleichen Menge, trotz einer Blutverdünnung, die Sauerstoffversorgung durch eine Steigerung des Herzminutenvolumens aufrecht erhalten werden. Von Friedman et al. [51] wurde bei Hunden weniger als die Hälfte der Flüssigkeitsmenge 6%iger HES im Vergleich mit Ringer-Lactat zum Erreichen desselben Blutdruckes im Schockversuch benötigt. Dabei wurde mit HES auch eine bessere Sauerstoffversorgung erreicht.

Die Verträglichkeit von mittelsubstituierter HES 200/0,5 beim Pferd wurde als sehr gut beschrieben. Beim Gebrauch von Plasmaexpandern auf Gelatine- oder Dextranbasis sind beim Pferd hingegen vereinzelt Unverträglichkeitsreaktionen beschrieben worden [52]. In einer von Hermann et al. [53] beschriebenen Studie wurde bei Pferden mit Schocksymptomen HES verabreicht, wobei ein signifikanter Abfall des Hämatokrit erreicht wurde. Bei zwei zusätzlich untersuchten Pferden bewirkte HES im Vergleich mit Ringer-Lactat einen stärkeren Hämatokritabfall. Von Meister et al. [54] wurden aufgrund eines klinischen Bedarfs von Volumenersatzmitteln an Pferden klinische Studien zur Eliminationskinetik von HES-Präparaten durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie wurde bei Warmblutpferden eine Eliminationshalbwertszeit für eine 10%ige HES 200/0,5 in der sogenannten α -Phase von 5,6 Stunden ermittelt [54]. Dies entspricht der Elimination von HES beim Menschen.

Von Jones et al. [55] wurde beschrieben, welcher Hämodilutionseffekt nach Infusion von hochsubstituierter HES 450/0,7 (10 und 20 mL/kg) im Vergleich mit Kochsalzlösung (80 mL/kg) in jeweils zwei Stunden bei klinisch gesunden Ponies

erreicht wurde. Im Gegensatz zu den mit Kochsalzlösung behandelten Tieren konnte in den HES-Gruppen ein deutlicher Anstieg des kolloidosmotischen Druckes gemessen werden. Durch das Hydrokolloid HES als Ersatz für Elektrolytlösungen war eine vergleichbare Hämodilution in kürzerer Zeit und mit geringeren Infusionsvolumina erreichbar. Positiv hervorgehoben wurde das durch die kolloidosmotische Wirkung verringerte Risiko der Ausbildung interstitieller Ödeme im Vergleich zu Elektrolytlösungen. In einer weiteren Studie von Jones et al. [56] konnte bei Pferden mit Hypoproteinämie ein Anstieg des kolloidosmotischen Druckes im Blut nach Infusion von 8-12 mL/kg 6%iger hochsubstituierter HES für 24 h erreicht werden.

HES-Lösungen sind zur Volumentherapie in Deutschland bei Tieren grundsätzlich nicht zugelassen. Im Rahmen des Dispensierrechtes kann ein Tierarzt allerdings die aus der Humanmedizin verfügbaren HES-Präparate im Falle eines Therapienotstandes bei Tieren anwenden. Der Wirkstoff Hydroxyethylstärke ist noch nicht in die Anhänge I-III der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates aufgenommen worden; HES darf daher nicht bei Lebensmittel liefernden Tieren angewendet werden. Eine Aufnahme in den Annex II wird jedoch als unproblematisch angesehen, da bei HES nicht mit bedenklichen Rückständen zu rechnen ist [57]. Die Ursache der zurückhaltenden Anwendung von HES bei Tieren liegt wahrscheinlich in dem im Vergleich mit Dextran und Gelatine relativ hohen Preis.

Als Indikation für eine Verabreichung synthetischer Kolloide an Tieren gelten hypovolämische Schockerscheinungen (intravasaler Volumenmangel) mit mikrozirkulatorischer Insuffizienz wie Blutviskositätssteigerung, Erythrozyten- und Thrombozytenaggregation (Thrombosegefahr), ischämische Gewebshypoxie u.a. [58]. Eine weitere Indikation wäre die Hufrehe des Pferdes, bei welcher ebenfalls häufig eine Hämodilutionstherapie vorgenommen wird. Ein klinischer Einsatz von HES unter Nutzung der guten Eigenschaften zur Hämodilution wäre somit denkbar.

Von Smiley [59] wurde auf einen möglicherweise starken Anstieg des Plasmavolumens speziell bei Verwendung von hochsubstituierten HES-Präparaten hingewiesen, weshalb bei Vorliegen von Herzinsuffizienz und von Niereninsuffizienz in Verbindung mit Oligurie diese Präparate auch bei Tieren contraindiziert sein sollen.

Von Hermann et al. wurde für Pferde eine Dosierung bis 10 mL/kg Körpergewicht und Stunde bei Verwendung einer 10%igen HES 200/0,5 empfohlen [53]. Alef empfiehlt für Kleintiere eine Dosis von 10 bis maximal 20 mL/kg Körpermasse und Tag bei Verwendung 6%iger HES [18]. Die Dosierung der HES sollte 1,5 g HES/kg/d nicht übersteigen [58]. Eine Differenzierung der Indikationen für HES nach Spezifikation der HES (Molmasse oder Substitution) wurde in der Veterinärmedizin bislang nicht untersucht.

1.4 Pharmakokinetik und Metabolismus der HES

Bei Probandenuntersuchungen am Menschen wurde frühzeitig festgestellt, dass die Elimination von Hydroxyethylstärke im Gegensatz zur Elimination von Dextran ein komplexer Vorgang ist und nicht mit einer Kinetik 1. Ordnung erfolgt [60, 61].

Von Asskali [62] wurde beschrieben, dass die primär nierengängigen niedermolekularen Anteile einer polydispersen kolloidalen Substanz schon während der Infusion renal ausgeschieden werden, so dass von einer echten Verteilungsphase nicht gesprochen werden kann. Die Nierenschwelle liegt nach Untersuchungen bei gesunden Probanden für eine molare Substitution von 0,5 im Molgewichtsbereich von 30.000 bis 40.000 Da [63, 64]. Die rasche renale Elimination der niedermolekularen HES-Fractionen beeinflusst lediglich die Dauer der Verteilungsphase (α -Phase).

In dem anschließenden, als β -Phase bezeichneten Zeitraum ist die Elimination von HES im Vergleich zur Ausscheidung in der α -Phase verlangsamt. Bereits frühzeitig festgestellt und immer wieder bestätigt wurde, dass nach Infusion von hochsubstituierter HES eine charakteristische persistierende Fraktion vorhanden ist. Diese ist nach 10 Tagen und darüber hinaus noch nachweisbar [61, 62, 65, 66, 67]. Nach Mehrfachinfusion wird bei HES im Gegensatz zu Dextran eine Kumulation beschrieben. Die Kumulation ist bei hochsubstituierter HES signifikant stärker ausgeprägt als bei mittelsubstituierter HES [68].

Die Verweildauer von HES im Plasmaverteilungsraum ist im Vergleich zu nativer Stärke verlängert. Der enzymatische Abbau der HES wird mit steigender

molarer Substitution (MS) vermindert [69]. Die molare Substitution ist von erheblichem Einfluss auf die Pharmakokinetik von HES. Sowohl die Wirkdauer, die maximale Serumkonzentration als auch die Veränderungen der Molmassenverteilung im Serum werden primär von der MS beeinflusst [70, 71]. Auch bei Ratten ist die Eliminationshalbwertszeit und damit die Wirkdauer der HES-Präparate vorrangig von der MS der verwendeten HES abhängig [72]. Die Substituenten bilden dabei Störstellen, wobei vor allem eine Substitution am C2-Atom, weniger jedoch die Substitution am C6-Atom und am C4-Atom den Abbau der HES durch α -Amylase hemmen soll [73].

Von Köhler, Kirch, Weihrauch et al. [74] wurde an 54 Patienten erstmals das Verhalten von Serumamylase nach Infusion von hochsubstituierter 6%iger HES (450/0,7) untersucht. Dabei stieg die Aktivität der α -Amylase nach Infusion von HES auf ungefähr das Doppelte des basalen Ausgangswertes an. Veränderungen der Serumlipase sowie der α -Amylase und Lipase im Duodenalsekret konnten aber nicht beobachtet werden. Die Autoren konnten eine Erkrankung des Pankreas oder des oberen Gastrointestinaltraktes differentialdiagnostisch ausschließen.

Von Köhler, Kirch und Horstmann [75] wurde ferner die Molekulargewichtsverteilung von Serumamylase vor und nach Infusion hochmolekularer, hochsubstituierter HES (450/0,7) untersucht. Bei der Gelfiltration des Serums nach Infusion von HES wurde im höhermolekularen Bereich eine erhöhte Amylase-Aktivität gemessen. Dieser hochmolekulare Hydroxyethylstärke-Amylase-Komplex (als Makroamylase bezeichnet) wurde nur verzögert eliminiert und führte zum parallelen Anstieg der α -Amylase im Serum.

Es wurde angenommen, dass die im Serum vorhandene makromolekulare HES durch die Amylase des Serum in kleinere Bruchstücke aufgespalten wird. Mit dieser Vermehrung der onkotisch wirksamen niedermolekularen HES wurde ein sog. „Volumenzweiteffekt“ begründet [74]. Der unter Berücksichtigung einer Wirkung der Serumamylase im Prinzip plausible „Volumenzweiteffekt“ konnte jedoch in keiner späteren Untersuchungsserie an freiwilligen Versuchspersonen unter Verwendung sehr unterschiedlicher HES-Präparate reproduziert werden [76].

Förster [76] nahm an, dass die Amylasegesamtaktivität im vaskulären Raum beim Menschen nicht ausreicht, um wirksam zum Abbau der HES beizutragen. Bei Mehrfachapplikation von HES steigt die Amylaseaktivität an, während die Eliminationshalbwertszeit von HES von Tag zu Tag länger wird [77]. Schweine, Hunde und Ratten weisen Serumamylaseaktivitäten auf, die teilweise um ein Vielfaches höher liegen als beim Menschen (s. Tab.I- 1). Die Eliminationshalbwertszeiten für HES-Präparate unterscheiden sich aber in weit geringerem Maße [77].

Tab.I- 1: Amylaseaktivität (U/L) vor und nach Infusion von HES 200/0,5 am Menschen und an Versuchstieren [aus 77].

	Amylase (U/L) vor HES-Inf.	Amylase (U/L) nach HES-Inf.	Amylase (U/L) 5 h nach HES-Inf.
Mensch	55 ± 23	54 ± 22	112 ± 43
Pferd **	45,4 ± 5,7	33,2 ± 6,1	39,8 ± 12 *
Hund	855 ± 153	840 ± 145	2048 ± 240
Schwein	2467 ± 500	2408 ± 485	3960 ± 750
Ratte	2215 ± 300	2728 ± 503	4759 ± 721
			* 240 min nach HES-Inf.
			** Literaturdaten aus [54]

Nach neueren Erkenntnissen aus Tierexperimenten mit amy-lasevorgespaltenere HES hat die Aktivität der Serumamylase tatsächlich eine geringere Bedeutung für die Elimination von HES aus dem Serum als bisher angenommen [78]. Vielmehr scheint die intrazelluläre Spaltung von HES nach Phagozytose eine größere Bedeutung zu haben als die intravasale Spaltung [76].

Bereits Thompson et al. (1970) war aufgefallen, dass nur ein Bruchteil der intravenös applizierten HES im Harn wieder gefunden werden konnte [65]. Von Metcalf et al. [79] wurde festgestellt, dass HES nach Infusion nicht vollständig im Urin ausgeschieden wird, sondern dass eine nicht erfasste Differenz zwischen infundierter Menge und der noch im Serum befindlichen sowie der im Urin ausgeschiedenen HES im Körper verbleibt. Nur bei Messungen der ¹⁴C-Aktivität von Ryan et al. [80] wurden nach intraperitonealer Applikation von ¹⁴C-HES nahezu 100% der Radioaktivität im Urin innerhalb 24 h gefunden.

Lediglich von Halmágyi (1984) wurden nach Infusion von HES 40/0,5 zu jedem Zeitpunkt 100% der applizierten Menge in Serum und Urin erfasst [81]. Dies konnte in keiner weiteren Studie reproduziert werden. In klinischen Studien konnte festgestellt werden, dass lediglich 30-60% der intravenös applizierten HES im Harn wieder gefunden werden können [38]. Dies veranlasste Förster, ein Erfassungsdefizit anzunehmen, das abhängig von der Substitution reproduzierbar 40% bis 70% der applizierten HES ausmacht. In Untersuchungen an Probanden und in Tierversuchen konnte das Erfassungsdefizit für jeden HES-Typ nachgewiesen werden [38].

Diese nicht erfassten Anteile der HES können zum Teil durch nicht fällbare niedermolekulare Fraktionen im Harn bedingt sein oder durch unvollständiges Harnsammeln. Die intestinale Elimination von HES spielt mit weniger als 1% der Infusionsmenge nur eine untergeordnete Rolle [82]. Das Erfassungsdefizit von 40-70% wird vor allem damit erklärt, dass der Rest zunächst in Zellen vorwiegend des retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen wird, um dort gespeichert zu werden [76].

Die Aufnahme sowohl in zirkulierende als auch in organständige Zellen des RES spielt eine gewichtige Rolle bei der Elimination von kolloidalen Volumenersatzmitteln aus dem Plasmaverteilungsraum. Bei Untersuchungen im Gewebe von Ratten nach Infusion von hochsubstituierter, hochmolekularer ¹⁴C-markierter HES konnte v.a. in Milz und Leber noch nach 70 Tagen und in den Nieren Radioaktivität nachgewiesen werden [65]. In der Niere wird HES mutmaßlich durch Rückresorption der glomerulär ausgeschiedenen HES erfasst [83]. In weiteren Tierexperimenten wurden entsprechend Speicherungsphänomene mit Vakuolen in der Milz, der Leber und in der Lunge beobachtet [84], und dort vor allem in Zellen des RES [85, 66].

Von Wikarczyk wurde 1981 erstmals ein differenzierter chemischer Nachweis der in den Organen von Ratten gespeicherten HES erbracht, wobei v.a. in der Leber und der Milz HES langfristig gespeichert wurde [86]. In einer Studie von Pfeifer et al. wurde nach Mehrfachinfusion einer mittelsubstituierten HES 40/0,5 bei Dialysepatienten mit zunehmendem Aszites eine Leberkeilexcision entnommen [87]. In dieser Probe wurden bei Patienten erstmals nicht nur mikroskopisch erkennbare Vakuolen beschrieben, sondern die gespeicherte HES auch chemisch nach einer modifizierten

Methode zur Glycogenbestimmung [61] nachgewiesen. In der Lunge verstorbener Intensivpatienten wurden bei quantitativen Untersuchungen mit dieser Methode ebenfalls nicht unerhebliche Konzentrationen an HES festgestellt [88].

Nach Infusion von mit Fluorescein markierter HES konnten bei Ratten deutliche Fluoreszenzintensitäten in den Makrophagen der Milz sowie in den Kupfferschen Sternzellen der Leber nachgewiesen werden. Eine hohe Fluoreszenzintensität und damit HES-Anhäufung wurde auch in Monozyten gemessen [89].

In einem neueren Vergleich der Speicherung von HES 200/0,5 mit HES 130/0,4 wurde wieder radioaktiv markierte ¹⁴C-HES eingesetzt. Dabei wurde täglich über 18 Tage 0,7 g/kg HES verabreicht. Noch 52 Tage nach Infusion konnte Radioaktivität in Milz und Leber gefunden werden [90]. Von Lipfert et al. (1999) wurde nach Infusion von HES bei Hunden PAS-positive Areale, wahrscheinlich gespeicherte HES, in den Leberzellen gesehen [91].

Die Gewebespeicherung von HES ist dosisabhängig; erst nach längerer Zeit erfolgt eine vollständige Elimination der gespeicherten HES [86, 92]. Bei Versuchen zur Organspeicherung von HES 100/0,5, HES 200/0,5 bzw. HES 450/0,3 nach Peritonealdialyse konnte festgestellt werden, dass zwar von HES 200/0,5 mehr gespeichert wird als von HES 100/0,5, allerdings wurde nach Dialyse mit HES 450/0,3 die geringste Speicherung bestimmt [93]. Die Speicherung von HES im RES ist vorwiegend abhängig von der Substitution, hochsubstituierte HES kann offensichtlich schlechter abgebaut werden und wird entsprechend vermehrt gespeichert [94]. Welche HES-Fractionen vorwiegend gespeichert werden ist noch nicht abschließend geklärt.

In der lysosomalen Spaltung durch Hydrolasen mit saurem Wirkoptimum (saure Maltasen und saure Isomaltasen – als Dextranasen bekannt) nach der Aufnahme von HES in Zellen des RES wurde ein bedeutender Abbauweg vermutet, wonach die niedermolekularen Bestandteile entweder metabolisiert (z.B. Glucose) oder renal eliminiert (als Hydroxyethylglucosen oder Hydroxyethyloligosaccharide) werden [76]. Neben der renalen Ausscheidung niedermolekularer und damit nierengängiger HES-Anteile wäre als wichtigerer Mechanismus für die Elimination folglich der intrazelluläre Abbau von HES in Makrophagen anzusehen.

Während die Speicherung von HES als gesichert gilt, lässt sich die von verschiedenen Autoren [95, 96, 97] diskutierte Beeinträchtigung des RES jedoch nicht eindeutig experimentell absichern.

Von Lenz et al. (1986) wurde in einer Probandenstudie eine Steigerung der Phagozytoserate nach Infusion von hochsubstituierter HES 450/0,7 dokumentiert [98]. Bei weiteren Studien mit humanen Leukozyten konnten keine Hinweise auf eine Blockade des RES nachgewiesen werden [99, 100, 101 102, 103].

Bei verschiedenen Untersuchungen an Mäusen konnte hingegen eine Beeinflussung der RES- Aktivität festgestellt werden [95, 104, 105]. Von Jarecki-Black et al. (1986) konnte eine protektive Wirkung von wiederholt appliziertem HES gegenüber Infektionen mit *Leishmania donovani* bei Mäusen aufgezeigt werden. Die normalerweise die Parasiten aufnehmenden phagozytierenden Zellen wurden weniger stark befallen [106].

Bei Ratten wiederum konnten keine Änderungen der Phagozytoseaktivität oder negativen Beeinflussungen der Abwehrfunktion bestimmt werden [85, 96, 107]. Bei Versuchen mit Kaninchen konnte sogar eine Verminderung der Schädigungen durch Infusion von HES 450/0,7 im Gegensatz zu Infusionen mit Albumin oder Ringer-Lactat bei einem nach der Reperfusion einer hepato-enteralen Ischämie auftretenden Multiorganversagen festgestellt werden [108].

Bei einer Beobachtung an Patienten mit Niereninsuffizienz wurde nach Infusion von HES 40/0,5 eine massive Leberschwellung mit mechanischer Beeinträchtigung des Gallenabflusses beobachtet, welche nach Absetzen von HES langfristig reversibel war [87]. Bei zwei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen und portalem Hochdruck wurden 720 g bzw. 730 g mittelsubstituierte HES 200/0,5 im Laufe von zwei Jahren infundiert. Danach war in Leberbiopsaten eine starke Vakuolisierung mit positiver PAS-Reaktion, sehr wahrscheinlich HES-Speichervakuolen, zu erkennen. Die Vakuolen waren von einer Membran umgeben. Die Leber war in der pathologischen Untersuchung zwar nicht vergrößert, jedoch verhärtet, und eine Splenomegalie sowie ein Aszites lagen vor [109].

Von Ginz et al. wurde 1998 ein weiterer Fall von Speicherung von HES beschrieben. Bei einem Patienten wurden nach der operativen Behandlung einer chronisch sklerosierenden Pankreatitis zur Volumentherapie kolloidale Lösungen verabreicht. Bei anfänglicher Anwendung größerer Mengen Dextran trat nach 14 Tagen Nierenversagen ein. Während der im weiteren Verlauf erforderlichen Dialyse wurde zur Kreislaufstabilisierung hochmolekulare HES verabreicht (0,32 g/kg/d, insgesamt 420 g). Mit Dialysebeginn entstand bei dem Patienten eine Cholestase ungeklärter Genese. Im weiteren Verlauf entwickelte sich eine Leberinsuffizienz, schließlich zeigte der Patient das Vollbild einer Sepsis. Am 32. postoperativen Tag verstarb der Patient im Multiorganversagen. Nach Obduktion des Patienten wurde eine massive Vakuolisierung in den retikuloendothelialen Zellen der Leber, der Milz sowie in den Tubulusepithelien der Nieren festgestellt. Sehr wahrscheinlich sind diese PAS-positiven Vakuolen Ausdruck von Speicherung der kolloidalen Volumenersatzmittel, weshalb eine Überladung des RES vermutet wurde. Möglicherweise haben diese großvolumigen Kolloideinlagerungen das Krankheitsbild aggraviert [97].

In einer Studie von Christidis et al. wurde ebenfalls ein möglicher Zusammenhang der Verabreichung von HES und der Verschlechterung des Zustandes mehrerer Patienten beschrieben. Neun Patienten – sechs davon hatten bereits eine chronische Lebererkrankung – erhielten wiederholte Infusionen hochsubstituierter HES 200/0,6 (insgesamt 690 bis 5220 g in Ø 13,9 Monaten). Im Schnitt 9,3 Monate nach Verabreichung der ersten HES-Dosis trat eine Verschlechterung bei den Patienten ein, wobei zumeist eine Aszites beobachtet wurde. Sechs Patienten verstarben innerhalb des nächsten Monats infolge Sepsis oder Leberversagens, die weiteren Patienten starben innerhalb der folgenden 2 Jahre. Alle Patienten wiesen nach Infusion von HES eine diffuse Vakuolisierung in der Leber auf [110].

Ein negativer Einfluss von infundierter HES auf den Krankheitsverlauf der beschriebenen Fälle bis hin zum tödlichen Ausgang kann nicht ausgeschlossen werden. Die Zusammenhänge von intravasalem Abbau und intrazellulärer Speicherung von HES sowie die Vorgänge im Laufe der temporären Speicherung wären daher noch zu klären.

1.5 Fragestellung

Nach den bisherigen Erkenntnissen zur Speicherung der Hydroxyethylstärke in Organen stellten sich folgende Fragen:

Kann die Hypothese, dass HES durch lysosomale Enzyme abgebaut wird, untermauert werden und

ist es möglich, die Sicherheit des kolloidalen Volumenersatzmittels HES für die Anwendung am Patienten durch gezielte Verwendung bestimmter HES -Fraktionen zu verbessern?

Um diese Frage zu beantworten wurden drei handelsübliche HES-Infusionslösungen untersucht, welche sich aufgrund der molaren Substitution der HES im pharmakokinetischen Verhalten deutlich unterscheiden und verschiedene Molmassenverteilungen (Mw) aufwiesen. In einer Infusionsstudie wurde am Rattenmodell die Organspeicherung von HES mit Versuch der Klassifizierung der gespeicherten HES weitergehend untersucht. Hierzu wurde mit Hilfe von polymeranalytischen Untersuchungsmethoden erstmalig eine Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der gespeicherten HES im Organ vorgenommen. Eine längerfristige Speicherung war dabei v.a. in den Organen Milz und Leber zu erwarten.

Ziel der Untersuchung war es,

- herauszufinden, welche HES-Polymerfraktionen in Abhängigkeit der molaren Substitution und der Molmassenverteilung der Ausgangssubstanz vorwiegend gespeichert werden, und
- weiterhin sollte geklärt werden, ob eine zeitabhängige Änderung der Molmassenverteilung der gespeicherten HES eintritt.

Diese grundlegenden polymeranalytischen Untersuchungen zur Charakterisierung der in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infusion in den verschiedenen Organen gespeicherten HES könnten Hinweise auf den intrazellulären Abbau von HES geben.

II Material und Methoden

II.1 Infusionslösungen

Die zu prüfenden Lösungen der Versuche enthielten handelsübliche Hydroxyethylstärke in Form von sechsprozentigen Lösungen in isotonischer Natriumchloridlösung. Zum Einsatz kamen Haes-steril[®], Plasmasteril[®] und Voluven[®] (alle Fresenius Kabi, Bad Homburg). Haes-steril[®] ist als HES 200/0,5 deklariert, Plasmasteril[®] als HES 450/0,7 und Voluven[®] als HES 130/0,4. Bei dem mittelmolekularen, mittelsubstituierten Haes-steril[®] wurden Lösungen der Charge KH 3913, bei dem hochmolekularen, hochsubstituierten Plasmasteril[®] der Charge HE 1503 und bei dem niedermolekularen, niedrigsubstituierten Voluven[®] der Charge KI 3242 verwendet.

II.2 Tierversuche

II.2.1 Tierspezies und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten (HsdCpb:WU), gezüchtet bei Harlan Winkelmann GmbH (Borchen), verwendet. Dort erfolgt alle 3 Monate eine Gesundheitskontrolle gemäß den Richtlinien der Föderation der Europäischen Gesellschaften für Versuchstierkunde FELASA. Weitere Gesundheitskontrollen nach der Lieferung waren nicht erfolgt. Die Haltungsbedingungen entsprachen mit 20-24°C Temperatur, 55-65% Luftfeuchtigkeit bei Haltung in Makrolon Käfigen (max. 5 Tiere in 550x330x200 mm Käfigen der Firma Erich Becker und Co, Castrop-Rauxel) dem Europäischen Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. Der Tierstall wurde mit einem zirkadianen Lichtrhythmus hell/dunkel 10/14 (7:00 h - 17:00 h) unter Neonlampen beleuchtet. Die Versuchstiere erhielten ausschließlich Wasser und eine Standard Haltungsdiät für Ratten (Diätnummer 1324, Altromin, Broogarden, Dänemark; Zusammensetzung siehe Anhang) ad libitum.

II.2.2 Katheterinsertion

Zu Beginn erfolgte eine allgemeine Untersuchung und die Tiere wurden gewogen. Eine langfristige Markierung der Versuchstiere erfolgte während der Narkose durch Ohrmarken. Die Tiere wurden durch intramuskuläre Gabe von 10 mg Ketamin (Ketavet 100[®], Pharmacia GmbH, Nürnberg) pro 100 g Körpergewicht, 1 mg Xylazin (Rompun[®], Bayer HealthCare, Leverkusen) pro 100 g Körpergewicht und 0,3 mg pro 100 g Körpergewicht Midazolam (Dormicum[®], Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) anästhesiert (entspricht 0,5-0,6 mL pro Ratte). Die adäquate Narkosetiefe wurde bei diesem Vorgehen nach 5 bis 10 Minuten erreicht.

Die ventrale Halsseite wurde rasiert und die Haut zwischen Unterkieferwinkel und Brustbein ca. 1 cm lang inzidiert. Nach stumpfem Freipräparieren der Vena jugularis wurde diese distal ligiert (Supramid 2 metric, Heiland, Hamburg) und phlebotomiert. Ein zuvor heparinisierter, flüssigkeitsgefüllter PVC-Kapillarschlauch (Rheomed GmbH, Heppenheim; Innendurchmesser 0,8 mm, Außendurchmesser 1 mm) wurde in die Öffnung inseriert und vorgeschoben, bis er in der Vena cava cranialis lag. Mit einer zweiten Ligatur wurde der Kapillarschlauch an der Vene fixiert.

II.2.3 Infusion

II.2.3.1 Verfahren während der Infusion

Unmittelbar nach Katheterinsertion erfolgte die Infusion der zu prüfenden Lösungen. Die Hydroxyethylstärke-Lösungen wurden mit Hilfe von 50 mL-Perfusorspritzen, welche direkt mit den Kapillarschläuchen verbunden waren, verabreicht. Perfusor[®] IV und V (alle B.Braun-Melsungen AG, Melsungen) wurden verwendet und 18 mL/3 h, entsprechend 1,08 g HES wurden infundiert.

Während der Infusion wurden die Tiere in ein Babytherm (Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck) gelegt, um eine Auskühlung zu vermeiden. Mit Infusion wurde 0,5 mg Midazolam (Dormicum[®] 15 mg/3 mL Infusionslösung, Hoffmann-La

Roche AG, Grenzach-Wyhlen) pro 100 g Körpergewicht und Stunde zur Aufrechterhaltung der Narkose verabreicht.

Am Infusionsende wurde der Katheter wieder entfernt und die Vena jugularis ligiert. Die Haut wurde vor Erwachen der Tiere aus der Narkose mit Klammern verschlossen. Zur postoperativen Analgesie wurden 0,05 mg/kg Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma GmbH, München) verabreicht.

II.2.3.2 Festlegung der Infusionsmengen

Die Infusionsmengen wurden wie in den bisherigen Experimenten an Ratten mit 18 mL relativ groß gewählt. Hierzu wurde bei Tieren mit ähnlichem Körpergewicht gleichbleibende Mengen an HES verabreicht. Die Dosierungen wurden zur Vergleichbarkeit mit früheren Studien und zur Vereinfachung des Verfahrens nicht auf in der Humanmedizin oder in der Veterinärmedizin gebräuchliche oder empfohlenen Dosen oder auf das Körpergewicht der Tiere abgestimmt.

II.2.4 Versuchsaufbau

Die Versuchstiere wurden aleatorisch ausgewählt und in Gruppen zu je acht Tieren infundiert. Als Infusionsmodell wurde eine hochdosierte Kurzinfusion mit Verabreichung von 18 mL 6%ige Hydroxyethylstärke pro Ratte in drei Stunden gewählt. Blutabnahmen wurden aus dem Venenkatheter oder aus dem retrobulbären Venenplexus vor Infusion sowie 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h nach Infusion vorgenommen. Bei den Blutentnahmen vor der Infusion und am Infusionsende wurden zuvor zweimal ca. 0,2 mL aus dem Katheter gezogen und verworfen, um eine Kontamination der Probe mit der noch im Katheter befindlichen Infusionslösung zu vermeiden. Nach Entnahme von 0,5 mL Blut wurde der Katheter mit isotonischer Natriumchloridlösung gespült. Zur retrobulbären Blutentnahme wurden die Tiere mit Isofluran oder Halothan betäubt.

Die Messung des Hämatokrit (HKT) und des Hämoglobingehaltes (Hb) erfolgte noch am Tag der Blutentnahme.

Um den Verlauf der Speicherung der HES in Leber und Milz beurteilen zu können, wurden die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infusion getötet. Eine Gruppe pro Lösung wurde direkt nach Infusion getötet (Tag 0). Jeweils eine weitere Gruppe wurde an Tag 1, 3, 5, 10, und 50 nach Infusion getötet. Es gab insgesamt 18 Gruppen. Die Gesamtanzahl belief sich daher auf 144 Tiere.

Am Versuchsende wurden die Tiere über die Bauchorta entblutet und die zu untersuchenden Organe (Leber und Milz) entnommen. Die dabei gewonnenen Serum- und Organproben wurden bis zur Isolierung der HES bei -20°C eingefroren.

II.3 Biochemische Nachweismethoden

II.3.1 Hämoglobinkonzentration

Die Messung des Hämoglobin wurde zur Abschätzung des Hämodilutionseffektes herangezogen. Hämoglobin ist der am O₂-Transport beteiligte rote Blutfarbstoff. Es ein Tetramer (Molmasse 68 kDa), welches in Erythrozyten vorkommt und aus zwei identischen Polypeptidkettenpaaren besteht. Jede Polypeptidkette enthält ein Häm-Molekül (Protoporphyrin-Eisen-Komplex), das ein O₂-Molekül zu binden vermag.

Zur Analyse wurde die Cyanid-Methode verwendet [111, 112]. Die Bestimmung beruht auf der quantitativen Messung des Protoporphyrin-Eisen-Komplexes. Dabei wird Hämoglobin durch Kaliumhexacyanoferrat oxidiert und anschließend mit Kaliumcyanid in Hämoglobincyanid überführt. Der gebildete Farbstoff Hämoglobincyanid wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen.

Der Normwert für Rattenblut ist 14,7-18,0 g/dL.

II.3.2 Hämatokrit

Die Messung diente ebenso wie die Hämoglobinbestimmung zur Einschätzung des Hämodilutionseffektes. Als Hämatokrit bezeichnet man den relativen Volumenanteil der roten Blutkörperchen am Gesamtblutvolumen. Die Messung erfolgte mittels Zentrifugation (Haemofuge, Fa. Heraeus, Osterode). Die Masse der Erythrozyten trennt sich von Plasma bei hochtourigem Zentrifugieren (13000 U/min). Die Volumenbestimmung wurde in heparinbeschichteten 20 µL Kapillaren vorgenommen. Die Ablesung erfolgte auf einer Schablone, die für verschieden lange Füllungszustände der Kapillaren geeicht war, so dass keine genaue Säulenhöhe in der Kapillare notwendig war.

Berechnung des Hämatokrits: $HKT = \text{Präzipitatlänge} / \text{Gesamtlänge}$

Der Normwert für Rattenblut ist 0,39-0,48.

II.4 Bestimmung der Molmassenverteilung

II.4.1 Theoretischer Hintergrund

II.4.1.1 Ausschlusschromatographie

Die Fraktionierung durch Größenausschlusschromatographie (SEC) ist die gängigste Methode zur Untersuchung von Molmassenverteilungen polymerer Substanzen. Die SEC unterscheidet sich von allen anderen Methoden der Chromatographie dadurch, dass nicht Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase die Trennung bewirken, sondern die Moleküle lediglich nach ihrer Größe getrennt werden [113].

Zur Fraktionierung wurden die Makromoleküle in einer zumeist gepufferten wässrigen Elektrolytlösung durch eine mit einem granuliertem Hydrogel – daher auch der Name Gelpermeationschromatographie (GPC) – gefüllte Säule transportiert. Die Moleküle können unterschiedlich tief in die Kapillar-Hohlräume des Gels eindringen. Kleineren Molekülen ist ein größerer Teil des inneren Volumens der porösen Füllkörper zugänglich als größeren Molekülen. Entsprechend werden kleinere Moleküle retiniert und später von der Säule eluiert als große Moleküle.

Mit der Entwicklung feinkörniger und druckstabiler Gele ist eine Kombination der GPC mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) möglich. Damit konnten die Analysenzeiten von mehreren Stunden auf Minuten verkürzt werden. Hierbei wird eine Lösung der Makromoleküle direkt in das Fließmittel eingebracht und unter hohem Druck (bis zu 200 bar) durch die Säulen gedrückt.

II.4.1.2 Molmassendetektion

Die Laser-Streulicht-Methode für die Molmassenbestimmung von Kolloiden ist eine zerstörungsfreie Methode zur Charakterisierung von Makromolekülen. Mit diesem Verfahren der statischen Lichtstreuung lassen sich Molekularmassen direkt bestimmen, indem die Intensität des gestreuten Lichts in Abhängigkeit vom Streuwinkel gemessen wird [114 , 115 , 116 , 117, 118].

In der Theorie der statischen Lichtstreuung unterscheidet man je nach Verhältnis von der Wellenlänge λ eines monochromatischen und vertikal polarisierten Primärstrahls zum Durchmesser des Teilchens d drei Fälle. Für $d < \lambda/20$ wird die Rayleigh-Streuung beschrieben. Bei $\lambda/20 < d < \lambda$ kann die Theorie der Debye-Streuung angewandt werden und bei $d > \lambda$ findet man eine Mie-Streuung vor. Für die Molmassenbestimmung von Kolloiden sind die Rayleigh- und die Debye-Streuung von Bedeutung. Bei der Rayleigh-Streuung kann das mittlere Molekulargewicht M_w ohne Kalibration aus der absoluten Streuintensität R_{θ} , welche der Differenz aus dem $R_{\theta L}$ der Kolloidlösung und dem $R_{\theta 0}$ des Lösungsmittels entspricht, erhalten werden. Dabei ist die Intensität der Streustrahlung in allen Raumrichtungen gleich. Die Rayleigh-Gleichung, eine Bestimmungsgleichung für M_w , lautet in der Reihenentwicklung nach Debye:

$$K \cdot c / R_{\theta} = 1 / M_w + 2A_2c + \dots \quad (\text{Gleichung II- 1})$$

Hierbei ist c die Konzentration des gelösten Polymers, A_2 der zweite Virialkoeffizient und K ein optischer Kontrastfaktor, der neben der Wellenlänge λ_0 des Primärlichtes, der Avogadro-Konstanten N_A und dem Brechungsindex n_0 noch das Brechungsinkrement dn/dc , also die substanzabhängige Änderung des Brechungsindex mit der Massenkonzentration c enthält [40].

$$K = 2\pi^2 \cdot n_0^2 \cdot (dn/dc)^2 / \lambda_0^4 \cdot N_A \quad (\text{Gleichung II- 2})$$

Die Molmasse lässt sich hierbei durch Auftragung von $K \cdot c / R_{\theta}$ gegen c ermitteln. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Ordinate ($c = 0$) liegt bei $1 / M_w$. Aus der Funktion ist auch der 2. Virialkoeffizient zu erhalten, die Steigung der Geraden entspricht $2A_2$.

Bei Kolloidteilchen, deren Durchmesser größer als $\lambda/20$ des Primärstrahles sind kommt es zu intramolekularen Interferenzen. Damit ist die Streustrahlung nicht mehr kugelsymmetrisch, sondern es wird eine winkelabhängige Streuintensität gemessen. Das Streulicht wird mit wachsendem Beobachtungswinkel geschwächt [119, 120]. Die

Rayleigh-Gleichung wird daher durch die Partikelstreuungsfunktion P_θ dividiert, die Winkelabhängigkeit des Streulichts berücksichtigt. Es gilt:

$$P_\theta = R_\theta / R_0 \quad (\text{Gleichung II- 3})$$

R_θ und R_0 sind die Exzeß-Rayleigh-Faktoren der Beobachtungswinkel θ und 0° .

Unter Berücksichtigung von P_θ wird folgende Auswertgleichung [117] erhalten:

$$K \cdot c / R_\theta = 1 / P_\theta \cdot M + 2A_2 \cdot c + \dots \quad (\text{Gleichung II- 4})$$

Seit 1988 werden Mehrwinkel-Laser-Streulicht-Photometer (Multy Angle Laser Light Scattering, MALLS) als Detektoren nach der analytischen Fraktionierung von Makromolekülen durch HPLC-SEC in Kombination mit Massendetektoren (z.B. Brechungsindex-(RI)-Detektor) eingesetzt [121]. Durch eine Kombination von HPLC-SEC-Trennsäulen wird das polydisperse Gemisch in annähernd monodisperse Fraktionen getrennt und kontinuierlich streulichtphotometrisch analysiert. Parallel zum Fluss des Eluats von der Säule durch eine Glasküvette wird kontinuierlich ein monochromatischer und vertikal polarisierter Laser-Strahl durch die Küvette geleitet. Um die Küvette herum sind 3 Photodioden (Detektor 1, 2 und 3) im Winkel von $\theta = 45^\circ$, $\theta = 90^\circ$ und $\theta = 135^\circ$ angebracht, welche winkelabhängig das Exzeß-Rayleigh-Verhältnis R_θ (Rayleigh-Faktor) einer Polymerlösung messen.

Um aus den Streuintensitäten die Molmasse zu ermitteln wird ein Debye-Diagramm konstruiert. Die Werte für $K \cdot c / R_\theta$ werden für die verwendeten Streuwinkel berechnet und gegen $\sin^2(\theta/2)$ graphisch aufgetragen [115] (siehe Abb.II-1). Für $\theta \rightarrow 0$ wird $P_\theta = 1$, da meistens der 2. Virialkoeffizient A_2 bzw. die Konzentrationsabhängigkeit der Messwerte vernachlässigt werden kann [122]. Unter diesen Voraussetzungen kann nach der Zimm-Methode aus dem Achsenabschnitt der nach $\theta = 0^\circ$ extrapolierten Geraden $1 / Mw$ ermittelt werden.

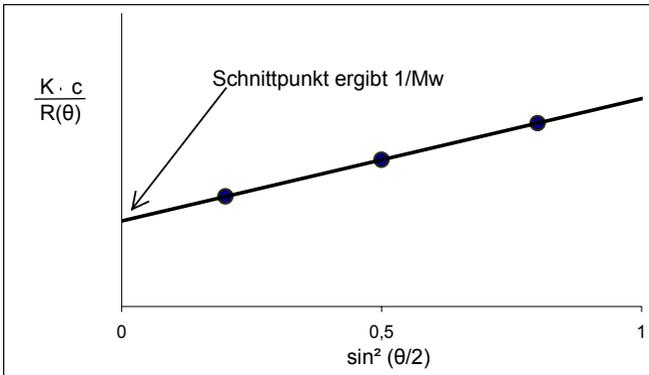


Abb.II- 1: Debye Diagramm einer Polymerfraktion. Durch die Auftragung von $K \cdot c / R_0$ gegen $\sin^2(\theta/2)$ wird eine Gerade erhalten, deren Achsenabschnitt $1 / M_w$ ergibt.

Für die Berechnung der Molmassenmittelwerte M_n und M_w wird davon ausgegangen, dass die durch die Größenausschlusschromatographie aufgetrennten Polymerfraktionen monodispers sind. Das über Lichtstreuung gemessene M_w der Fraktion stellt damit im idealen Fall eine einheitliche Molmasse dar. Unter Einbeziehung der mit einem RI-Detektor ermittelten Konzentration der Polymerfraktion können die Mittelwerte der gesamten Molmassenverteilung (M_w und M_n) berechnet werden.

II.4.2 Geräte und Trennsäulen

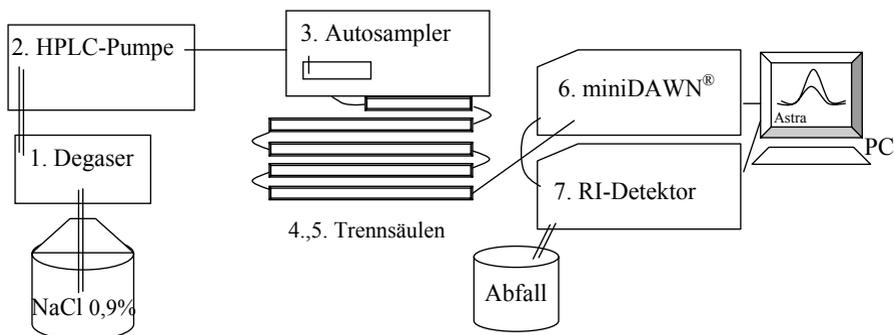


Abb.II- 2: Schematische Darstellung des Geräteaufbaus der SEC-MALLS-HPLC zur Molmassendetektion.

Die Nummern des schematischen Aufbau der HPLC-Anlage in Abb.II- 2 bedeuten:

1. Vakuum-Membran-Degaser DEGASSER® ERC-3215 α (ERC-GmbH, Riemerling)
2. HPLC-Pumpe LaChrom® L-7100 (Merck/Hitachi, Darmstadt)
3. Autosampler AS 200A (Merck/Hitachi, Darmstadt)
4. Edelstahl-SEC-Trennsäulen entsprechend Tab.II- 1, (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart)

Tab.II- 1: Charakterisierung der SEC-HPLC-Säulen für die Bestimmung der Molmassenverteilung der HES.

Säulentyp	Größe (mm)	Korngröße (Da)	Porengröße (Å)
TSKgel PWL Guardcolumn	75 x 7,5	-	-
Grade G6000PWWL Column Na	300x7,8	13 μ	>1000
Grade G5000PWWL	300x 7,8	10 μ	1000
Grade G3000PWWL	300x7,8	6 μ	200
TSKgel G1000	300x7,8	10 μ	<100

5. Edelstahl-Trennsäule „Nucleogel SAX 1000-8/46“, 50x4,6 mm (Macherey Nagel, Düren); mit einem stark basischen Anionenaustauscher gefüllt.
6. 3-Winkel-Lichtstreuophotometer miniDAWN® (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA)
7. Differential-Refraktometer „RI-71“ (Merck/Hitachi, Darmstadt)

II.4.3 Ausschlusschromatographie SEC

Als Fließmittel wurde in dem angewandten System, dargestellt in Abb.II- 2, 0,9%ige NaCl-Lösung verwendet. Die Verwendung eines Puffers war zur Trennung der Stärkepolymere nicht erforderlich. Ein konstanter Flow von 1 mL/min wurde bei einem Druck zwischen 90 und 150 bar aufrecht erhalten.

II.4.4 Geräteparameter und Kalibrierungen

Der für die Molmassenbestimmung notwendige Absolutwert der Streuintensität einer Lösung kann nur unter definierten Bedingungen (Beobachtungsabstand $r = 1$ cm, Primärstrahl $I_0 = 1$ cm⁻¹, Streuvolumen $V = 1$ cm³) gemessen werden, welche in der Praxis von Detektor zu Detektor variieren. Da die absolute Streuintensität des Toluols bekannt ist, wird die Messzelle mit reinem Toluol kalibriert. Die Kalibration des miniDAWN[®] erfolgte beim Hersteller. Eine Gerätekonstante von $8,9930 \cdot 10^{-6}$ cm⁻¹ wurde dort ermittelt und für die nachfolgenden Messungen beibehalten.

Die drei Detektoren des miniDAWN[®] sind bauartbedingt nicht exakt auf die Winkel $\theta = 45^\circ$, $\theta = 90^\circ$ und $\theta = 135^\circ$ zu justieren. Weiterhin müssen unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Fotozellen, Brechungsindexeffekte und Unterschiede in den Streuvolumina, welche die Fotozellen erreichen, berücksichtigt werden. Durch einen isotropen Streuer, einer Substanz, die in allen Raumrichtungen die gleiche Streuintensität aufweist, werden diese Unterschiede ermittelt. Für alle Detektoren werden die Exzeß-Rayleigh-Verhältnisse R_θ bestimmt und durch die Software automatisch angeglichen. Dextran 50 (Polymer Standards Service GmbH, Mainz) mit einem mittleren Molekulargewicht von 50.000 Da ist ein isotroper Streuer. Von dieser Substanz wurden 5,0 g/L in wässriger Lösung mittels der chromatographischen Messanordnung fraktioniert. Nach Auswertung der Chromatogramme wurden mit Hilfe der Option „Normalize“ der Software ASTRA 473 (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA) die Normalisierungsparameter ermittelt und übernommen.

Der miniDAWN[®] Streulicht-Detektor und der RI-Detektor wurden durch eine Edelstahlkapillare miteinander verbunden. Der dabei auftretende Volumenversatz führt

zu einer konstanten Zeitverschiebung zwischen den beiden Detektionssignalen. Der Volumenversatz wurde durch Analyse eines monodispersen Polymerstandards, in diesem Fall Pullulan 800 (Polymer Standards Service GmbH, Mainz), bestimmt. Die registrierten Detektorsignale wurden mit der Funktion „Align“ der Auswertsoftware ASTRA 473 so verschoben, dass die Peak-Maxima übereinander lagen. Der Volumenversatz wurde dadurch mit $\Delta V_D = 0,133 \text{ mL}$ bestimmt und für die nachfolgenden Messungen übernommen.

Das Brechungsindexinkrement dn/dc für Hydroxyethylstärke ist bekannt und beträgt $0,135 \text{ cm}^3/\text{g}$. Das Brechungsindexinkrement für Dextran und Pullulan ist $0,147 \text{ cm}^3/\text{g}$. Die Kalibrationskonstante für den RI-Detektor wurde von Labormitarbeitern mit $5,1761 \cdot 10^{-5} \text{ RI-Units/Volt}$ durch Verwendung von eingewogenen Standards festgelegt.

II.4.4.1 Aufzeichnung und Auswertung der Detektorsignale

Jeweils $100 \mu\text{L}$ der Proben wurden injiziert und bei einem konstanten Flow von 1 mL pro Minute durch die Säulen transportiert. Die Detektorsignale der fraktionierten Proben wurden elektronisch aufgezeichnet. Beginnend 20 Minuten nach Probeninjektion wurde das Signal für 26 Minuten im $0,5 \text{ Sekunden-Abstand}$ aufgezeichnet. Die Basislinien der drei Detektorsignale des miniDawn[®] und des RI-Detektorsignals sowie die Peakbegrenzung wurden manuell festgelegt. Die Datenauswertung der Messsignale erfolgte entsprechend der Methode nach Debye mit der Auswertsoftware ASTRA 473. Damit wurden Molmassen und Molmassenverteilungen der fraktionierten Polymerproben erhalten.

II.4.4.2 Grundkalibrierung mit HES-Lösungen

Zur Grundkalibrierung wurde eine Messung von Konzentrationsreihen der drei im Versuch eingesetzten Präparate mit jeweils zwei Werten in den Verdünnungen von 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:200 (entsprechend Konzentrationen von $6,0 \text{ mg/mL}$, $3,0 \text{ mg/mL}$, $1,2 \text{ mg/mL}$, $0,6 \text{ mg/mL}$ und $0,3 \text{ mg/mL}$ HES) vorgenommen.

II.4.5 Isolierung der HES aus dem Serum

500 µL der bei 4°C aufgetauten Serumprobe wurden in 1,5-mL-Eppendorf-Cups (Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert und die Proteine wurden mit 500 µL kalter 10%iger Perchlorsäure ausgefällt. Anschließend wurde 10 min bei 3000 U/min (1850 g) und 0 °C zentrifugiert (Zentrifuge Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde in 1,5-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße verbracht und erneut 10 min bei 3000 U/min und 0 °C zentrifugiert. 500 µL des klaren, partikelfreien Überstand wurden in Zentrifugengläser mit 8 mL kaltem Aceton p.A. zur Ausfällung der HES pipettiert und 30 Minuten bei 3500 U/min (2520 g) und 0 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Nach wiederholtem Versetzen mit 8 mL Aceton p.A. folgte 15 min andauerndes Zentrifugieren bei 3500 U/min und 0 °C und danach Dekantieren des Überstandes. Der Rückstand wurde im Vakuumexsikkator mindestens eine Stunde getrocknet. Der getrocknete Rückstand wurde in 500 µL destilliertem Wasser gelöst. Der Vorgang nahm wegen der Schwerlöslichkeit des Hydrokolloids etwa eine halbe Stunde in Anspruch. Nach dem Lösen wurde nochmals 10 min bei 3500 U/min und 4 °C zentrifugiert, um die in Wasser schwerlöslichen Restproteine abzutrennen. Diese Lösung wurde unter Meidung der schwerlöslichen sedimentierten Restproteine in Probengeber-Vials (0,3 mL Conic-Probenfläschchen, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt am Main) pipettiert. 100 µL der Lösung wurden zur Analyse auf die HPLC (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)-Säulen injiziert. Alle Proben wurden als Doppelbestimmungen aufgearbeitet.

II.4.6 Isolierung der HES aus Leber und Milz

II.4.6.1 Validierung der Methode

Um sicher zu stellen, dass die verwendete Methode geeignet ist, wurden Wiederfindungsversuche angestellt. Dabei dienten als Grundlage für die Isolierung von HES eine Modifikation der Glycogenbestimmung nach Wikarczyk und Förster et al. [86, 61]. Zur Überprüfung der Methode wurde ca. 1 g Leber eingewogen und diese mit 1 mL verdünnter 6%iger HES-Lösung (HES 450/0,7 und HES 130/0,4: Verdünnung 1:10; 0,5:10; 0,2:10 und 0,1:10 von 6%iger Ausgangslösung, HES

200/0,5 Verdünnung 0,2:10 entsprechend 1,2 mg HES) versetzt. Die Aufarbeitung der Organproben für die HPLC erfolgte nach der Arbeitsvorschrift wie im Abschnitt II.4.6.2 beschrieben. Die Leerwerte von Milz und Leber wurden nach entsprechender Probenaufarbeitung ebenfalls bestimmt.

II.4.6.2 Probenvorbereitung für die HPLC

Von jeder Leber wurden Doppelwerte aufgearbeitet. Etwa 1 g Leber wurde pro Bestimmung eingewogen. Die Milz (Gesamtgewicht < 1 g) wurde in zwei ähnlich große Stücke geteilt um diese als Doppelwerte aufzuarbeiten. Wenn auf diese Weise keine oder nur sehr wenig HES isoliert werden konnte wurde alternativ eine ganze Milz für Einzelwerte verwendet.

Zu den Organproben wurden 4 mL destilliertes Wasser zugegeben. Die Proben wurden daraufhin mit einem Ultra-Turrax[®] Typ TP 18/10 (Fa Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen) etwa 30 Sekunden unter Kühlung mit Eis homogenisiert. Aus der homogenisierte Probe wurden durch hinzufügen von 1 mL 20%iger Perchlorsäure die Proteine ausgefällt. Anschließend wurde 5 min bei 3000 U/min (1850 g) und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen).

Der flüssige Überstand wurde in bereits mit 40 mL Aceton zum Ausfällen von Glykogen und HES gefüllte Zentrifugenröhrchen überführt und bei 0 °C gekühlt. Der nach Abkippen des Überstandes übriggebliebene Rückstand wurde erneut mit 4 mL destilliertem Wasser aufgeschwemmt und unter Kühlung homogenisiert. Nach Zugabe von 1 mL 20%iger Perchlorsäure wurde ebenfalls 5 min bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde in weitere mit 40 mL Aceton gefüllte Zentrifugenröhrchen unter Meidung nicht gelöster Partikel überführt und auf 0 °C gekühlt. Die beiden Teilproben wurden 50 min bei 3500 U/min (2520 g) und 0 °C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgekippt und die beiden Rückstände einer Probe wurden mit 10 mL einer Mischung aus einem Teil Ethanol und einem Teil destilliertem Wasser, zu welcher pro 100 mL je 0,9 g NaCl gegeben wurde, wieder in ein Glas-Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Die vereinten Proben wurden 30 min,

unterbrochen durch wiederholtes Mischen, ins Ultraschallbad (Bransonic[®], Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, USA) gestellt. Danach wurden die Proben 50 min bei 3500 U/min und 20 °C zentrifugiert um das in dieser Mischung schlecht lösliche Glykogen von der in Lösung gegangenen HES abzutrennen.

Der dabei erhaltene Überstand wurde erneut mit 40 mL Aceton zusammengeführt und 50 min bei 3500 U/min und 0 °C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde anschließend erneut der Rückstand mit 10 mL eines Gemisches aus Ethanol und destilliertem Wasser (1+1, ohne NaCl Zusatz) eine halbe Stunde ins Ultraschallbad gestellt um die HES zu lösen. Anschließend wurden die Proben 50 min bei 3500 U/min und 20 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde ein weiteres mal in jeweils mit 40 mL Aceton gemischt. Ein letztes Mal wurde 50 min bei 3500 U/min und 0 °C zentrifugiert. Der danach erhaltene HES-Niederschlag wurde im Vakuumexsikkator mindestens eine Stunde getrocknet.

Danach wurde die getrocknete HES in 500 µL destilliertem Wasser gelöst. Der Vorgang nahm wegen der Schwerlöslichkeit des Hydrokolloids etwa eine halbe Stunde in Anspruch. Nach dem Lösen wurde nochmals 10 min bei 3500 U/min und 4 °C zentrifugiert, um die in destilliertem Wasser schwerlöslichen Restproteine abzutrennen. Diese Lösung wurde unter Meidung der schwerlöslichen Restproteine in Probengeber-Vials (0,3 mL Conic-Probenfläschchen, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt am Main) pipettiert und davon 100 µL zur Analyse auf die HPLC (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)-Säulen gebracht.

II.5 Statistische Auswertung

Sämtliche Daten wurden in dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel 2000 aufgenommen. Aus den Einzelergebnissen der Versuchsserien wurden, soweit nicht anders angegeben, die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) errechnet. Die graphische Darstellung erfolgte je nach besserer Übersichtlichkeit mittels Säulen- oder Liniendiagramm. Aus der Formel für exponentielle Funktionen

$$Y_i = Y_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{Gleichung II- 5})$$

(mit Y_0 = fiktiver Ausgangswert, Y_i = Wert zu jedem beliebigen Zeitpunkt t , e = Basis des natürlichen Logarithmus,

k = Eliminationskonstante, t = Zeitpunkt, bei welchem Y_i ermittelt werden soll)

lässt sich die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ableiten und anhand der Formel

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (\text{Gleichung II- 6})$$

berechnen.

Zur statistischen Auswertung der Messwerte wurde das Softwareprogramm BIAS 7.02 verwendet [123]. Bei den zugrundeliegenden Daten wurden Ausreißer mit dem Grubbs-Test ermittelt [124], wobei ein $p > 0,05$ zugrunde gelegt wurde.

Zum Vergleich von verbundenen Stichproben wurde das Vorliegen einer Gauß-Verteilung der zugrundeliegenden Daten mittels des Shapiro-Wilk-Tests ermittelt, welcher bei kleineren Gruppengrößen dem Kolmogoroff-Smirnov-Liljefors-Test überlegen ist. Diese Testung erfolgte auf einem Signifikanzniveau von 10%.

Bei Vorliegen einer Gauß-Verteilung wurde als Testverfahren der Zwei-Stichproben-t-Test eingesetzt. Dieser ist als parametrischer Test hinsichtlich der Trennschärfe den nichtparametrischen Verfahren überlegen. Bei unverbundenen Stichproben oder Nichtvorliegen der Gauß-Verteilung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test eingesetzt [125]. Bei der Testung auf Signifikanz wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt.

III Ergebnisse

III.1 Eigenschaften der Infusionslösungen

Da Größen wie der Gewichtsmittelwert der Molmasse (Mw) chargenabhängig schwanken können, wurde dieser für alle verwendeten, handelsüblichen Versuchspräparate vor der Analyse der Proben mit Hilfe der Laser-Streulicht-Methode bestimmt. Dabei wurden ebenfalls der Zahlenmittelwert der Molmassen Mn und die Molmasse im Peakmaximum des Elutionsdiagramms Mp der enthaltenen Hydroxyethylstärke bestimmt. Die Spezifikationen der in den Versuchen eingesetzten Präparate sind Tab.III- 1 zu entnehmen:

Tab.III- 1: Eigenschaften der HES-Präparate unter Angabe der Herstellerangaben (Mw und MS) sowie der unter Verwendung der SEC-MALLS-HPLC gemessenen Mw, Mn und Mp. Die Molmassenverteilungen der drei HES-Präparate wurden jeweils als Doppelbestimmung in fünf unterschiedlichen Verdünnungen gemessen.

Präparat	Charge	Mw (Hersteller angaben in Da)	MS (Hersteller angaben)	Mw (gemessen in Da)	Mn (gemessen in Da)	Mp (gemessen in Da)
HES 200/0,5; Haes-steril®	KH3913	200.000	0,5	203.210 ±5.282	70.992 ±3.193	126.210 ±7.567
HES 450/0,7; Plasmasteril®	HE1503	450.000	0,7	489.110 ±5.391	64.159 ±5.917	482.480 ±18.965
HES 130/0,4; Volumen®	KI3242	130.000	0,4	106.160 ±3.030	57.201 ±2.419	68.247 ±914

Bei der Grundkalibration konnte eine Korrelation der eingesetzten zur gemessenen Konzentration von >0,99 ermittelt werden. Bei der Ermittlung von Mw, Mn und Mp blieben die Standardabweichungen bei den HES-Präparaten unter Berücksichtigung aller Werte aus der Konzentrationsreihe immer unter 10% (HES 200/0,5: Standardabweichung bei Mn 4,8%, bei Mw 2,6%, bei Mp 6,0%; HES 450/0,7: Mn 9,2%, Mw 1,1%, Mp 3,9%; HES 130/0,4: Mn 4,2%, Mw 2,9%, Mp 1,3%).

III.2 Gewicht der Versuchstiere

Die Tiere wurden vor Einleitung der Narkose gewogen. Die Durchschnittsgewichte und Standardabweichungen in den Versuchsgruppen sind der Tab.III- 2 zu entnehmen.

Tab.III- 2: Durchschnittsgewichte der Versuchstiere in den einzelnen Versuchsgruppen bei einer Gruppengröße von n = 8.

Versuchsgruppe	Durchschnittsgewicht
Infusion von HES 200/05 – Organentnahme Tag 0	340±11 g
Infusion von HES 450/0,7 – Organentnahme Tag 0	339± 8 g
Infusion von HES 130/0,4 – Organentnahme Tag 0	476±22 g
Infusion von HES 200/05 – Organentnahme Tag 1	321± 8 g
Infusion von HES 450/0,7 – Organentnahme Tag 1	358±16 g
Infusion von HES 130/0,4 – Organentnahme Tag 1	384±18 g
Infusion von HES 200/05 – Organentnahme Tag 3	356±22 g
Infusion von HES 450/0,7 – Organentnahme Tag 3	342±33 g
Infusion von HES 130/0,4 – Organentnahme Tag 3	464±34 g
Infusion von HES 200/05 – Organentnahme Tag 5	313±12 g
Infusion von HES 450/0,7 – Organentnahme Tag 5	346±17 g
Infusion von HES 130/0,4 – Organentnahme Tag 5	327±10 g
Infusion von HES 200/05 – Organentnahme Tag 10	339±14 g
Infusion von HES 450/0,7 – Organentnahme Tag 10	333±22 g
Infusion von HES 130/0,4 – Organentnahme Tag 10	412±23 g
Infusion von HES 200/05 – Organentnahme Tag 50	327± 7 g
Infusion von HES 450/0,7 – Organentnahme Tag 50	383±20 g
Infusion von HES 130/0,4 – Organentnahme Tag 50	334±18 g

III.3 Klinische Beobachtungen

Zur Durchführung der Untersuchungen waren insgesamt 144 männliche Wistar WU-Ratten vorgesehen. Als Versuchsanfang wurde der Beginn der Katheterinsertion definiert. Während des Versuchs starben zehn der Versuchstiere (6,9%).

Von diesen zehn Tieren starben zwei in den Versuchen mit HES 450/0,7-Infusion, wobei eines aus der Gruppe mit Organentnahme 5 Tage nach Infusion und eines aus der Gruppe mit Organentnahme 50 Tage nach Infusion stammt.

Fünf der Versuchstiere starben in den Versuchen mit HES 200/0,5-Infusion, wobei jeweils ein Tier der Gruppen mit Organentnahme 1, 3, 5, 10 bzw. 50 Tage nach Infusion ausgefallen war.

Bei den Versuchen mit HES 130/0,4-Infusion starb ein Tier aus der Gruppe mit Organentnahme 5 Tage nach Infusion, zwei Tiere starben aus der Gruppe mit Organentnahme 50 Tage nach Infusion. Drei Tiere starben während der Infusion, fünf während einer der folgenden Blutentnahmen und zwei im weiteren Nachbeobachtungszeitraum.

Bei einer Obduktion am Versuchsende wurde eine makroskopische Beurteilung des Abdominal- und Thorakalraumes vorgenommen. Zwei der während der Infusion verstorbenen Versuchstiere wiesen einen Hämothorax auf. Dieser war vermutlich beim Verschieben des Infusionskatheters durch Verletzung des Gefäßes aufgetreten. Das weitere während der Infusion verendete Tier starb an einem plötzlichem Kreislaufversagen mit Atemstillstand, welcher in zeitlichem Zusammenhang mit der Anästhesie steht. Die Obduktion war ohne besonderen Befund. Daher kann die kreislauf- und atemdepressive Wirkung der Anästhetika als Ursache vermutet werden.

Die während der retroorbitalen Blutentnahmen verstorbenen Tiere zeigten einen plötzlichen Atemstillstand mit Kreislaufversagen nach Einleitung einer Inhalationsnarkose. Auch hier kann die Wirkung der Anästhetika (Isofluran) als Ursache vermutet werden, welches eine depressive Wirkung auf das medulläre Atemzentrum hat und im kardiovaskulären System eine Hypotension bewirkt.

Die im weiteren Nachbeobachtungszeitraum entfallenen Tiere wurden getötet, da ein stetiger Gewichtsverlust durch verminderte Futteraufnahme an den ersten Tagen nach Infusion zu beobachten war. Bei beiden Tieren waren außerdem knackende Atemgeräusche zu vernehmen. Bei der Obduktion waren emphysematöse Lungen festzustellen. Als Ursache können Atelektasen vermutet werden, welche bei der Lagerung der Versuchstiere auf dem Rücken während der drei Stunden andauernden Infusion aufgetreten sein könnten.

Bei einer weiteren Ratte konnten bei der Organentnahme am Versuchsende einseitig Nierenzysten festgestellt werden. Ursache hierfür können pyelonephritische oder vaskuläre Narben sein, welche die Tubuli abschnüren, oder es lag eine erbliche Zystenniere vor. Da diese einseitig auftrat kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Ausscheidung der infundierten HES dadurch nicht beeinträchtigt war.

III.4 Blutuntersuchungen

III.4.1 Hämoglobinkonzentration

Bei allen Versuchstieren wurde unmittelbar vor der Infusion ein Hämoglobingehalt (Hb) mit einem Mittelwert von $16,2 \pm 1,9$ g/dL gemessen. Zur Darstellung des Verdünnungseffektes der HES-Präparate auf das Blut wurden die Hämoglobinkonzentration vor Infusion als 100% definiert und die Verläufe dazu in Relation gesetzt (s. Abb.III- 1).

Direkt nach Infusion von Hydroxyethylstärke war die Hämoglobinkonzentration bei HES 200/0,5 auf $84 \pm 10\%$ erniedrigt. Erwartungsgemäß war der Hämoglobingehalt der hochsubstituierten HES 450/0,7 mit $76 \pm 9\%$ am stärksten vermindert und bei HES 130/0,4 mit $87 \pm 8\%$ am wenigsten. Nur nach Infusion von hochsubstituierter HES 450/0,7 mit der längsten Eliminationshalbwertszeit war ein längerer Effekt der Hämodilution auszumachen und die Werte für Hb zwei Stunden ($92 \pm 11\%$), vier Stunden ($87 \pm 8\%$) und sechs Stunden nach Infusion ($83 \pm 12\%$) noch signifikant erniedrigt.

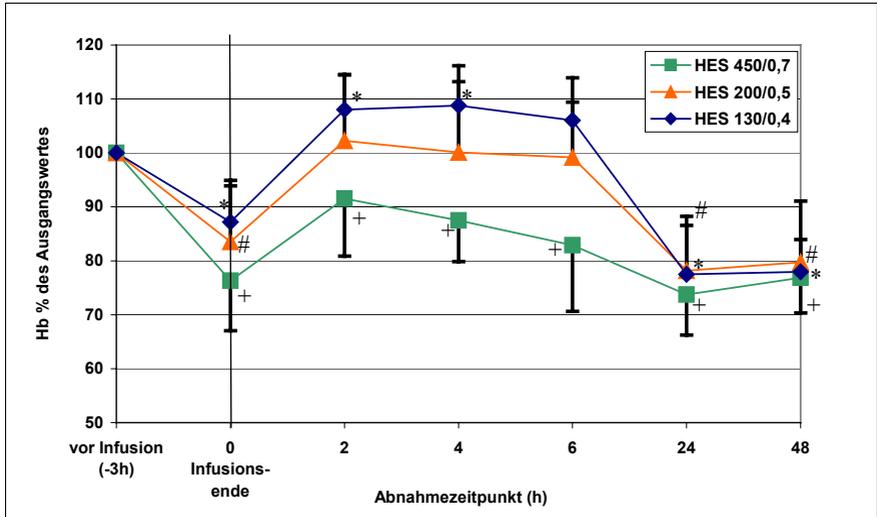


Abb.III- 1: Verlauf der Hämoglobinkonzentration in Prozent vom Ausgangswert vor Infusion nach Verabreichung von 18 mL 6%iger HES in 3 h. Bei signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$) vom Ausgangswert wird der Zeitpunkt mit * (HES 130/0,4), + (HES 450/0,7) bzw. # (HES 200/0,5) gekennzeichnet.

An den Folgetagen, 24 h und 48 h nach Infusion, war der Hämoglobingehalt bei allen Versuchsgruppen erneut herabgesetzt (s. Abb.III- 1). Dieser erneute Abfall des Hb kann durch den Blutverlust infolge der Blutabnahmen bedingt sein. Nach mehrfachen Blutabnahmen ergab sich eine nicht unerhebliche abgenommene Gesamtblutmenge, wobei das Blutvolumen durch Flüssigkeit aus dem interstitiellen Raum aufgefüllt wird.

Durch die Hämoglobinkonzentration (s. Abb.III- 1) und den Hämatokrit (s. Abb.III- 2) konnte eine erfolgreiche Hämodilution dokumentiert werden.

III.4.2 Hämatokrit

Vor Infusion lag der Hämatokrit (HTK) bei $0,42 \pm 0,03$. Um den Verdünnungseffekt darzustellen, wurden die Werte vor Infusion als 100% definiert und die Verläufe (s. Abb.III- 2) in Relation dazu gesetzt.

Der Mittelwert des HTK war nach Infusion auf $80 \pm 8\%$ bei Verwendung von HES 200/0,5 und auf $85 \pm 8\%$ nach Infusion von HES 130/0,4 verringert. Nach Infusion von hochsubstituiertem HES 450/0,7 war auch der Hämatokrit am stärksten auf $76 \pm 12\%$ reduziert. Der HTK blieb nach Infusion von HES 450/0,7 während der gesamten Messungen unterhalb des Ausgangswertes vor Infusion.

An den Folgetagen, 24 h und 48 h nach Infusion, war der Hämatokrit nach Infusion bei jedem HES-Präparat wieder erniedrigt. Die Hämatokritwerte lagen zwischen 72% und 80% in einem vergleichbaren Bereich und waren Analog zur Hämoglobinkonzentration vermutlich infolge des Blutverlustes vermindert.

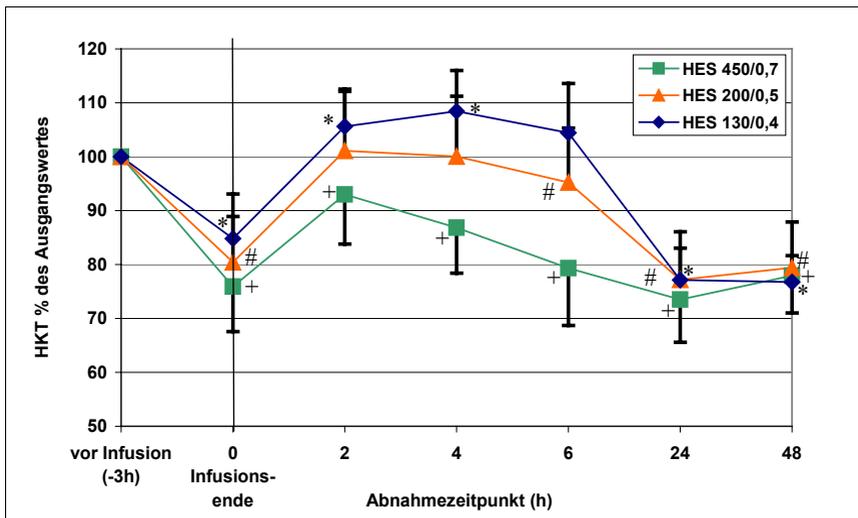


Abb.III- 2: Verlauf des Hämatokrit in Prozent vom Ausgangswert vor Infusion nach Verabreichung von 18 mL 6%iger HES in 3 h. Bei signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$) vom Ausgangswert wird der Zeitpunkt mit * (HES 130/0,4), + (HES 450/0,7) bzw. # (HES 200/0,5) gekennzeichnet.

III.5 Molmassenverteilung von HES

Die Spezifitäten der verwendeten Hydroxyethylstärkepräparate wurden bereits in Kapitel III.1 aufgeführt. Die HES 450/0,7 wies dabei bei einem Gewichtsmittelwert der Molmassen (M_w) von 489.110 und einem Zahlenmittelwert der Molmassen (M_n) von 64.159 eine relativ breite Verteilung und damit einen hohen Polydispersitätsquotienten von $7,68 \pm 0,69$ auf. Bei der HES 450/0,7 war damit auch ein relativ großer Anteil an Molekülen mit Molmassen über 1.000.000 Da zu finden (s. Abb. III-3). Im Gegensatz dazu war die verwendete HES 130/0,4 mit einem Polydispersitätsquotienten von $1,86 \pm 0,12$ eng verteilt. HES 200/0,5 lag mit $2,87 \pm 0,19$ dazwischen.

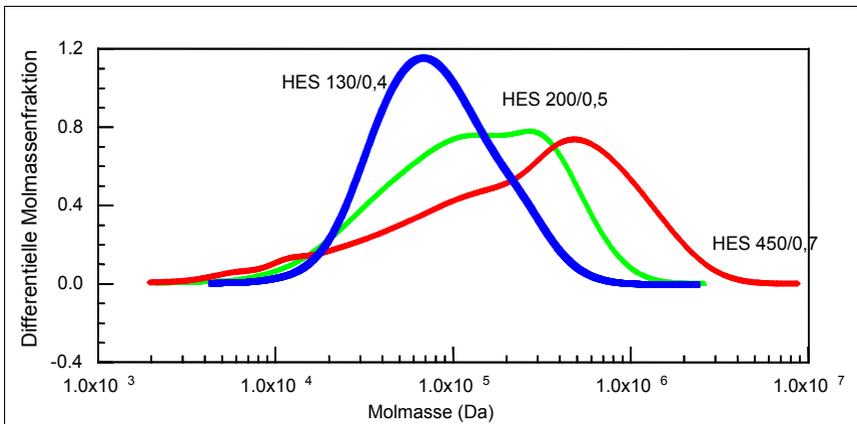


Abb.III- 3: Molmassenverteilungen der zur Infusion eingesetzten HES-Präparate HES 450/0,7, HES 200/0,5 und HES 130/0,4 in halblogarithmischer Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung.

III.5.1 Molmassenverteilung im Serum

Nach Infusion der HES wurde während der Organentnahme an Tag 0 (direkt nach Infusion) sowie 1, 3, 5, 10 und 50 Tage nach Infusion beim Entbluten der Tiere Serum erhalten, welches ebenfalls auf die Molmassenverteilung der enthaltenen HES untersucht wurde. Dabei war nach Infusion von HES 450/0,7 bis 50 Tage nach Infusion HES im Serum nachzuweisen, bei HES 200/0,5 hingegen maximal bis Tag 5 und bei HES 130/0,4 bis Tag 3 nach Infusion.

III.5.1.1 Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw), HES im Serum

Das Mw der Hydroxyethylstärke jeder direkt nach Infusion abgenommenen Serumprobe lag signifikant und mehr als 60% unterhalb des Mw der jeweils infundierten HES. Die einzelnen Mittelwerte und der Verlauf des Mw können Abb.III-4 entnommen werden.

Nach Infusion von HES 450/0,7 fiel das Mw im Verlauf von Tag 0 bis Tag 50 kontinuierlich und signifikant von 170.579 ± 12.088 bis 77.590 ± 6.009 ab. Dabei werden die Moleküle innerhalb von 13,2 Tagen unter Annahme eines mono-exponentialen Abfalls von Tag 0 bis 10 ($B = 0,9449$) soweit abgebaut, dass sich das Mw nochmals halbiert. Nach Infusion von HES 200/0,5 und HES 130/0,4 stieg nach einem Tiefpunkt direkt nach Infusion das Mw im Serum wieder leicht an.

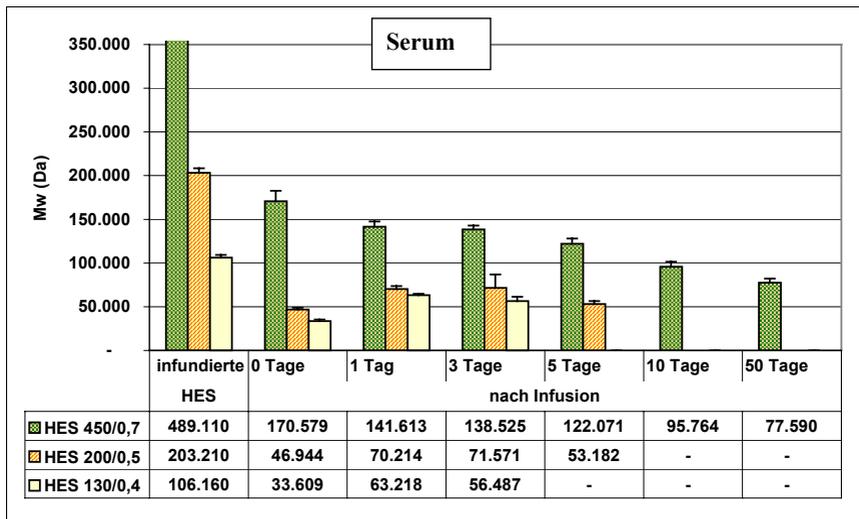


Abb.III- 4: Mw der aus den bei der Organentnahme erhaltenen Serumproben isolierten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.

Die verschiedenen HES-Präparate werden alle sofort stark abgebaut, direkt nach Infusion sind die Werte bereits auf 35% (HES 450/0,7), 23% (HES 200/0,5) bzw. 32% (HES 130/0,4) des Ausgangswerte abgesunken. Anschließend erfolgen die Veränderungen nur noch in geringerem Ausmaß.

III.5.1.2 Zahlenmittelwert der Molmassen (Mn), HES im Serum

Das aus den Serumproben ermittelte Mn lag am Tag 0 signifikant unter dem Mn der jeweiligen infundierten HES und war dabei wie das Mw um über die Hälfte verkleinert. Allerdings stieg das Mn anschließend wieder deutlich und statistisch signifikant an (s. Abb.III- 5).

Die HES 200/0,5 hatte das höchste Mn, verringerte sich jedoch intravasal bei der Abnahme direkt nach Infusion auf den niedrigsten Wert. Das Mn nach Infusion von HES 130/0,4 lag damit an Tag 0 signifikant über dem Mn nach Infusion von HES 200/0,5. Am Tag nach Infusion war das Mn nach HES Infusion von 130/0,4 auch signifikant größer als jenes nach Infusion von HES 450/0,7. Ab Tag 3 waren die Unterschiede zwischen den Lösungen jedoch nicht mehr signifikant.

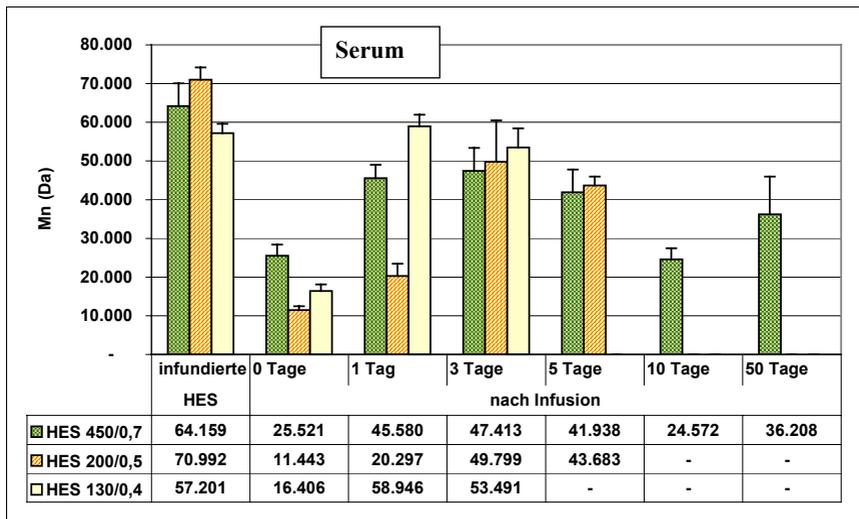


Abb.III- 5: Mn der aus den bei der Organentnahme erhaltenen Serumproben isolierten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert ± SD.

III.5.1.3 Polydispersität, HES im Serum

Die Polydispersitätsquotienten der HES aus dem Serum sind in Abb.III- 6 aufgeführt.

Nach Applikation aller drei HES-Präparate war eine Abnahme des Polydispersitätsquotienten im Laufe der Zeit zu beobachten. Mn/Mw ist bereits 1 d nach Infusion von HES 130/0,4 nahezu bei dem Minimalwert von 1.

Mw/Mn wurde bei allen Lösungen kleiner, näherte sich 1 an. Dies bedeutet, dass sich Mw und Mn angleichen. Die Molmassenverteilung der HES wurde enger und die Molmassen wurden einheitlicher.

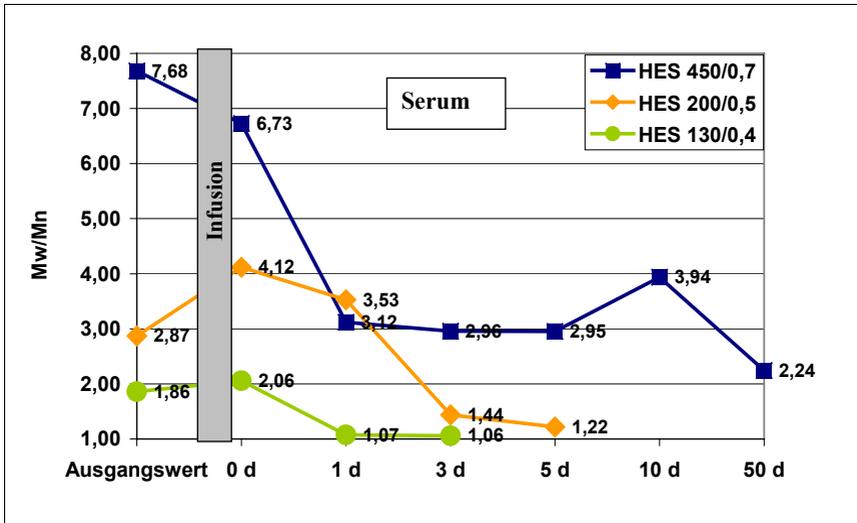


Abb.III- 6: Verlauf des Polydispersitätsquotienten der HES im Serum. Ausgangswert und Mw/Mn der aus den direkt nach und an den Tagen 1, 3, 5, 10 und 50 nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 erhaltenen Proben.

III.5.1.4 Molmasse im Peakmaximum (Mp), HES im Serum

Nach Infusion hatten die Molmassenverteilungen teilweise nicht nur ein einziges Maximum aufzuweisen, sondern bildeten einen „Sattel“ und damit einen zweiten oder gar dritten maximalen Wendepunkt aus.

Die Peakmaxima nach Infusion von HES 200/0,5 und HES 130/0,4 (Peak 2 an Tag 1) lagen an Tag 0 und 1 in einem vergleichbaren Bereich (Standardabweichung je 5%), auch wenn der Unterschied signifikant ist. Das Mp nach Infusion von HES 450/0,7 lag signifikant und deutlich darüber. Nach Infusion von HES 200/0,5 bildeten sich ab Tag 3 weitere Peaks aus, wobei ein Peak weiterhin im Bereich des Peakmaximums am Tag 1 lag (s. Tab.III- 3). Die Änderungen im Peakmaximum nach Infusion von HES 450/0,7 waren zwar teilweise signifikant, jedoch nicht relevant (Schwankungen unter 10%).

Tab.III- 3: Mp der infundierten HES-Präparate und der HES aus den während der Organentnahme erhaltenen Serumproben nach Infusion von 18 mL 6%iger HES. Darstellung des Mittelwertes ± SD.

Mp im Serum	Peak 1		% vom Ausgangswert	Peak 2		Peak 3	
Plasmasteril							
infundierte HES	482.480 ±	18.965					
0d	95.739 ±	3.816	20%				
1d	100.224 ±	3.757	21%				
3d	112.538 ±	2.452	23%				
5d	110.414 ±	5.350	23%				
10d	100.404 ±	1.990	21%				
50d	97.447 ±	6.483	20%				
Haes-steril							
infundierte HES	126.210 ±	7.567					
0d	36.685 ±	1.194	29%				
1d	65.983 ±	4.141	52%				
3d	36.098 ±	8.319	29%	101.031 ±	25.979	60.249 ±	14.296
5d	38.454 ±	2.698	30%	91.995 ±	7.913	59.747 ±	4.805
Voluvon							
infundierte HES	68.247 ±	914					
0d	33.966 ±	1.463	50%				
1d	79.911 ±	5.142	117%	65.372 ±	3.172		
3d	67.444 ±	5.521	99%				

III.5.2 Molmassenverteilung in der Leber

Bei Validierung der Methode konnte bei der Verwendung von HES 130/0,4 eine gute Trennung erreicht werden. In jeder Verdünnungsstufe konnte HES mit den charakteristischen Molmassenwerten M_w , M_n und M_p wiedergefunden werden, welche weniger als 10% von der zugesetzten HES abwichen. Im niedrigen Konzentrationsbereich war jedoch bei der Verdünnungsstufe der 6%igen HES von 0,2:10 (entsprechend 1,2 mg HES) bei drei von sechs Proben, und bei der Verdünnungsstufe 0,1:10 (entsprechen 0,6 mg HES) bei keiner der Proben noch HES nachzuweisen. Bei den Versuchen mit HES 450/0,7 und HES 200/0,5 war es nicht immer möglich HES sauber abzutrennen. Zum Teil waren im niedermolekularen Bereich zusätzliche Anteile einer Substanz im Konzentrationsdetektorsignal, mutmaßlich Glycogen, ersichtlich. Bei der Betrachtung der differentiellen Molmassenverteilung waren die Verteilungen exklusive der niedermolekularen Anteile deckungsgleich mit den Molmassenverteilungen der Ausgangswerte (s. Abb.III- 7).

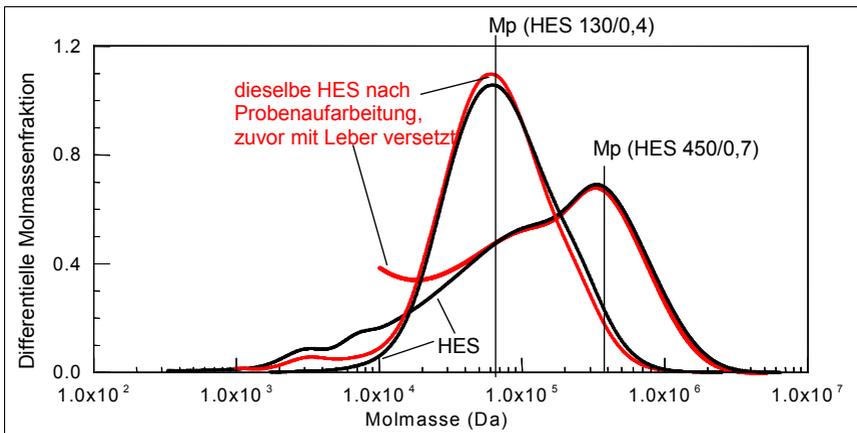


Abb.III- 7: Molmassenverteilung von HES (hier HES 130/0,4 und HES 450/0,7) und diese HES nach Abtrennung von der Leber (Methodenvalidierung) in halblogarithmischer Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung. Auch wenn im niedermolekularen Bereich Verunreinigungen vorliegen bleibt die Molmassenverteilung des höhermolekularen Anteils Deckungsgleich, das Peakmaximum (M_p) ändert sich nicht.

Entsprechend lagen die Peakmaxima M_p ebenfalls in einem Bereich, welche weniger als 10% von der zugesetzten HES abwichen. Die vor und nach Probenaufarbeitung mit der SEC-MALLS-HPLC gemessenen Konzentrationen standen in keinem Zusammenhang, so dass nur eine qualitative, nicht auch zusätzlich eine quantitative Aussage über die gespeicherte HES gemacht werden konnte.

Bereits direkt nach Infusion von Hydroxyethylstärke konnte in den Extrakten der Leber bei allen drei HES-Präparaten gespeicherte HES nachgewiesen und eine Molmassenverteilung ermittelt werden.

Nach Applikation von HES 450/0,7 war HES bis 50 Tage nach Infusion nachzuweisen, nach Applikation von HES 200/0,5 maximal bis Tag 10 nach Infusion und nach Applikation von HES 130/0,4 bis Tag 3 nach Infusion.

Die Molmassenverteilung der HES in der Leber war zumeist zweigipflig. Bei einzelnen Werten in den Gruppen war nur ein Scheitelpunkt in der Kurve anzutreffen.

III.5.2.1 Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw), HES in der Leber

Der jeweils gemessene Gewichtsmittelwert der Molmassen in der Leber kann Abb.III- 8 entnommen werden. Vergleichend sind die Ausgangswerte der HES-Präparate dargestellt. Da die HES den Organen aus dem Blutkreislauf zugeführt wird ist in den Kapitel II.5.4 nochmals ein Vergleich zwischen den Untersuchten Kompartimenten Serum, Leber und Milz erfolgt.

Das Mw 50 Tage nach Infusion von HES 450/0,7 ist wie im Serum signifikant kleiner als das Mw an Tag 0. Nach Infusion von HES 200/0,5 wurde ebenfalls bei der letzten Bestimmung am Tag 10 ein Mw, welches signifikant unter dem Mw an Tag 0 liegt, gemessen. Das Mw war dabei nach Infusion von HES 450/0,7 signifikant größer als nach Infusion von HES 200/0,5 und HES 130/0,4.

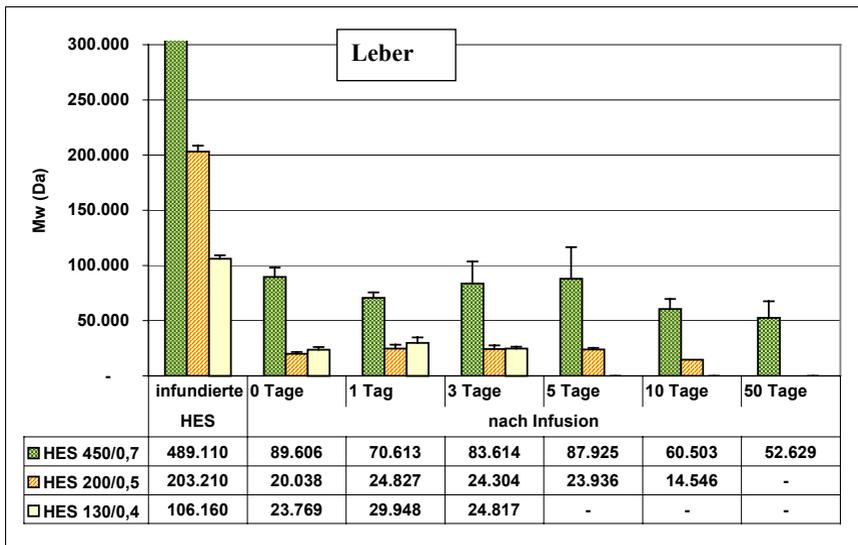


Abb.III- 8: Mw der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.

Um einen methodischen Fehler auszuschließen wurde noch eine zweite Kurvenintegration vorgenommen, in welcher der Peak stärker eingegrenzt wurde (Abb.III- 9). Der für die Begrenzung gewählte Abschnitt entspricht dem Bereich, ab welchem bei der Differentialfällung nicht von HES zu trennende Anteile vermehrt eluiert wurden.

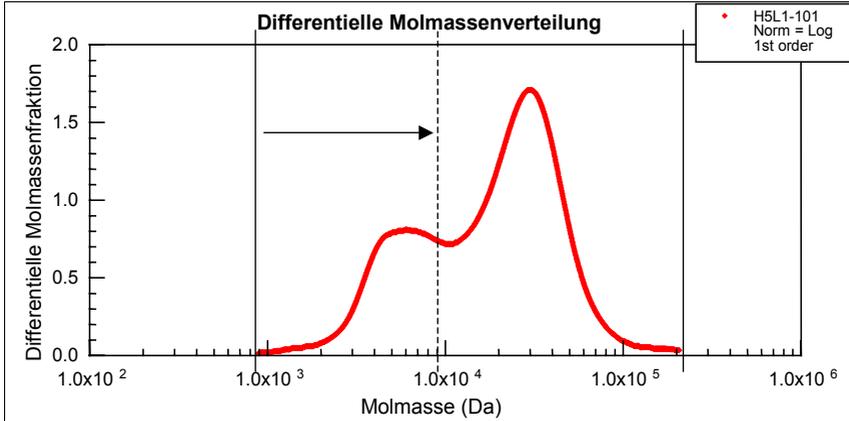


Abb.III- 9: Verschiebung der Peakbegrenzung zur Beurteilung der Molmassenverteilung in der Leber ohne Berücksichtigung der niedermolekularen Anteile, welche durch Störsubstanzen (insb. Glycogen) hervorgerufen sein könnten.

Betrachtet man bei der Molmassenverteilung der aus der Leber ermittelten Substanzen nur den höhermolekularen Anteil des Peaks ergeben sich die in Tab.III- 4 angegebenen Werte für Mw. Der Kurvenverlauf und die Signifikanzen blieben dabei wie bereits für die Betrachtung des gesamten Peaks beschrieben.

Tab.III- 4: Mw (in Da) der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 mit Peakbegrenzung und damit ohne die niedermolekularen Anteile.

		Mw (Da) – Leber					
Entnahme-Zeitpunkt	infundierte HES	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 10	Tag 50
		nach Infusion					
HES 450/0,7	489.110	104.211	77.380	87.602	106.217	81.279	77.565
	±5.391	±11.071	±813	±7.762	±34.492	±6.522	±4.199
HES 200/0,5	203.210	28.283	31.467	30.569	31.916	24.529	
	±5.282	±923	±2.312	±1.486	±1.475	±2.219	
HES 130/0,4	106.160	29.490	34.196	30.450			
	±3.030	±2.389	±5.914	±833			

III.5.2.2 Zahlenmittelwert der Molmassen (Mn), HES in der Leber

Der Zahlenmittelwert der Molmassen in der Leber gespeicherter Hydroxyethylstärke ist in Abb.III- 10 aufgeführt. Die nach HES 450/0,7- und HES 200/0,5-Infusion ermittelten Werte unterschieden sich stets signifikant vom Ausgangswert. Da die HES den Organen aus dem Blutkreislauf zugeführt wird ist in den Kapitel II.5.4 nochmals ein Vergleich zwischen den Untersuchten Kompartimenten erfolgt.

Einen Tag nach Infusion war das Mn bei jeder Lösung wieder signifikant angestiegen, ein Vorgang der im Serum ebenfalls zu beobachten war.

In der Leber war der Zahlenmittelwert nach Infusion von HES 450/0,7 ebenfalls zu jedem Zeitpunkt höher als Mn nach Infusion von HES 200/0,5, jedoch nicht immer höher als nach Infusion von HES 130/0,4. Die Unterschiede zwischen HES 450/0,7 und HES 130/0,4 und zwischen HES 450/0,7 und HES 200/0,5 an Tag 5 waren jedoch nicht signifikant.

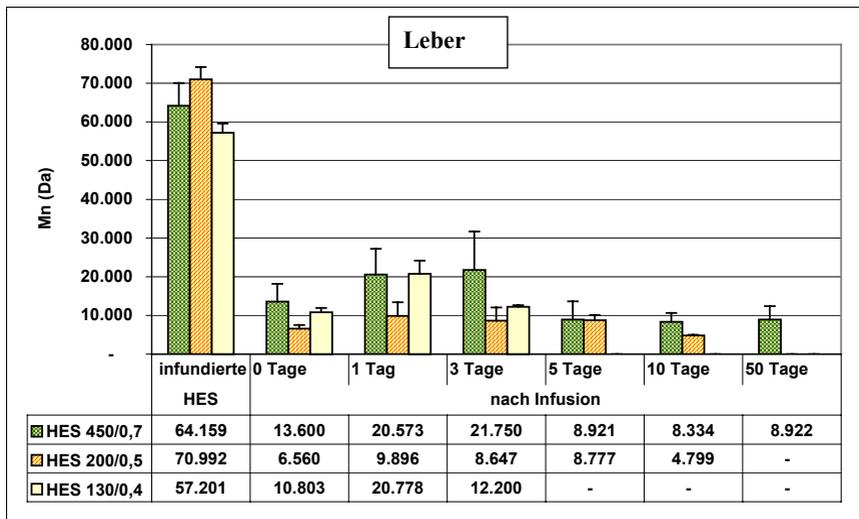


Abb.III- 10: Mn der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert ± SD.

Betrachtet man bei der Molmassenverteilung der aus der Leber ermittelten Substanzen nur den höhermolekularen Peakanteil, ergaben sich die in Tab.III- 5 aufgeführten Zahlenmittelwerte der Molmassen:

Tab.III- 5: Mn (in Da) der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten HES nach Infusion von 18ml 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 mit Peakbegrenzung und damit ohne die niedermolekularen Anteile.

Entnahme- Zeitpunkt	infundierte HES	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 10	Tag 50
		nach Infusion					
HES 450/0,7	64.159	34.728	36.861	41.595	31.735	31.089	34.115
	±5.917	±2.763	±2.566	±3.897	±10.835	±4.135	±3.386
HES 200/0,5	70.992	16.178	19.316	18.866	19.446	13.652	
	±3.193	±535	±2.529	±2,688	±967	± 525	
HES 130/0,4	57.201	20.904	24.455	22.298			
	±2.419	±1.181	±1.988	±67			

Nach Infusion von HES 450/0,7 blieben die Mn anhaltend höher als die Mn nach Infusion von HES 200/0,5. 5 Tage nach Infusion war der unterschied allerdings auch bei Auswertung ohne die niedermolekularen Anteile nicht signifikant. HES 130/0,4 bleibt bei dieser Kurvenintegration jedoch stets signifikant niedriger als HES 450/0,7.

III.5.2.3 Polydispersität, HES in der Leber

Der Verlauf der Polydispersitätsquotienten ist in Abb.III- 11 dargestellt.

Errechnet man Mw/Mn aus den Werten, (vollständiger Peak) war zwar ein zwischenzeitlicher Abfall des Mw/Mn bis auf 3,80 an Tag 1 nach Infusion von HES 450/0,7 festzustellen, allerdings stieg er danach wieder an. Am Tag 5 nach Infusion von HES 450/0,7 war ein Mw/Mn bei zwei Ratten von 20,15 bzw. 46,47 zu messen, die restlichen Tiere dieser Gruppe hatten ein Mw/Mn von 6,72±2,10. Drei Tage nach Infusion von HES 200/0,5 war bei einer Messung der Mw/Mn bei 7,80, die anderen Messungen ergaben ein Mw/Mn von 2,64±0,62.

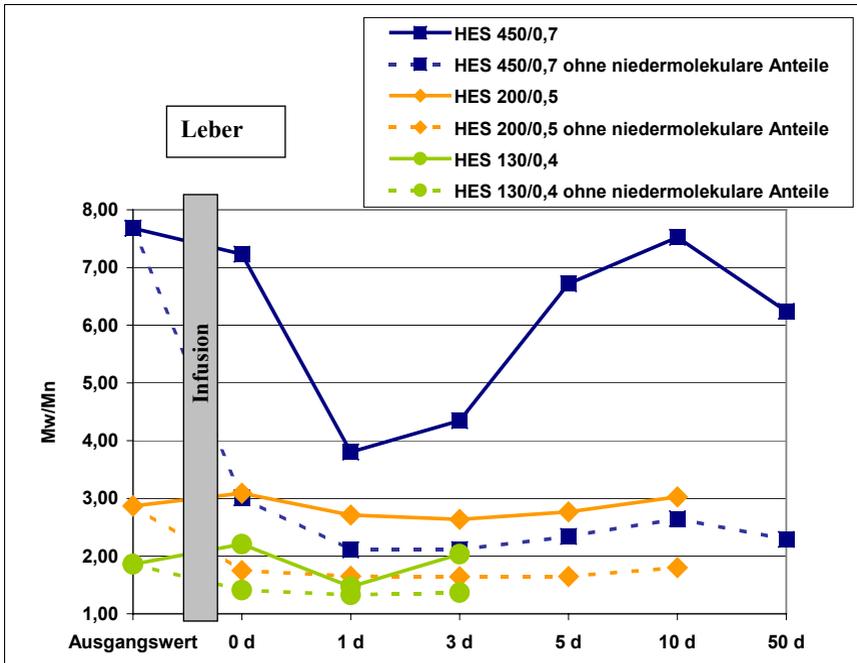


Abb.III- 11: Verlauf des Polydispersitätsquotienten der HES in der Leber. Ausgangswert und Mw/Mn der Molmassenverteilung direkt nach und an den Tagen 1, 3, 5, 10 und 50 nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mit und ohne Peakbegrenzung zum Ausschluss niedermolekularer Anteile, welche unter Umständen durch Störsubstanzen bedingt sind.

Die Molmassenverteilung der HES in der Leber war breiter, je höhermolekularer und höhersubstituierter die verwendete HES war.

Im Gegensatz zu den Serumwerten nahm der Mw/Mn im Verlauf nicht ab, sondern blieb mit Ausnahme der Werte nach Infusion von HES 450/0,7 relativ konstant. Der Polydispersitätsquotient nach Infusion der hochsubstituierten HES 450/0,7 war größer als jener nach Infusion von HES 200/0,5, welcher wiederum größer war als jener nach Infusion von HES 130/0,4. Abgesehen von Tag 0 zwischen HES 200/0,5 und HES 130/0,4 und Tag 1 zwischen HES 450/0,7 und HES 200/0,5 (jeweils bei Kurvenintegration ohne Ausgrenzung niedermolekularer Anteile) waren diese Unterschiede auch immer signifikant.

Die in Tab.III- 6 dargestellten Werte für den Polydispersitätsquotienten, welche ermittelt wurden nachdem die niedermolekularen Anteile ausgegrenzt wurden, waren erwartungsgemäß niedriger als die Werte, in welchen die Molmassenverteilung komplett einbezogen wurde. Durch Ausgrenzung eventuell vorhandener Störsubstanzen wurde auch eine Verengung der Molmassenverteilung bedingt (s. Abb.III- 9).

Tab.III- 6: Polydispersitätsquotienten (M_w/M_n) der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 mit Peakbegrenzung und damit ohne die niedermolekularen Anteile.

Entnahme-Zeitpunkt	HES 450/0,7		HES 200/0,5		HES 130/0,4	
0 d	3,01±	0,32	1,75±	0,09	1,41±	0,10
1 d	2,11±	0,17	1,65±	0,22	1,33±	0,15
3 d	2,11±	0,13	1,64±	0,18	1,37±	0,03
5 d	2,34±	0,58	1,65±	0,12		
10 d	2,65±	0,35	1,80±	0,19		
50 d	2,29±	0,19				

III.5.2.4 Molmasse im Peakmaximum (Mp), HES in der Leber

Nach Infusion hatten die Molmassenverteilungen Teilweise nicht nur ein Peakmaximum aufzuweisen, sondern bildeten einen Sattel und einen zweiten maximalen Wendepunkt aus. Die einzelnen Werte und die Anzahl der Peaks sind aus Tab. III- 7 zu ersehen.

Tab.III- 7: Mp, Ausgangswerte der HES-Präparate und der HES aus der Leber nach Infusion von 18 ml 6%iger HES. Darstellung des Mittelwertes \pm SD.

Mp in der Leber		Peak 1		Peak 2	
HES 450/0,7 infundierte HES		482.480 \pm	18.965		
0d	nach Infusion	63.263 \pm	4.218	3.120 \pm	378
1d		54.921 \pm	1.057	4.083 \pm	671
3d		59.256 \pm	1.355	2.948 \pm	160
5d		60.303 \pm	3.616	2.436 \pm	1.137
10d		63.569 \pm	1.502	3.157 \pm	348
50d		65.047 \pm	1.476	3.570 \pm	467
HES 200/05 infundierte HES		126.210 \pm	7.567		
0d	nach Infusion	24.211 \pm	1.437	3.731 \pm	421
1d		31.116 \pm	2.510	4.313 \pm	1.375
3d		32.074 \pm	1.253	4.536 \pm	1.830
5d		32.549 \pm	1.410	4.665 \pm	880
10d		31.712 \pm	2.045	3.311 \pm	101
HES 130/0,4 infundierte HES		68.247 \pm	914		
0d	nach Infusion	29.779 \pm	1.951	5.685 \pm	1.275
1d		34.356 \pm	4.750	6.804	
3d		34.637 \pm	1.014	6.065 \pm	556

Wie beim Mw derselben Molmassenverteilungen der HES aus der Leber war der Unterschied des Mp (Peak1) nach Infusion von HES 450/0,7 ebenfalls signifikant größer als nach Infusion von HES 200/0,5 und HES 130/0,4. Dabei waren die Änderungen im Verlauf jeweils gering, nur an Tag 1 (HES 450/0,7) bzw. an Tag 0 (HES 200/0,5 und HES 130/0,4) waren die Werte vergleichsweise niedrig.

III.5.3 Molmassenverteilung in der Milz

Im Gegensatz zu Extrakten aus der Leber erwies sich die Abtrennung der Hydroxyethylstärke von Glykogen in Extrakten aus der Milz als nicht so problematisch. Bei den Leerwerten waren nach Probenaufarbeitung keine Verunreinigungen mit der SEC-MALLS-HPLC zu messen.

Nach Infusion von HES 450/0,7 war auch in Extrakten der Milz bis 50 Tage nach Infusion gespeicherte HES nachzuweisen. Direkt nach Infusion war jedoch im Gegensatz zu den Werten aus den Extrakten der Leber noch nicht in jeder Probe bereits HES aufzufinden (0 d: n = 5).

Unmittelbar nach Infusion von HES 200/0,5 war in keiner Milzprobe der Versuchsgruppe HES nachzuweisen. Bei späterer Organentnahme, 1, 3, 5 und 10 Tage nach Infusion von HES 200/0,5 war in den Milzen vereinzelt (1 d: n = 2; 3 d: n = 2; 5 d: n = 3; 10 d: n = 1) HES in einer Konzentration gespeichert, welche die Ermittlung der Molmassenverteilung ermöglichte.

Während hochmolekulare, hochsubstituierte HES 450/0,7 von Tag 0 bis Tag 50 in der Milz zu finden war, war die mittelmolekulare, mittelsubstituierte HES 200/0,5 in später entnommenen Proben nur vereinzelt nachweisbar. Nach HES Infusion von 130/0,4 war schließlich in keiner der entnommenen Milzen gespeicherte HES nachweisbar.

III.5.3.1 Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw), HES in der Milz

Der Gewichtsmittelwert der in der Milz nach Infusion gespeicherten Hydroxyethylstärke lässt sich aus Abb.III- 12 ablesen. HES 200/0,5 war direkt nach Infusion noch nicht in der Milz vorhanden.

Das Mw stieg nach Infusion von HES 450/0,7 im Verlauf von Tag null bis Tag 50 kontinuierlich ($B = 0,9858$, linear) von 148.220 ± 32.387 auf 229.617 ± 21.846 an. Ab Tag 5 nach Infusion war das Mw mit 188.107 ± 22.121 auch signifikant ($p = 0,03$) höher als das Mw direkt nach Infusion.

Nach Infusion von HES 200/0,5 änderten sich die an Tag 1 bis 10 nach Infusion erhaltenen Werte nicht signifikant, ein kontinuierlicher Anstieg wie nach Infusion von HES 450/0,7 konnte nicht beobachtet werden.

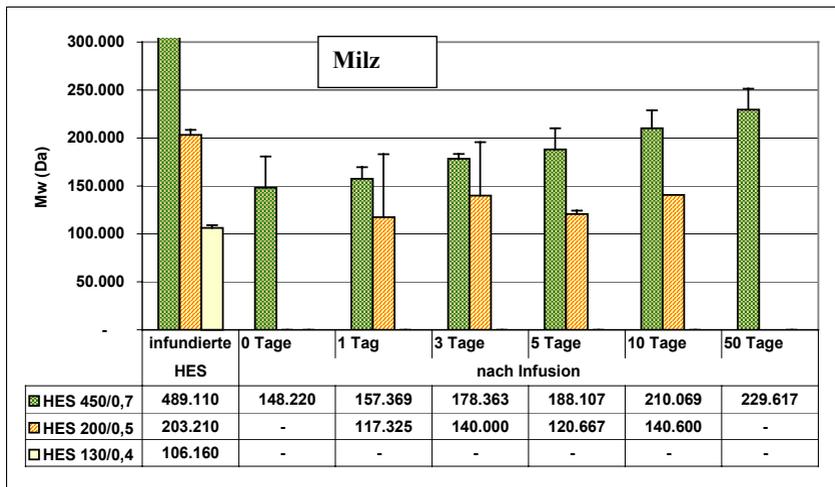


Abb.III- 12: Mw der aus den am Versuchsende entnommenen Milzen ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.

III.5.3.2 Zahlenmittelwert der Molmassen (Mn), HES in der Milz

Der Zahlenmittelwert der Molmassen in der Milz gespeicherter Hydroxyethylstärke ist in Abb.III- 13 aufgeführt.

Nachdem das Mn nach Infusion von HES 450/0,7 von Tag 0 auf Tag 1 anfänglich abgesunken war, nahm der Zahlenmittelwert anschließend ebenso wie das Mw kontinuierlich linear zu ($B = 0,9476$). Ab Tag fünf war die Änderung im Vergleich zu Tag 1 signifikant ($p < 0,001$).

Nach Infusion von HES 200/0,5 war wie beim Mw keine Tendenz zum zeitlichen Verlauf der in der Milz gespeicherte HES erkennbar.

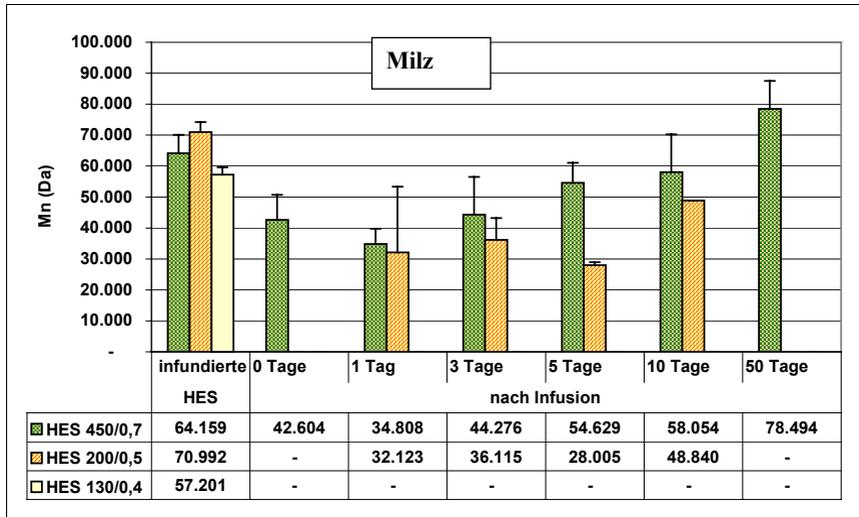


Abb.III- 13: Mn der aus den am Versuchsende entnommenen Milzen ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.

III.5.3.3 Polydispersität, HES in der Milz

Die Polydispersitätsquotienten M_w/M_n der HES aus den Milzproben sind in Abb.III- 14 aufgeführt. Nach Infusion von HES 200/0,5 war M_w/M_n an Tag 1 die Molmassenverteilung der aus der Milz extrahierten HES bei einem zu messenden Wert 1,5 und bei dem anderen 9,56. M_w/M_n des an Tag 10 nach Infusion von HES 200/0,5 ermittelten einzelnen Wertes lag bei 2,88.

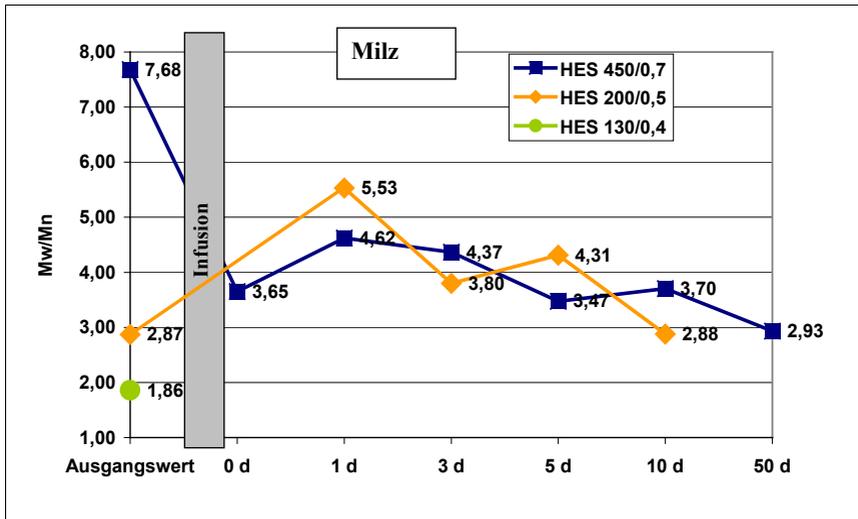


Abb.III- 14: Verlauf des Polydispersitätsquotienten der HES aus der Milz. Ausgangswert und M_w/M_n der Molmassenverteilung direkt nach und an den Tagen 1, 3, 5, 10 und 50 nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4.

Nach Infusion von HES 450/0,7 verringerte M_w/M_n der HES aus der Milz nach anfänglichem Wiederanstieg von Tag 1 bis Tag 50 nach Infusion. Die Änderung von Tag 1 auf Tag 50 war statistisch signifikant.

M_w/M_n wurde nach Infusion von HES 200/0,5 im Laufe der Zeit zwar kleiner, was auf eine Verengung der Molmassenverteilung hindeutet, lag bei den letzten Messungen aber immer noch über dem Wert der verabreichten HES.

III.5.3.4 Molmasse im Peakmaximum (Mp), HES in der Milz

Nach Applikation von HES 450/0,7 war die Molmassenverteilung der HES in der Milz an Tag 10 nach Infusion zweigipflig. Jeweils bei einer der Proben an Tag 5 und Tag 50 ergab sich ebenfalls ein zweigipfliger Kurvenverlauf, wobei die anderen Molmassenverteilungen eine Verbreiterung mit flachem Kurvenverlauf auf Höhe dieser Wendepunkte aufzeigen. Das Peakmaximum fiel nach Infusion von HES 450/0,7 bis Tag 1 wie das Mn leicht ab und stieg anschließend signifikant an ($p < 0,01$). Als sich das zweite Peakmaximum ausbildete, lag dieses in einem Bereich mit mehr als doppelt so hoher Molmasse als der Peak 1. Der Später ausgebildete hochmolekulare Peak 2 änderte sich nicht mehr signifikant.

Die Konzentration der gespeicherten HES war nach Infusion der mittelmolekularen, mittelsubstituierten HES 200/0,5 niedrig, häufig konnte keine HES nachgewiesen werden. Pro Gruppe war maximal in drei Milzproben gespeicherte HES nachweisbar. Die Mittelwerte des Mp lassen sich Tab.III- 8 entnehmen.

Tab.III- 8: Mp, Ausgangswerte der HES-Präparate und der HES aus der Milz nach Infusion von 18 mL 6%iger HES. Darstellung des Mittelwertes \pm SD.

Mp in der Milz	Peak 1	Peak 2
HES 450/0,7 infundierte HES	482.480 \pm 18.965	
0d	75.619 \pm 10.437	
1d	71.138 \pm 4.299	
3d	80.725 \pm 2.690	
5d	88.892 \pm 4.488	283.450
10d	102.100 \pm 8.805	272.030 \pm 24.159
50d	114.200	269.900 \pm 16.199
HES 200/0,5 infundierte HES	126.210 \pm 7.567	
0d		
1d	49.950 \pm 7.227	
3d	56.445 \pm 16.016	
5d	69.882 \pm 5.718	
10d	65.450 \pm	
HES 130/0,4 infundierte HES	68.247 \pm 914	
HES nach Infusion von HES 130/0,4 unter der Nachweisgrenze		

III.5.4 Molmassenverteilung in Serum, Leber und Milz im Vergleich

III.5.4.1 Serum-, Leber- und Milz-Werte nach Infusion von HES 450/0,7

Der Vergleich des Gewichtsmittelwert der Molmassen (Mw) unter den einzelnen Organen und dem Plasmaverteilungsraum nach Infusion von HES 450/0,7 ergibt die in Abb.III.- 15 zu sehenden p-Werte.

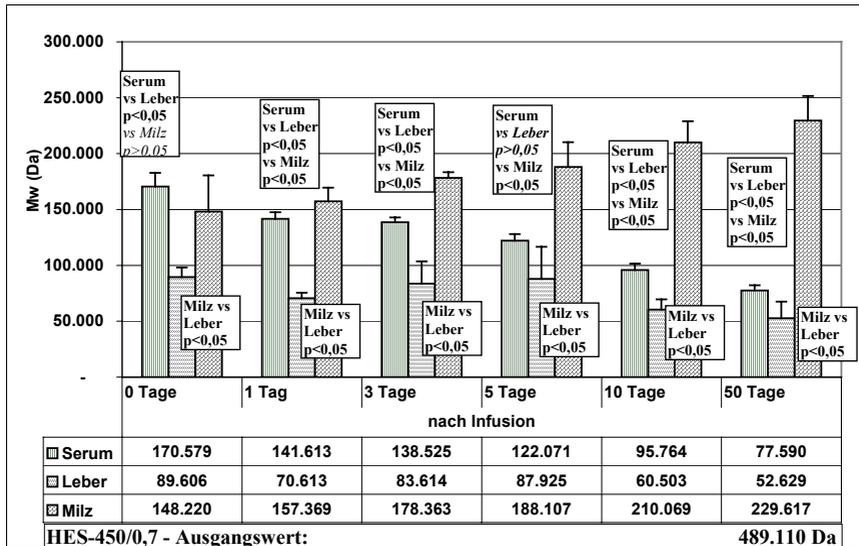


Abb.III.- 15: Vergleich des Mw der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7.

Dabei fällt auf, dass die Werte aus den einzelnen Geweben nahezu keine Gemeinsamkeiten hatten, obwohl Leber und Milz über den Plasmaverteilungsraum dieselbe HES aus dem Serum zur Verfügung steht. Auch wenn das Mw der Leber, welches unter Ausschluss der niedermolekularen Anteile ermittelt wurde, zur statistischen Auswertung herangezogen wurde, blieb lediglich bei dem Vergleich von Serum und Leber nach 50 Tagen der Unterschied nicht mehr signifikant.

In der folgenden Abb.III.- 16 ist der Vergleich des Mn bei den einzelnen Organen nach Infusion von HES 450/0,7 aufgeführt. Ob der p-Wert unter oder über dem Signifikanzniveau lag ist ebenfalls aufgeführt.

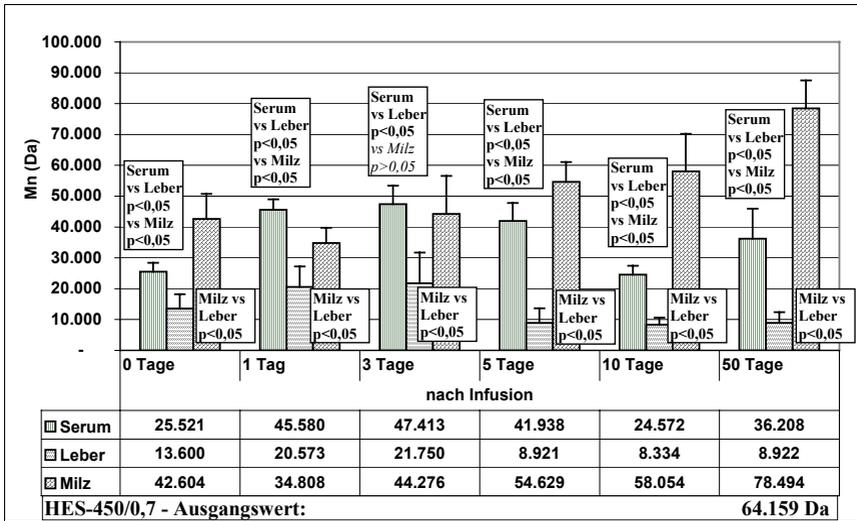


Abb.III- 16: Vergleich des Mn der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7.

Wurde das Mn der Leber unter Ausschluss der niedermolekularen Anteile integriert, war bei dem Vergleich von Serum und Leber nach 3, 5 und 50 Tagen der Unterschied nicht mehr signifikant. Wurde dabei die Leber mit der Milz verglichen, unterschieden sich die Werte bis einschließlich Tag 3 nach Infusion nicht signifikant.

Das Peakmaximum (Mp) war nach Infusion von HES 450/0,7 in der Leber ebenfalls immer signifikant unterschiedlich zu jenem im Serum und der Unterschied des Mp zwischen Leber und Milz war an Tag 0 noch nicht signifikant. Während das Mp im Serum relativ konstant blieb, stieg es in der Milz an. Bis inklusive Tag 5 lag das Peakmaximum in der Milz unter jenem im Serum. Zehn Tage nach Infusion von HES 450/0,7 waren die Werte bei dem Mp des Peak 1 der Milz nicht signifikant vom Mp im Serum zu unterscheiden. Der Peak 2 an Tag 10 und Mp an Tag 50 war das Mp in der Milz dann höher als jenes im Serum.

Die Unterschiede in Serum, Leber und Milz waren deutlich, wobei in der Milz Molmassenverteilungen mit verhältnismäßig großen Molekülen zu finden waren, auch wenn Mw und Mp immer noch unter dem der infundierten HES 450/0,7 lagen. Lediglich der Zahlenmittelwert Mn war an Tag 50 nach Infusion in der Milz

signifikant höher als der HES 450/0,7-Ausgangswert. In der Leber hingegen wurden sehr kleine Werte von Mw, Mn und Mp gemessen.

Auch die Polydispersität als Maß der Breite der Verteilung wies Unterschiede in den verschiedenen Geweben auf. Während der Polydispersitätsquotient nach HES Infusion von 450/0,7 im Serum vor allem zu Beginn rasch kleiner wurde, war er in der Milz direkt nach Infusion bei $3,65 \pm 1,43$ und stieg erst einmal auf ein Maximum von $4,62 \pm 0,91$ an, die Molmassenverteilung wurde breiter.

Anfangs lagen die Molmassenverteilungen noch dicht beieinander, bewegten sich dann aber auseinander. Beispielhaft ist in Abb.III.- 17 die Molmassenverteilung der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES 10 Tage nach Infusion von HES 450/0,7 dargestellt.

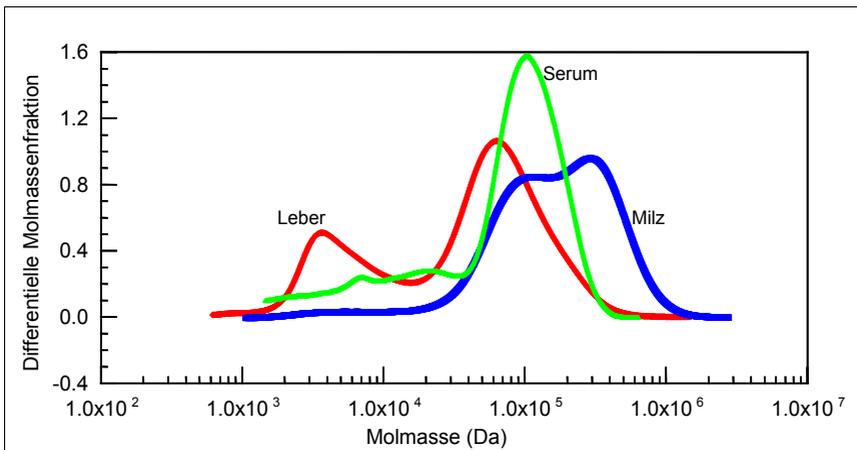


Abb.III- 17: Molmassenverteilungen der HES aus Serum, Leber und Milz bei einer Ratte 10 Tage nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7 in halblogarithmischer Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung.

III.5.4.2 Serum-, Leber- und Milz-Werte nach Infusion von HES 200/0,5

In Abb.III- 18 sind die Gewichtsmittelwerte der Molmassen (Mw) nach Infusion von HES 200/0,5 und die p-Werte nach statistischen Vergleich des Mw von Serum und Leber aufgeführt.

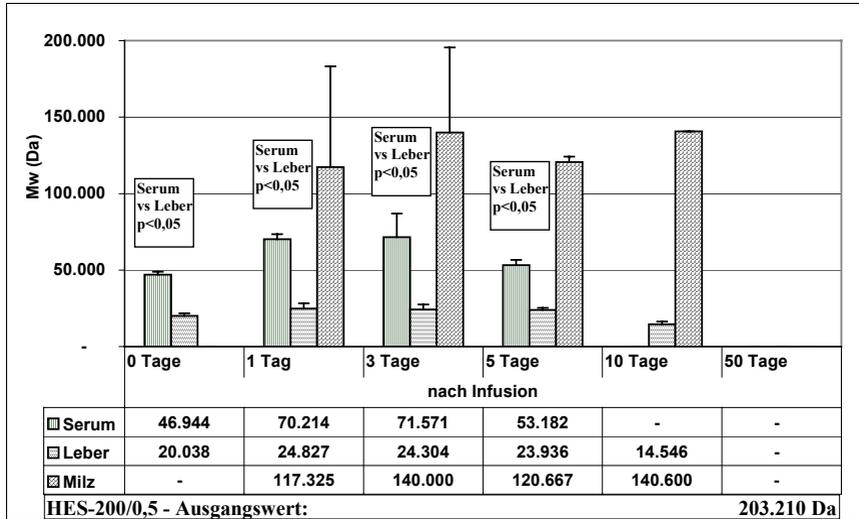


Abb.III- 18: Vergleich des Mw der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 200/0,5.

In der Milz wurde nur eine geringe Menge HES nach Infusion der mittelmolekularen, mittelsubstituierten HES gespeichert, in den meisten Milzproben wurde keine HES nachgewiesen. Die Anzahl der ermittelten Werte war daher bei den Milzproben zu gering (≤ 3) um statistische Tests durchzuführen. Aus der Graphik lässt sich jedoch zumindest im Gegensatz zu der Leber ein tendenziell größeres Mw der in der Milz gespeicherten HES -Fraktionen vermuten.

In der folgenden Abb.III-19 sind die Zahlenmittelwerte der Molmassen (Mn) nach Infusion von HES 200/0,5 aufgeführt.

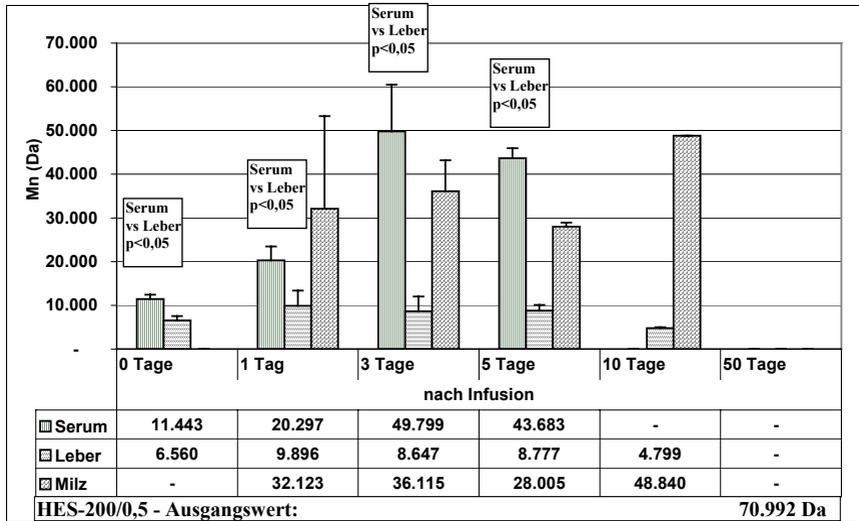


Abb.III- 19: Vergleich des Mn der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 200/0,5.

Auch wenn das Mn der Leber, welches unter Ausschluss der niedermolekularen Anteile ermittelt wurde, zur statistischen Auswertung herangezogen wird, war lediglich bei dem Vergleich von Serum und Leber einen Tag nach Infusion der Unterschied nicht signifikant.

Nach Infusion von HES 200/0,5 war das Mw in der Milz immer größer als im Serum oder in der Leber. Im Gegensatz dazu war bei Betrachtung des Mn der Wert im Serum teilweise größer als jener in der Milz.

Das Mp der Milz lag nach Infusion von HES 200/0,5 abgesehen von Tag 1 nach Infusion immer am höchsten. An Tag 1 nach Infusion lag das Mp aus dem Serum noch darüber. Das Mp der HES aus der Leber lag außer bei den Werten von Tag 3 immer signifikant unter dem Mp der HES aus dem Serum.

Wie nach Infusion einer HES 450/0,7 lag auch nach Infusion einer HES 200/0,5 der Gewichtsmittelwert der Molmassen bei den aus der Milz isolierten Proben über der HES aus dem Serum und die Werte aus der Leber waren immer die niedrigsten. In der Leber waren auch beim Mn und Mp die niedrigsten Werte zu finden.

Der Polydispersitätsquotient M_w/M_n nach Infusion von HES 200/0,5 ist in Abb.III- 20 dargestellt.

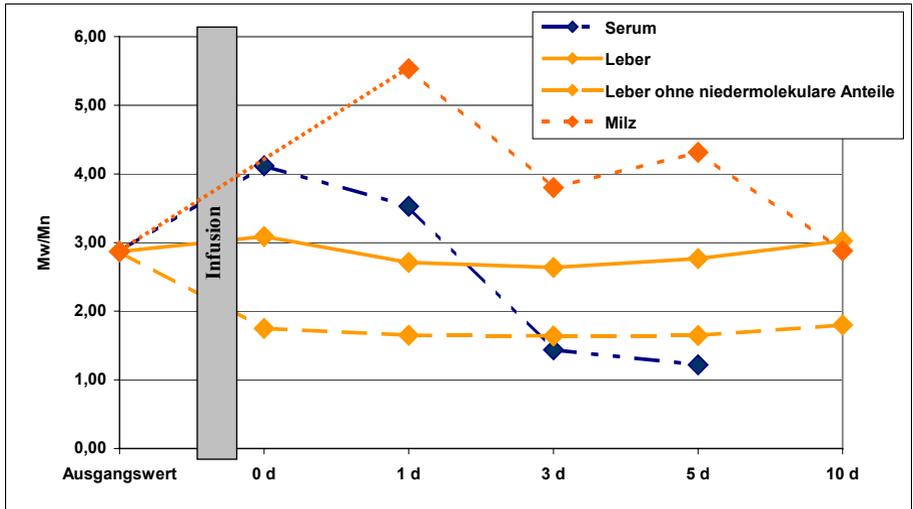


Abb.III- 20: Vergleich der Polydispersitätsquotienten der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 200/0,5.

III.5.4.3 Serum-, Leber- und Milz-Werte nach HES Infusion von 130/0,4

In Abb.III- 21 sind die Gewichtsmittelwerte der Molmassen (Mw) nach Infusion von HES 130/0,4 mit den p-Werten nach statistischem Vergleich des Mw von Serum, Milz und Leber aufgeführt.

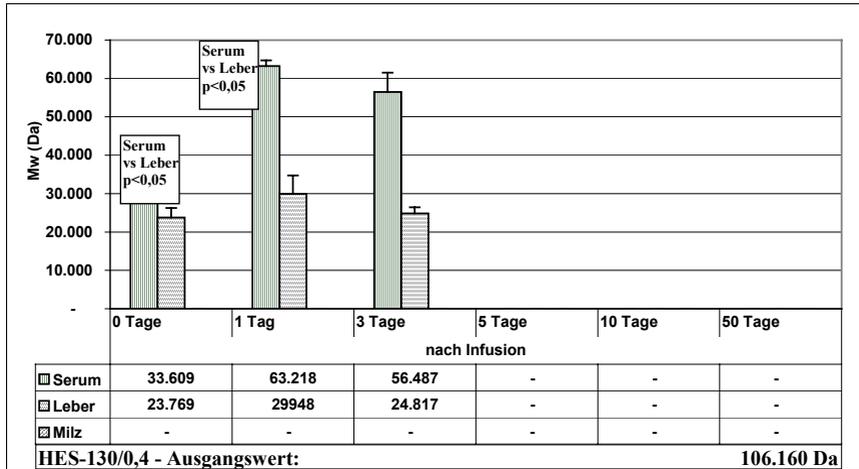


Abb.III- 21: Vergleich des Mw der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 130/0,4.

Am Tag 3 nach Infusion war die Anzahl der Werte bei den Leberproben zu gering um statistische Tests durchzuführen (n=3), bei 5 Tieren war keine HES mehr in der Leber nachweisbar. Aus der Graphik lässt sich jedoch ein tendenziell größeres Mw im Serum ablesen.

Die Konzentration der HES nach Infusion von HES 130/0,4 in der Milz war zumindest so gering, dass mit der angewandten Methode keine HES nachgewiesen werden konnte.

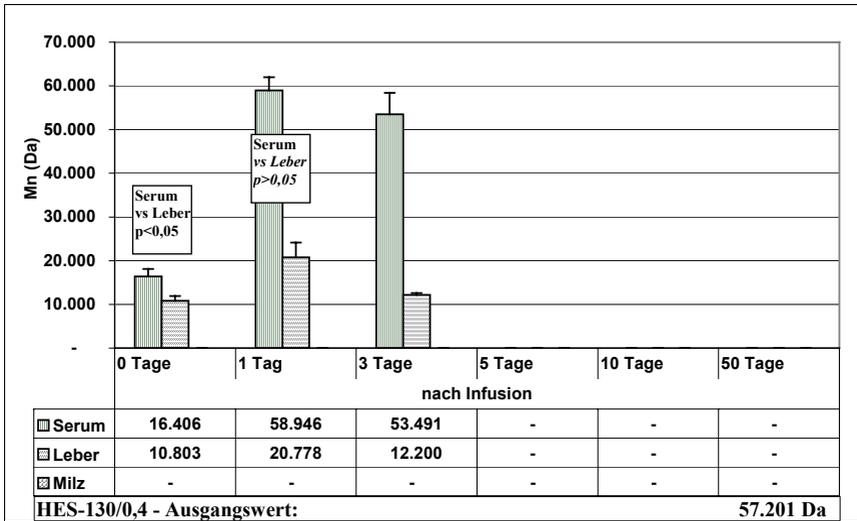


Abb.III- 22: Vergleich des Mn der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 130/0,4.

In Abb.III- 22 wurden die Zahlenmittelwerte von Serum und Leber nach Infusion von HES 130/0,4 dargestellt.

Bei Vergleichen des Mp der HES aus Serum und Leber nach Infusion von niedermolekularer, niedrigsubstituierter HES 130/0,4 war das Mp wie das Mw und das Mn nach Infusion von HES 130/0,4 ebenfalls im Serum höher ($p > 0,05$ an Tag 0) als in der Leber.

Der Polydispersitätsquotient war sowohl im Serum an Tag 1 und 3, und in der Leber an Tag 1 nach Infusion sehr niedrig, sehr eng verteilte HES lag vor.

IV Diskussion

IV.1 Tierversuchsmodell und klinische Beobachtungen

Seit vielen Jahren werden Ratten als Versuchstiere für intravenöse Infusionsmodelle eingesetzt. Dafür entwickelte verschiedene Kathetersysteme werden in die Jugularvene [126, 127] oder in die Femoralvene [128] implantiert. Die Anwendung der Infusionsmodelle erfolgt zumeist zur Infusion geringer Mengen. Ausnahmen bildeten dazu in den letzten Jahren Untersuchungen zum Volumenersatz mit verschiedenen kolloidalen Lösungen [129, 130, 131, 132]. In früheren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurden ebenfalls mehrfach größere Infusionsvolumina bei Ratten intravenös infundiert [72, 78, 86].

In dem vorliegenden Versuchsvorhaben war es erforderlich, ein relativ großes Flüssigkeitsvolumen von 18 mL zu verabreichen. Das Infusionsvolumen entsprechend 5-6 g Hydroxyethylstärke /kg Körpergewicht ist relativ hoch gewählt. Die Dosis wurde ursprünglich gewählt [86], um trotz der im Vergleich zum Menschen erhöhten Amylaseaktivität bei den Ratten eine adäquate Serumkonzentration mit Speicherung von HES zu erreichen. Der auch mit den bisherigen quantitativen Untersuchungen zur Speicherung von HES vergleichbare Studienaufbau wurde beibehalten. Ein Zugang über die Jugularvene war dabei von Vorteil, da er sich einfacher durchführen lässt als ein Zugang über die Femoralvene.

Für Blutentnahmen bei Ratten stehen bei der Menge von je 0,5 mL die Entnahme aus dem Katheter, die retrobulbäre Blutentnahme und die Entnahme durch perkutane Punktion der Vena subclavia zur Auswahl. Die Abnahme aus dem Jugulariskatheter wird auch für Blutentnahmen im Laufe mehrerer Tage beschrieben [133], allerdings ist die langfristige Implantation und Pflege des Katheters aufwändig. Aus diesem Grund wurde nur die Blutentnahme vor und unmittelbar nach Infusion aus dem Katheter vorgenommen – eine Abnahme aus dem Infusionskatheter ist beim Menschen ebenfalls üblich. Alle weiteren Blutentnahmen erfolgten aus dem retrobulbären Venenplexus. Damit war eine zuverlässige Blutgewinnung möglich. Bei

sachgerechter Durchführung treten keine wesentlichen Schädigungen des Auges oder Beeinträchtigungen des Wohlbefindens der Tiere auf [134, 135].

Zu der auch in der Versuchstierkunde üblichen Anästhesieform mit Ketamin und Xylazin [136] wurde zur Vertiefung und Verlängerung der Anästhesie das Hypnotikum Midazolam hinzugegeben. Die Narkose wurde von den Tieren gut vertragen. Nur ein Tier verstarb in direktem Zusammenhang mit der Nachdosierung der Anästhesie. Bei den für die Blutentnahmen vorgesehenen Betäubungen sind mehrere Ratten (5 Tiere = 3,5%) verstorben. Durch die wiederholten Blutentnahmen innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes (48 h) bei nachlassender Wirkung des Volumenersatzmittels hatte sich die Kreislaufsituation der Versuchstiere verschlechtert. Damit sind die Narkosezwischenfälle zu erklären, auch wenn die verwendeten Inhalationsanästhetika als potente Anästhetika beschrieben sind [136]. Beeinträchtigungen der Atmung können bei Anwendung von Isofluran auch infolge Speichelsekretion, Husten, Laryngo- und Bronchospasmus hervorgerufen werden [137].

Männliche Wistar-Ratten haben laut Ringler und Dabich [138] ein Blutgesamtvolumen von nur $3,88 \pm 0,08$ mL/100 g Körpergewicht (sonst bei Ratten mit 5-7 mL/100 g angegeben), das Blutabnahmevolumen ist daher begrenzt. Die Blutabnahmen mit Nachweis der Hämodilution wurden vorgenommen um sicherzustellen, dass die Infusion gelungen war. Wie durch den Abfall des Hämatokrit und des Hämoglobin dokumentiert, war die Hämodilution bei den Experimenten erfolgreich. Am stärksten und längsten war die Hämodilution nach Infusion der hochsubstituierten HES 450/0,7 ausgeprägt (siehe Abb.III- 1 und Abb.III- 2), welches auch die längste Halbwertszeit hat [72]. Für jede Probe wurden ca. 0,5 mL Blut entnommen. Bei vier Blutentnahmen am Infusionstag und nochmals jeweils 0,5 mL an den beiden Folgetagen entsprach dies insgesamt 3,0 mL abgenommenen Blutes. Dadurch wurde die spätere Abnahme des HKT und Hb nach 24 und 48 Stunden bedingt.

Am Versuchsende wurden die Organproben zur Bestimmung der Molmassenverteilung der gespeicherten HES nach Entbluten der Tiere entnommen. Für die letzte Blutentnahme bot sich die Aorta abdominalis an. Zur Konservierung der Organ- und Serumproben gilt als wichtig die Enzymaktivität zu minimieren. Zwar vermindern die

Substituenten der HES die Hydrolysegeschwindigkeit durch α -Amylase [69], vollständig verhindert wird die Hydrolyse allerdings nicht. Bei -20°C ist die Enzymaktivität weitestgehend aufgehoben. Gegen weitere Einflüsse ist HES relativ stabil.

Bisherige Untersuchungen zur Organspeicherung der HES beim Menschen und bei der Ratte weisen darauf hin, dass die Ergebnisse vergleichbar sind. Bei dem verwendeten Tierstamm (Wistar WU) handelt es sich um Auszuchttratten, welche in ihrer genetischen Vielfalt einer menschlichen Population vergleichbar sind.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe Förster deuten auch auf eine niedrigere Nierenschwelle für HES bei Ratten als beim Menschen hin. Allerdings zeigen Untersuchungen beim Menschen und an diesem Tiermodell, dass die Pharmakokinetik von HES auch trotz extremer Unterschiede in der Amylaseaktivität (siehe Tab.I.- 1) vergleichbar ist [62, 72]. Bei Leberbiopsien am Menschen nach Infusion von HES wurden mit verschiedenen Spezies, unter anderem Ratten, weitgehend übereinstimmende Befunde zur vakuolären Speicherung von HES erhoben [65, 84, 89]. Bei dem verwendeten Tiermodell liegen zahlreiche Vergleichsuntersuchungen zur Elimination und Speicherung von HES vor.

IV.2 Molmassenverteilung der HES

IV.2.1 Methodenentwicklung zur Molmassenbestimmung der HES

Die Bestimmung der Molmassenverteilung von Hydroxyethylstärke im Serum ist etabliert [139]. Die zur HES- und zur Dextranbestimmung verwendete Methode nutzt das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten der Plasmaproteine und der zugesetzten künstlichen Stärkepolymere. Nach dem Abzentrifugieren der festen Blutbestandteile folgt die saure Denaturierung der den Nachweis störenden Plasmaeiproteine mit Perchlorsäure oder mit Trichloressigsäure. Bei der Isolierung der danach noch im Serum gelösten Stärkepolymere wird die schlechte Löslichkeit der Polysaccharide in organischen Lösungsmitteln ausgenutzt. Mit absolutem Aceton oder mit absolutem Alkohol können die Polysaccharide auch nach chemischer Modifizierung quantitativ ausgefällt werden [86].

Die Messung der Lichtstreuung wird in letzter Zeit als die wichtigste Methode erkannt, um makromolekulare und supramolekulare Strukturen zu bestimmen. Mit der statischen Lichtstreuung kann die molare Masse M_w eines Makromoleküls in Lösung bestimmt werden [140]. Bei früheren Bestimmungen von Ferber et al. [141] bestanden noch Probleme in der Vergleichbarkeit der Analytik von Molmassen zwischen verschiedenen Laboren, da die Ergebnisse um mehr als 100% von den Herstellerangaben abwichen. Auch von Sommermeyer et al. [40] wurde auf diese Problematik hingewiesen und beim Vergleich zweier Methoden (LALLS-GPC versus GPC) Abweichungen von ~ 30% als befriedigende Übereinstimmung hingenommen.

Von Förster [96] wurde aufgrund praktischer Erfahrungen eine generell kritische Haltung gegenüber der uneinheitlichen Methodik bei Molmassenbestimmung durch verschiedene Laboratorien angenommen. Die Verbesserung der Methodik durch die MALLS-GPC und die Standardisierung der Laboratorien hat dazu beigetragen, dass die analytischen Probleme aktuell keine größere Bedeutung mehr besitzen. Die standardisierte Methode der HPLC-SEC-MALLS-Kopplung ist für die direkte Messung von HES-, Pollulan- und Dextran-Molmassenverteilungen in wässrigen Lösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 1,0 g/L bis 10,0 g/L ohne weitere Probenvorbereitung anwendbar [139, 142].

Der Nachweis des Verbleibs von parenteral verabreichten körperfremden Substanzen ist eine wichtige Voraussetzung für die Beurteilung der Ungefährlichkeit der Präparate. Es ist unbestritten, dass ein erheblicher Teil (zwischen 40% und 70%) der als Volumenersatzmittel verwendeten Kohlenhydrate nicht im Harn erfasst werden kann. Bereits frühzeitig wurde der Verbleib der Hydroxyethylstärke unter Verwendung von radioaktiv markierter HES untersucht [65, 143]. Elektronen- und lichtmikroskopisch nachgewiesene Veränderungen im Lebergewebe (Vakuolenbildung) sind nicht spezifisch für die exogenen Polysaccharide. Die PAS-Reaktion [144] erlaubt die Darstellung der PAS-positiven Substanzen Glycogen, HES und Dextran. Erste Untersuchungen zur Bestimmung der Konzentration der HES in der Leber erfolgten durch immunologische Nachweisverfahren, deren Spezifität jedoch umstritten ist [66, 145, 146].

Von Wikarczyk (1981) wurde erstmals die unterschiedliche Löslichkeit von HES und Glycogen in verdünntem Alkohol für die HES-Bestimmung genutzt. Nach Abtrennen der Proteine wird dabei eine Differentialfällung zwischen HES und Glycogen vorgenommen [86].

Diese Methode der Differentialfällung wurde als Grundlage für die Isolierung der HES gegen Glycogen aus den Organen herangezogen. Es musste festgestellt werden, dass die Differentialfällung zwar für Konzentrationsbestimmungen im Organ unter Verwendung eines Standards aus HES und Glycogen geeignet ist, jedoch war in der Molmassenverteilung keine exakte Reproduktion der zugefügten HES zu erreichen.

Mit der von uns durchgeführten Aufarbeitung für Organe konnte in der Leber nicht immer ein exakter Nullwert bei der SEC-MALLS-HPLC ermittelt werden, jedoch ist bei höheren Konzentrationen von HES eine zuverlässige Reproduktion der Molmassenverteilung möglich. Die Messungen von Verunreinigungen der Leerwerte ergab dabei stets relativ niedrige Molmassen. Es ist anzunehmen, dass miterfasstes Glycogen zu einer Ausweitung der Molmassenverteilung im niedermolekularen Bereich führte (s. Abb.III- 7). M_w und M_n verringern sich daher bei schlechter Trennung. Besonders betroffen davon ist M_n , welches bei starker Verunreinigung bis in den dreistelligen Bereich absinken kann. Bei der Berechnung des M_n gehen niedermolekulare Anteile stärker ein als bei der Berechnung des M_w . Deshalb wurden die Kalkulationen von M_w und M_n der Leberproben zusätzlich unter Ausschluss dieser niedermolekularen Anteile vorgenommen (s. Abb.III- 8). Verwendet man für die Kalkulation der Molmassenverteilung nur den höhermolekularen Anteil der aus der Leber gewonnenen Substanz, wirkt sich dies auch deutlicher auf M_n aus als auf M_w . Dabei steigt M_n auch über den Wert der Ausgangslösungen an. In dem Bereich zwischen den Werten der zwei Auswertungen liegen die tatsächlichen Werte von M_n und M_w . Eine Verbesserung der Methode könnte durch ein Nüchternsetzen der Ratten 12-24 Stunden vor Versuchsende erreicht werden, da hierdurch die Glycogenkonzentration in der Leber zuverlässig minimiert werden kann.

Inwiefern die aus den Leberproben ermittelten Molmassenverteilungen mit Ausbildung einer zweigipfligen Kurve in der differentiellen Molmassenverteilung tatsächlich der gespeicherten HES entspricht, ist kritisch zu betrachten. Der niedermolekulare Anteil wurde mutmaßlich durch Glycogen hervorgerufen. Dafür, dass in der in der Leber tatsächlich HES mit zwei Erhebungen im Kurvenverlauf gespeichert wurde spricht aber, dass bei der aus dem Serum und der Milz bestimmten HES zum Teil ebenfalls eine Sattelform mit zwei Erhebungen in der differentiellen Molmassenverteilung aufzufinden war. Bei Untersuchungen von Warnken [142] wurde ebenfalls die Herausbildung eines Sattelpunktes in den differentiellen Molmassenverteilungen nach Inkubation eines anderen kolloidalen Volumenersatzmittels auf Stärkebasis, der Acetylstärke, mit α -Amylase beschrieben. Ein zeitabhängiger Anstieg der niedermolekularen Fraktion wurde festgestellt. Nach 24 h war in diesen Untersuchungen ein neuer Peak bei etwa 1000 Da aufzufinden.

IV.2.2 HES in Serum, Leber und Milz

Die Elimination von Hydroxyethylstärke aus dem Serum ist abhängig von der Substitution. Dabei hat hochsubstituierte HES eine längere Halbwertszeit als niedrigsubstituierte HES [62, 72]. Die Amylaseaktivität im Serum wurde ursprünglich mit dem Abbau infundierter HES in Verbindung gebracht. Durch die Vermehrung der Teilchenzahl bei der enzymatischen Degradation sollte sich der von der Zahl der Teilchen abhängige onkotische Druck erhöhen [147, 148]. Dabei sollen schließlich nierengängige Bruchstücke entstehen. Der von Köhler [147] aus diesem propagierten Mechanismus abgeleitete Volumenzweiteffekt erwies sich jedoch in Untersuchungsreihen bei Verwendung sehr unterschiedlicher HES-Präparate als nicht reproduzierbar [76].

Die Amylaseaktivität im Serum spielt nach neueren Untersuchungen [78] und nach theoretischen Überlegungen nicht die Rolle für die Elimination von HES wie bisher angenommen. Es ist fraglich, ob dieses Enzym unter diesen Bedingungen überhaupt aktiv sein kann. Bei Mehrfachapplikation von HES steigt die Amylaseaktivität deutlich an, während die Eliminationshalbwertszeit von HES von Tag zu Tag länger wird [77]. Der Anstieg der Serumamylaseaktivität nach Infusion

von HES ist seit langem bekannt und wird mit einer sogenannten „Makroamylasämie“ erklärt, wobei sich Amylase und ihr Substrat (HES) zu einem Komplex verbinden [74, 149]. Der HES-Amylase-Komplex könnte darüber hinausgehend als Beispiel einer kompetitiven Hemmung angesehen werden. Die dem Substrat Glycogen ähnliche HES wird zwar an das Enzym gebunden, kann jedoch nicht hydrolysiert werden. Damit würden geringe Aktivitäten von Amylase gebunden werden [38].

Als wesentlicher Einwand gegen die Bedeutung von Amylase im Serum für die Elimination von HES aus dem Plasmaverteilungsraum ist die weitgehend identische Eliminationsgeschwindigkeit bei extrem unterschiedlicher Aktivität von Amylase bei unterschiedlichen Tierspezies zu sehen (s. Tab.I- 1). In Einzelfällen konnte festgestellt werden, dass bei Patienten mit Pankreatitis und außerordentlich hoher Serumamylaseaktivität keine Beschleunigung der HES-Elimination vorhanden ist [77]. Es ist dementsprechend unwahrscheinlich, dass die intravasale Hydrolyse der HES von wesentlicher Bedeutung für die Elimination von HES ist. Vielmehr scheint bei der Elimination von HES aus dem Plasmaverteilungsraum neben der renalen Elimination die Aufnahme in die Organe eine Rolle zu spielen [65, 84, 86, 94]. Speicherungsphänomene wurden vorwiegend in den Zellen des RES beobachtet [85, 89].

An der Elimination makromolekularer Substanzen wie HES aus dem Serum sind somit zwei Wege beteiligt: Die Ausscheidung der niedermolekularen Anteile über die Niere und die intrazelluläre Speicherung. HES ist ein Fremdkörper für den Organismus und wird als solcher zumindest teilweise über das RES entsorgt. Insofern ist die Speicherung von HES und von Dextran sowie von Gelatinederivaten im RES aus physiologischen Gründen zu erwarten. Von Förster und Asskali [77] wurde angenommen, dass in größerem Umfang niedermolekulare und hochsubstituierte Hydroxyethyloligosaccharide gebildet werden, welche enzymatisch nicht weiter abgebaut werden können und daher ebenfalls renal ausgeschieden werden. Ein intrazellulärer Abbau könnte durch lysosomale Enzyme wie der oligo-1,6-Glucosidase – auch bekannt als Isomaltase – und durch α -Glykosidasen erfolgen.

Neben den noch offenen Fragen zum Metabolismus der HES wurde durch Organspeicherung der HES in einigen Untersuchungen an Patienten eine Überladung

des RES vermutet [97]. In anderen Untersuchungen wurde eine Verschlechterung der Leberfunktion von Patienten infolge Obstruktionen durch Speicherung von HES nach Infusion diskutiert [87, 109, 110]. Dabei wurde das Krankheitsbild durch HES aggraviert. In einer der Fallbeschreibung von Pfeifer et al. [87] nachfolgenden Veröffentlichung wurde vermutet, dass wie nach Applikation von freiem Hämoglobin (nach Vergrößerung des Moleküls durch Polymerisation war im Tierversuch kein Hb mehr in Leberparenchymzellen aufzufinden) niedermolekulare HES in die Leberparenchymzellen gelangt [38].

Nach den bisherigen Erkenntnissen zur Speicherung der Hydroxyethylstärke in Organen stellten sich folgenden Fragen:

Kann die Hypothese, dass HES durch lysosomale Enzyme abgebaut wird untermauert werden und ist es möglich, die Sicherheit des kolloidalen Volumenersatzmittels HES für die Anwendung am Patienten durch gezielte Verwendung bestimmter HES - Fraktionen zu verbessern?

Um diese Fragen zu beantworten war es zum einen Ziel der Untersuchung herauszufinden, welche HES-Polymerfraktionen in Abhängigkeit der molaren Substitution und der Molmassenverteilung der Ausgangssubstanz vorwiegend gespeichert werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine zeitabhängige Änderung der Molmassenverteilung der gespeicherten HES eintritt.

In den vorgelegten Untersuchungen zur Molmassenverteilung der gespeicherten HES konnte festgestellt werden, dass in der Leber wie bereits von Förster [38] vermutet niedermolekulare HES gespeichert wird (s. Abb.III- 8 und - 10 bzw. Tab.III- 4, -5 und - 7). In der Milz wird hingegen die dort gespeicherte hochmolekulare HES langfristig angereichert (s. Abb.- 12 und - 13 bzw. Tab.III- 8), eine Molgewichtszunahme im Sinne einer Synthese aus Fragmenten scheint eher unwahrscheinlich. Vorstellbar wäre zwar ein Aufbau von Polysacchariden im Rahmen der im tierischen Organismus ablaufenden Glycogen-Synthese, dies wäre aber in der Leber in stärkerem Maße als in der Milz zu erwarten.

Die statistisch signifikanten Unterschiede der gespeicherten HES beim Vergleich von Leber und Milz machen es wahrscheinlich, dass der Eintritt in die

Zellen auf unterschiedlichen Mechanismen beruht (s. Abb.III- 15 bis - 19). In die Leberparenchymzellen gelangt die niedermolekulare HES in Konkurrenz zur Ausscheidung über die Nieren ab Beginn der Infusion durch Diffusion, in die Zellen des RES zeitlich verzögert mittels Phagozytose. Die Hepatozyten sind im Gegensatz zu anderen Zellen fenestriert und erlauben vielen Substanzen die freie Diffusion [150]. Von Förster et al. [89] wurden entsprechend auch außerhalb der Kupfferschen Sternzellen nach Infusion Fluorescein-markierter HES 200/0,5 disseminierte Fluoreszenzanreicherung im Bereich von Leberparenchymzellen nachgewiesen.

Für die Phagozytose von HES scheint ein hohes Molekulargewicht maßgeblich zu sein. Nach Infusion HES 450/0,7 sind in der Milz höhermolekulare Anteile zu finden. Diese liegen aber immer noch weit unter den Werten der Infusionslösung (s. Abb.III- 12 und Tab.III- 8). Die hochmolekularen Anteile verschwinden bevorzugt aus dem Serum. Das Mw der HES im Serum wird noch innerhalb der Infusionszeit von 3 h nahezu auf ein Drittel des Mw der Ausgangssubstanz reduziert (s. Abb.III- 4). Nach Infusion von hochsubstituierter HES 450/0,7 fällt das Mw innerhalb der ersten zehn Tage mit einer Halbwertszeit von 13,2 d weiter kontinuierlich ab. Ein Abbau der HES erfolgt rasch. Nach Infusion von HES 200/0,5 und HES 130/0,4 stiegen die Molmassenmittelwerte zwar wieder an, allerdings waren direkt nach Infusion viele der HES-Moleküle ($M_p < 40$ kDa) im Bereich der Nierenschwelle (~ 40 kDa). Sehr viele niedermolekulare Anteile wurden wahrscheinlich noch kurz nach Infusion renal eliminiert. Die HES wird im Verlauf der Beobachtung im Serum dementsprechend einheitlicher und der Polydispersitätsquotient nimmt ab (s. Abb.III- 6).

Der niedermolekulare Anteil der HES verschwindet neben renaler Ausscheidung durch Diffusion, der hochmolekulare Anteil durch Phagozytose und Abbau durch enzymatische Hydrolyse der HES. Eine relativ rasche Abnahme der Polydispersität mit schmaler werdender Molekulargewichtsverteilung wurde auch von Weidhase et al. [151] beschrieben. Ferber et al. [141] hatten in einer Studie an Probanden mit verschiedenen HES-Präparaten bereits früher festgestellt, dass der Polydispersitätsquotient M_w/M_n im Serum abnimmt. Dabei wurde noch davon ausgegangen, dass die höhermolekularen Anteile der HES durch α -Amylase gespalten werden, während gleichzeitig niedermolekulare Anteile renal ausgeschieden werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach Infusion v.a. von hochsubstituierter HES 450/0,7 scheinen bei der niedrigsubstituierten HES 130/0,4 die Anteile, welche durch das RES aufgenommen werden, relativ gering zu sein. In der Milz wird HES 130/0,4 nicht, HES 200/0,5 im Gegensatz zu hochsubstituierter HES 450/0,7 nur in geringem Umfang (maximal in drei Proben pro Versuchsgruppe über der Nachweisgrenze) gespeichert. Bei der niedrigsubstituierten, niedermolekularen HES ist zwar auch der hochmolekulare Anteil geringer als bei der HES 450/0,7, ein Einfluss der Substitution auf die Phagozytose könnte dabei allerdings ebenfalls eine Rolle spielen. Von Theisen et al. [94] wurde nach einer Fünf-Tages-Infusion infolge Infusion einer hochsubstituierten HES 200/0,62 in der Milz von Ratten eine Konzentration von 11,63 mg/g gemessen, während von der mittelsubstituierten HES 200/0,5 nur 1,17 mg/g und von einer niedrigsubstituierten HES 140/0,4 sogar nur 0,45 mg/g gespeichert wurden. Ob die phagozytierten HES-Fractionen in den Zellen des RES tatsächlich vorwiegend hochsubstituiert sind müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Folglich bleiben für die Elimination von HES aus dem Plasmaverteilungsraum drei verschiedene Mechanismen. Die niedermolekulare HES kann rasch über die Nieren ausgeschieden werden. Bei Niereninsuffizienz wird diese niedermolekulare HES alternativ auch in größerem Umfang in die Leberparenchymzellen abgelagert. Dass die vollständige Elimination von HES aus dem Plasmaverteilungsraum von der Funktion der Niere weitgehend unabhängig ist wurde von Lukasewitz und Förster [31] beschrieben. In der Leber kann die abgelagerte niedermolekulare HES auf Grund ihrer ausgeprägten Wasserbindung zu mechanischer Beeinträchtigung führen [87, 110].

Die hochmolekulare HES wird mutmaßlich überwiegend über Phagozytose aus dem Plasmaverteilungsraum entfernt und abgebaut. Die α -Amylase spielt beim Abbau nicht die entscheidende Rolle [78]. Die persistierende Fraktion im Serum ist Ausdruck einer HES, deren Erkennung als Fremdkörper durch die Phagozyten offenbar erschwert ist. Damit ist eine vorübergehende Speicherung von hochmolekularer HES im RES eine typische Begleiterscheinung der Applikation von HES. Nach der Aufnahme in Phagozyten könnten HES-Moleküle innerhalb der Lysosomen hydrolysiert werden. Zwar nehmen Mw, Mn und Mp nach Infusion von HES 450/0,7

in der Milz nicht ab, sondern zu (s. Abb.III- 15-17), dieser Anstieg ist aber wahrscheinlich nur eine scheinbare Zunahme der Molmasse der HES. Von Reimann et al. [35] wurden in immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen HES-reaktive Vakuolen beobachtet, deren Kondensation ein Indikator für die Rückdiffusion von HES aus der Zelle in den Intravasalraum oder für den Abbau von HES in der Zelle sein könnte. Es kommt zu dem scheinbaren Anstieg der Molmasse der in den Milzzellen verbliebenen HES, da niedermolekulare, gespaltenen Anteile mutmaßlich schneller wieder ausgeschleust und anschließend renal ausgeschieden werden.

Von Förster [38] wurde vermutet, dass die intrazelluläre Spaltung von HES nach vorangehender Phagozytose größere Bedeutung hat als die intravasale Spaltung. HES sollte von Zellen des RES aufgenommen werden und dort in den Lysosomen durch Hydrolasen mit saurem Wirkoptimum („saure Isomaltase“) abgebaut werden. Dafür spricht, dass in tierexperimentellen Untersuchungen von Sonntag und Paulini bei der Ratte nach Infusion von Dextran mit 40 kDa und nach Infusion von HES (Mw 40 kDa) eine Aktivierung der Synthese lysosomaler Enzyme festgestellt wurde. Dabei war eine stärkere Reaktion der Lysosomen nach Infusion von dem schneller abbaubaren Dextran nachzuweisen [152]. Für einen lysosomalen Abbau von HES im Gewebe spricht auch eine Untersuchung eines Patienten mit angeborener Verringerung der lysosomalen Glykosidase-Aktivität. Nach Infusionen von HES 450/0,7 trat bei diesem Patienten eine ausgeprägte, persistierende Gesichtsschwellung auf. Immunhistochemisch wurde dabei eine deutliche HES-Speicherung in Biopsien aus den geschwollenen Regionen nachgewiesen [153].

Der Abbau der intrazellulär gespeicherten HES erfolgt in Abhängigkeit von der Substitution der HES. Während die niedrigsubstituierte, niedermolekulare HES 130/0,4 nur bis zu drei Tagen nach Infusion in der Leber und in der Milz überhaupt nicht nachgewiesen wurde, war die mittelsubstituierte, mittelmolekulare HES 200/0,5 noch 5 Tage nach Infusion in der Leber, und an den Tagen eins bis zehn teilweise in der Milz nachweisbar. Nach Infusion der hochsubstituierten, hochmolekularen HES 450/0,7 war HES sogar noch bei der letzten Organentnahme 50 Tage nach Infusion in Milz und Leber nachweisbar. Während die Molmassen in der Leber bei anhaltend

niedrigen Werten blieben ($M_p \sim 60$ kDa), nahmen die Molmassen in der Milz von Tag 0 (M_w 157 kDa; M_p 71 kDa) bis Tag 50 (M_w 230 kDa; M_p 270 kDa) deutlich zu.

Damit ist eine niedrigsubstituierte HES mit geringem hochmolekularem Anteil (HES 130/0,4) hinsichtlich der vorhersehbaren Dauer der Speicherung als besonders günstig anzusehen. Hingegen ist zu erwarten, dass eine hochsubstituierte, hochmolekulare HES (HES 450/0,7) besonders lang im RES gespeichert wird.

Bei Patienten mit dekompensierter Niereninsuffizienz sollte jedoch eine wiederholte, hochdosierte Anwendung von HES stets kritisch betrachtet werden, da niedermolekulare HES alternativ auch in größerem Umfang in die Leberparenchymzellen abgelagert wird und dort zu Obstruktionen führen kann.

V Zusammenfassung

Hydroxyethylstärke (HES) ist ein kolloidales Volumenersatzmittel, das zur Volumenbehandlung bei Trauma und bei Schock und zur Verbesserung der Rheologie bei Durchblutungsstörungen angewendet wird. Amylopektin, die Grundlage von HES, wird zur Veränderung der physikalischen Eigenschaften substituiert, um eine für die Infusion geeignete Lösung herstellen zu können. Ein wichtiger Begleiteffekt dieser Substitution ist, dass durch die dadurch erzeugten Störstellen der enzymatische Abbau der Volumenersatzmittel durch Serumglykosidasen minimiert wird.

Die molekularen Eigenschaften der HES können anhand der Molekulargewichtsverteilung, beschrieben durch den Gewichtsmittelwert der Molmassen M_w , den Zahlenmittelwert der Molmassen M_n und die Molmasse im Peakmaximum M_p , sowie nach dem Ausmaß der Substitution beschrieben werden. Im Handel befindliche HES-Lösungen werden anhand des Gewichtsmittelwertes der Molmassen (M_w) und der molaren Substitution (MS) gekennzeichnet.

Nach bisherigen Erkenntnissen zur Speicherung der HES in Organen stellten sich die Fragen, ob die Hypothese, dass HES durch lysosomale Enzyme abgebaut wird untermauert werden kann und ob es möglich ist, die Sicherheit der HES für die Anwendung am Patienten durch gezielte Verwendung bestimmter HES-Fractionen zu verbessern. Ziel dieser Arbeit war daher, erstmals die Molekulargewichtsverteilung der nach Infusion von HES in Milz und Leber gespeicherten HES mittels Ausschluss-Chromatographie gekoppelt mit Mehrwinkel-Laser-Streulicht-Detektion zu bestimmen.

Untersucht wurden drei handelsübliche HES-Präparate mit unterschiedlichem M_w und unterschiedlicher Substitution (die Bezeichnung schließt M_w (kDa) und MS ein): HES 130/0,4 und HES 200/0,5 sowie HES 450/0,7. Je acht Wistar-Ratten pro Versuchsgruppe erhielten 18 ml HES infundiert. Die Organe wurden für die Molmassenbestimmung bis zu fünfzig Tagen nach Infusion entnommen. Die Hämoglobinkonzentrationen und Hämatokritwerte bei den Blutabnahmen in den ersten 48 Stunden wurden ermittelt und gaben Aufschluss über die Hämodilution.

Als wichtigstes Ergebnis wurde eine unterschiedliche Molmassenverteilung der HES aus Milz und Leber festgestellt. In der Leber werden vorwiegend niedermolekulare Anteile gespeichert. Das Mw der HES in der Leber lag direkt nach Infusion bei 89.606 ± 8.570 (HES 450/0,7), 20.038 ± 1.600 (HES 200/0,5) und 23.769 ± 2.489 (HES 130/0,4). Im Verlauf der Untersuchungen stieg das Mw in der Leber bis maximal Tag 5 (HES 450/0,7) nach Infusion zwar an, fiel dann aber bei den weiteren Bestimmungen nach mehr als 5 Tagen wieder ab. Das Peakmaximum der Molmassenverteilung der HES in der Leber blieb dabei größtenteils konstant (HES 450/0,7: ~ 60 kDa; HES 200/0,5: ~ 30 kDa; HES 130/0,4: ~ 30 kDa). Die Molmassenverteilung der Milz wies hingegen hochmolekulare HES auf, wobei die Molmassen im Verlauf der Zeit noch zunahmen. Das Mw nach Infusion von HES 450/0,7 stieg dabei von 148.220 Da auf 229.617 Da im Mittel an. Möglicherweise erfolgt in der Milz vor allem eine Speicherung schwerer zu spaltender HES.

In der Leber konnte nach Infusion aller HES-Präparate und bereits unmittelbar nach Infusion HES gefunden werden. In der Milz war nur nach Infusion der hochmolekularen, hochsubstituierten HES 450/0,7 und der mittelmolekularen, mittelsubstituierten HES 200/0,5 gespeicherte HES nachzuweisen. Nach Infusion der HES 200/0,5 war dabei nur vereinzelt und erst ab einem Tag HES in der Milz auszumachen. In der Leber war die Speicherung der HES 450/0,7 ebenfalls am längsten festzustellen, während bei HES 130/0,4 die Speicherung in der Leber nur bis 3 Tage nach Infusion bestand.

Der Verlauf der Molmassenverteilung in der Leber deutet auf einen intrazellulären Abbau der HES durch lysosomale Enzyme hin, während in der Milz über einen langen Zeitraum nicht gespaltene hochmolekulare HES angereichert wird. Die niedermolekulare, niedrigsubstituierte HES ist hinsichtlich der vorhersehbaren Dauer der Speicherung als besonders günstig anzusehen. In der Leber werden jedoch bei allen HES-Präparaten niedermolekulare Anteile in Konkurrenz zur renalen Elimination aufgenommen. Daher ist die wiederholte, hochdosierte Anwendung von HES bei dekompensierter Niereninsuffizienz aufgrund der Gefahr einer mechanischen Beeinträchtigung der Leber durch dort kumulierte HES stets kritisch zu betrachten.

Summary

Hydroxyethyl starch (HES) is a colloidal volume substitute, which is used for fluid replacement in trauma and shock and for improvement of rheology after disturbance in microcirculation. HES is based on amylopectin. Amylopectin is substituted in order to modify its physical properties rendering it suitable for infusion. An important side effect of this substitution is the fact, that enzymatic degradation of volume substitutes via serum-glycosidases is minimized by so produced disruptive sites.

Molecular characteristics of HES can be specified by molecular weight distribution, described as weight-average molecular weight M_w , number-average molecular weight M_n and peak maximum molecular weight M_p , and by extent of substitution. Commonly used HES-solutions are labeled by weight-average molecular weight (M_w) and by molar substitution (MS).

According to present knowledge about accumulation of HES in the organs, the questions whether the hypothesis, that HES is broken down by lysosomal enzymes and if it is possible to improve the safety of HES given to patients by using specific HES fractions can be supported. Aim of the study was to determine the molecular weight distribution of HES accumulation in spleen and liver after infusion using Size Exclusion Chromatography coupled with Multi Angle Laser Light Scattering for the first time.

Three customary HES-preparations with different molecular weights and different substituents, HES 130/0,4, HES 200/0,5 and HES 450/0,7 (declaration includes M_w (kDa) and MS), were investigated. Each experimental group of eight Wistar-rats, were given an infusion of 18 ml HES. The organs were extracted for molar mass detection up to fifty days after infusion. Hemoglobin concentration and hematocrit values were determined from blood samples taken in the first 48 h which gave a break down of the hemodilution.

The most important result is that a different molar mass distribution of HES in spleen and liver was detected. In the liver fractions with low molecular weight accumulated predominantly. In the liver the Mw of HES were at 89.606 ± 8.570 (HES 450/0,7), 20.038 ± 1.600 (HES 200/0,5) and 23.769 ± 2.489 (HES 130/0,4) directly after infusion. In course of the experiments the Mw increased in the liver to a maximum up to day 5 (HES 450/0,7) after infusion, but it decreased again after more than 5 days in further determinations. At the same time peak molecular mass of molar mass distribution of HES in liver remained mostly constant (HES 450/0,7: ~ 60 kDa; HES 200/0,5: ~ 30 kDa; HES 130/0,4: ~ 30 kDa). In contrast molecular weight distribution in the spleen showed high molecular HES. Thereby the molecular mass increases steadily. Mean Mw increased after infusion of HES 450/0,7 from 148.220 Da to 229.617 Da in so doing. It is possible that accumulation of particularly persistent HES occurs in the spleen.

In each group HES could be detected in the liver immediately after infusion. In the spleen stored HES was found only after infusion of high-molecular weight, highly substituted HES 450/0,7 and medium-molecular weight, medium substituted HES 200/0,5. Using HES 200/0,5 HES was found in spleen only sporadically and not until one day post infusion. In the liver accumulation of HES 450/0,7 also was found longes, whereas HES 130/0,4 was detected only until 3 days after infusion.

The course of molar mass distribution in the liver indicates a continuous intracellular degradation of HES-molecules by lysosomal enzymes. In contrast, non-degraded high-molecular weight HES exists over a long period in the spleen. Low-molecular weight, low substituted HES in particular is favored with regard to the foreseen accumulation. However, low-molecular weight fractions of all HES-preparations are taken up in the liver in competition to renal elimination. That is why repeated, high-dosed usage of HES in spite of decompensated renal insufficiency should be regarded critically because of the risk of mechanical impairment due to accumulated HES.

VI Literaturverzeichnis

- [1] **Von Bormann B (1989).** *Blood saving procedures – anesthesiologic aspects.* Unfallchirurgie 15: 194-200.
- [2] **Sibrowski W, Penner M, Kühnl P (1993).** *Transfusionsbedingte Virusinfektionen: Wie groß ist das Restrisiko?* Infusionsther. Transfusionsmed. 20 Suppl. 2: 4-9.
- [3] **Tabor E, (1999).** *The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type I.* Transfusion 39: 1160-1168.
- [4] **Weinauer F (2003).** *Sicherheit von Blutprodukten (Teil 1 – Infektionsicherheit).* Bayerisches Ärzteblatt 11: 44-47.
- [5] **Cronin KD (1987).** *Plasma volume expanders – an overview.* Dev. Biol. Stand. 67: 113-118.
- [6] **Hogan JJ (1915).** *The use of colloidal (gelatin) solutions in shock.* J.A.M.A. 64: 721-726.
- [7] **Bayliss WM (1919).** *Intravenous injections to replace blood.* Medical Research Committee. London, H. M. Stationery Office. Report I, Special Report Series 25: 11-41.
- [8] **Heilmann L, Beez M (1987).** *Neuere klinische Aspekte zur Hämodilution: Symposium Essen, 26. u. 27. April 1985.* Schattauer, Stuttgart; New-York.
- [9] **Hecht G, Weese H (1943).** *Periston, ein neuer Blutflüssigkeitsersatz.* Muench. Med. Wochenschr. 90: 11.
- [10] **Heinlein H, Huebner G (1958).** *Nachweis des Peristons im Blut, Harn und Gewebe.* Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol. 119: 301-315.
- [11] **Mohn G (1959).** *Die Speicherung von Polyvinylpyrrolidon im Rattenorganismus, dargestellt durch den direkten fluoreszenzmikroskopischen Nachweis.* Acta histochem. 9: 76-96.
- [12] **Enzmann P, Langer E (1969).** *Kollidonspeicherung in Leberpunktaten.* Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 347: 143-152.

- [13] **Groenwall A, Ingelmann B (1984).** *The introduction of Dextran as a Plasma Substitute.* Vox Sang. 47: 96-99.
- [14] **Hedin H (1977).** *Dextran-induced anaphylactoid reactions in man. Immunological in vitro and in vivo studies.* Dissertation, Acta Universitatis Upsalien 432.
- [15] **Allhoff T, Lenhart FP (1993).** *Schwere dextraninduzierte anaphylaktische/anaphylaktoide Reaktion (DIAR) trotz Haptenprophylaxe.* Infusionsther. Transfusionsmed. 20: 301-306.
- [16] **Gruber UF, Wettler H, Allemann U, Gerber H, Laubenthal H, Messmer K (1982).** *Prophylaxe allergischer Dextran-Reaktionen durch Vorinjektion von 20 ml Hapten bei 12000 Patienten in der Schweiz.* Praxis 71: 1092-1100.
- [17] **Richter W, Seemann C, Hedin H, Ring J, Messmer K (1980).** *Dextranunverträglichkeit. Immunologische, tierexperimentelle und klinische Studien.* Med. Welt 31: 365-369.
- [18] **Alef M (1998).** *Perioperative Infusionstherapie. Warum? Wann? Was? Wieviel?* Kleintier Konkret 1: 6-14.
- [19] **Wiedersheim M (1957).** *An investigation of oxyethyl starch as a new plasma volume expander in animals.* Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 111: 353-361.
- [20] **Thompson WL, Britton JJ, Walton RP (1962).** *Persistence of starch derivatives and dextran when infused after hemorrhage.* J. Pharmakol. Exp. Ther. 136: 125-132.
- [21] **Heidenreich O, aus der Mühlen K, Heintze K (1975).** *Die Wirkung der Plasmaersatzmittel Hydroxyäthylstärke und Dextran-60 auf die Nierenfunktion von Hunden beim akuten hämorrhagischen Schock.* Anaesthesist 24: 239-243.
- [22] **Ivankovic S, Bülow I (1975).** *Zur fehlenden teratogenen Wirkung des Plasmaexpanders Hydroxyäthylstärke (HÄS) bei Ratte und Maus.* Anaesthesist 24: 244-245.
- [23] **Lee WH, Cooper N, Weidner MG, Murner ES (1968).** *Clinical evaluation of a new plasma expander hydroxyethyl starch.* J. Trauma 8: 381-393.
- [24] **Solanke TF (1968).** *Clinical trial of 6% hydroxyethyl starch (a new plasma expander).* Br. Med. J. 3: 783-785.

- [25] **Mishler JM (1982)**. *Pharmacology of hydroxyethyl starch. Use in therapy and blood banking*. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto.
- [26] **Hansen LL, Wiek J, Daisevskis P, Schrader W (1991)**. *Isovolämische Hämodilution bei nichtarterieller anteriorer Optikusneuropathie*. Fortschr. Augenheilkd. 88: 487-489.
- [27] **Kiesewetter H, Jung F, Blume J, Gerhards M (1987)**. *Hämodilution bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit im Stadium IIb: Prospektiver randomisierter Doppelblind-Vergleich von mittelmolekularer Hydroxyäthylstärke und kleinemolekularer Dextranlösung*. Klin. Wochenschr. 65: 324-330.
- [28] **Haass A (1989)**. *Therapie des akuten ischämischen Insultes*. Nervenheilkunde 8: 35-45.
- [29] **Aichner FT, Fazekas F, Brainin M, Pölz W, Mamoli B, Zeiler K (1998)**. *Hypervolemic hemodilution in acute ischemic stroke: The multicenter Austrian hemodilution stroke trial (MAHST)*. Stroke 29: 743-749.
- [30] **Kiesewetter H, Erlenwein S, Jung F, Wenzel E, Vogel W, Dyckmans J, Bach R, Hahmann H, Schieffer H, Bette L (1988)**. *Isovolämische Hämodilution bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit*. Klin. Wochenschr. 66 Suppl. 15: 8-14.
- [31] **Lukasewitz P, Förster H (1993)**. *Verwendung von verschiedenen Hydroxyäthylstärke-Lösungen als onkotisch wirksames Prinzip bei Peritonealdialyse*. Nieren Hochdruckkr. 12: 622-629.
- [32] **Schneeberger R, Albegger K, Oberascher G, Müller K (1990)**. *Juckreiz – Eine Nebenwirkung von Hydroxyäthylstärke (HES)?* HNO 38: 298-303.
- [33] **Gall H, Kaufmann R, von Ehr M, Schumann K, Sterry W (1993)**. *Persistierender Pruritus nach Hydroxyäthylstärke-Infusionen*. Hautarzt 44: 713-716.
- [34] **Kimme P, Jannsen B, Ledin T, Gupta A, Vegfors M (2001)**. *High incidence of pruritus after large doses of hydroxyethyl starch (HES) infusions*. Acta Anaesthesiol. Scand. 45: 686-689.

- [35] **Reimann S, Szépfalusi Z, Kraft D, Luger T, Metze D (2000).** *Hydroxyethylstärke- Speicherung in der Haut unter besonderer Berücksichtigung des Hydroxyethylstärke- assoziierten Juckreizes.* Dtsch. Med. Wschr. 125: 280-285.
- [36] **Laxenaire MC, Charpentier C, Feldmann L (1994).** *Reactions anaphylactoides aux substituts colloïdaux du plasma: incidence, facteurs des risque, mecanismes.* Ann. Fr. Anesth. Reanim. 13: 301-310.
- [37] **Förster H (1994).** *Hydrokolloide im Vergleich mit Albumin.* Anaesthesist 43 Suppl. 1: S9.
- [38] **Förster H (1988a).** *Biochemische Grundlagen zur Verwendung von polymeren Kohlenhydraten als Plasmaersatz.* In: Peter K, Schimetta W, Bergmann H, Gerlach E, Messmer K und Steinbereithner K (Hrsg.). Beiträge zur Anaesthesiologie und Intensivmedizin. Maudrich Verlag, Wien, München Berlin, Band 26: 27-42.
- [39] **Banks W, Greenwood CT, Muir DD (1973).** *The structure of hydroxyethylstarch.* Br. J. Pharmacol. 47: 172-178.
- [40] **Sommermeier K, Cech F, Schmidt M, Weidler B (1987).** *Klinisch verwendete Hydroxyethylstärke: Physikalisch-chemische Charakterisierung.* Krankenhauspharmazie 8: 271-278.
- [41] **Nitsch E (1988).** *Chemie der Hydroxyethylstärke (HES).* Beitr. Anaesth. Intensivmed. 26: 15-26.
- [42] **Vollmert B (1980).** *Grundriss der Makromolekularen Chemie. Band III. Eigenschaft des freien Makromoleküls.* E. Vollmert-Verlag, Karlsruhe.
- [43] **Roberts M, Pagonos JN (1965).** *Preliminary tests of hydroxyethyl starch solutions in animals.* In: Proceedings of the third conferences of artificial colloid agents. Washington, S. 120-180.
- [44] **Vineyard GC, Bradley BE, Defalco A, Lawson D, Wagner TA, Pastis WK, Nardella FA, Hayes JR (1966).** *Effect of hydroxyethyl starch on plasma volume and hematocrit following hemorrhagic shock in dogs: comparison with dextran, plasma, ringer's.* Ann. Surg. 164: 891-899.
- [45] **Maurer PH, Bernadelli B (1968).** *Immunologic studies with hydroxyethyl starch (HES) – A proposed plasma expander.* Transfusion 8: 265-268.

- [46] **Hölscher BM, Edeling M, Fahrmeier G, Kagel S (1974).** *Comparative investigations of hydroxyethyl starch and dextran 60 in isovolemic haemodilution and haemorrhagic shock of rats.* Anaesthesist 24: 215-218.
- [47] **Hartung HJ, Klose R, Lutz H (1979).** *Tierexperimentelle Untersuchungen zur Volumenwirksamkeit von Hydroxyäthylstärke 40000 beim akuten hämorrhagischen Schock des Hundes.* Infusionsther. Klin. Ernähr. 6: 231-234.
- [48] **Hein LG, Albrecht M, Dworschak M, Frey L, Bruckner UB (1988).** *Long-term observation following traumatic-hemorrhagic shock in the dog: a comparison of crystalloidal vs. colloidal fluids.* Circ. Shock 26: 353-364.
- [49] **Brückner UB, Messmer K (1991).** *Organdurchblutung und Sauerstoffversorgung bei limitierter isovolämischer Hämodilution mit 6% HAES 200/0,62 und 6% Dextran 70.* Anaesthesist 40: 434-440.
- [50] **Bosman RJ, Minten J, Lu HR, van Aken H, Flameng W (1992).** *Free polymerized hemoglobin versus hydroxyethyl starch in resuscitation of hypovolemic dogs.* Anesth. Analg. 75: 811-817.
- [51] **Friedman Z, Berkenstadt H, Preisman S, Perel A (2003).** *A comparison of lactated ringer's solution to hydroxyethyl starch 6% in a model of severe hemorrhagic shock and continuous bleeding in dogs.* Anesth. Analg. 96: 39-45.
- [52] **Müller M (1977).** *Verweildauer und Verträglichkeit eines Gelatine-Präparates beim Pferd.* Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Bern.
- [53] **Hermann M, Bretscher R, Thièbaud G, Meister D (1990).** *Erste Erfahrungen bei der Schockbehandlung des Pferdes mit einem Plasmaexpander auf Stärkebasis.* Schweiz. Arch. Tierheilkd. 132: 5-15.
- [54] **Meister D, Hermann M, Mathis GA (1992).** *Kinetics of hydroxyethyl starch in horses.* Schweiz. Arch. Tierheilk. 134: 329-339.
- [55] **Jones PA, Tomasic M, Gentry PA (1997).** *Oncotic, hemodilutional, and hemostatic effects of isotonic saline and hydroxyethyl starch solutions in clinically normal ponies.* Am. J. Vet. Res. 58: 541-548.
- [56] **Jones PA, Bain FT, Byars TD, David JB, Boston RC (2001).** *Effect of hydroxyethyl starch infusion on colloid oncotic pressure in hypoproteinemic horses.* J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 1130-1135.

- [57] **Ungemach FR (1999)**. *Therapienotstand vermeidbar. Vorschläge der BTK zur Behebung von Therapieengpässen bei der arzneilichen Versorgung lebensmittelliefernder Tiere*. Dtsch. Tierärztebl. 47: 562-563.
- [58] **Hartmann H, Ungemach FR (1996)**. *Pharmakologie des Wasser- und Elektrolythaushaltes*. In: Frey H, Löscher W (Hrsg.). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke, Stuttgart: 236-257.
- [59] **Smiley LE (1992)**. *The use of hetastarch for plasma expansion*. Probl. Vet. Med. 4: 652-667.
- [60] **Arturson G, Wallenius G (1964)**. *The intravascular persistence of dextrane of different molecular sizes in normal humans*. Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 1: 76-80.
- [61] **Förster H, Wikarczyk C, Dudziak R (1981)**. *Bestimmung der Plasmaelimination von Hydroxyäthylstärke und von Dextran mittels verbesserter analytischer Methodik*. Infusionsther. Klin. Ernähr. 8: 88-94.
- [62] **Asskali F (1988)**. *Einfluss von Substitution und Molekulargewicht auf die Pharmakokinetik von Hydroxyethylstärke – Untersuchung bei Versuchspersonen*. Beitr. Anaesth. Intensivmed. 26: 43-53.
- [63] **Förster H, Krech I, Asskali F (1999)**. *Nierenschwelle für Hydroxyethylstärke – Einfluß der Molekülgröße auf die Verweildauer im Gefäßsystem*. Krankenhauspharmazie 20: 476-484.
- [64] **Lehmann GB (2001)**. *Hydroxyethylstärke (HES) im Urin nach Mehrfachinfusion von HES (70/0,5). Physiko-chemische Charakterisierung mittels Gas- und Flüssigchromatographie*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- [65] **Thompson WL, Fukushima T, Rutherford RB, Walton RP (1970)**. *Intravascular persistence, tissue storage, and excretion of hydroxyethyl starch*. Surg. Gynecol. Obstet. 131: 965-972.
- [66] **Lindblad G, Falk J (1976)**. *Konzentrationsverlauf von Hydroxyäthylstärke und Dextran in Serum und Lebergewebe von Kaninchen und die histopathologischen Folgen der Speicherung von Hydroxyäthylstärke*. Infusionsther. Klin. Ernähr. 3: 301-310.

- [67] **Boon JC, Jesch F, Ring J, Messmer K (1976).** *Intravascular persistence of hydroxyethyl starch in man.* Eur. Surg. Res. 8: 497-503.
- [68] **Asskali F, Förster H (1999).** *Zur Kumulation unterschiedlich substituierter Hydroxyethylstärke (HES) nach repetitiver Infusion bei gesunden Versuchspersonen.* Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 34: 537-541.
- [69] **Yoshida M, Yamashita T, Matsuo J, Kishikawa T (1973).** *Enzymic degradation of hydroxyethyl starch. Part I. Influence of the distribution of hydroxyethyl groups on the enzymic degradation of hydroxyethyl starch.* Staerke 25: 373-376.
- [70] **Ferber HP (1985).** *Beziehung von Elimination, Metabolisierung und Wirkung von Hydroxyethylstärke in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad und dem Massenmittel der Molmasse (Mw).* Habilitationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- [71] **Fömmel D (1994).** *Veränderungen von Substitutionsgrad und Substitutionsmuster von Hydroxyethylstärke nach parenteraler Applikation an freiwilligen Versuchspersonen, gemessen mit einer neuentwickelten GC-Methode.* Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- [72] **Theisen A (2001).** *Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss des Substitutionsmusters (C2/C6) auf die Serumelimination des Plasmaexpanders Hydroxyethylstärke.* Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
- [73] **Yoshida M, Kishikawa T (1984).** *A study of hydroxyethyl starch. Part II. Degradation-sites of hydroxyethyl starch by pig pancreas α -amylase.* Staerke 36: 167-169.
- [74] **Köhler H, Kirch W, Weihrauch TR, Prellwitz W, Horstmann HJ (1977).** *Macroamylasaemia after treatment with hydroxyethyl starch.* Eur. J. Clin. Invest. 7: 205-211.
- [75] **Köhler H, Kirch W, Horstmann HJ (1977).** *Die Bildung hochmolekularer Komplexe aus Serumamylase und kolloidalen Plasmaersatzmitteln.* Anaesthesist 26: 623-627.

- [76] **Förster H (1988b)**. *Physikalisch-chemische und physiologische Bedeutung von Substitution und Molekulargewicht bei Hydroxyethylstärke*. In: Heilmann L u. Ehrly AM (Hrsg.). Hämorheologie und operative Medizin. Münchner Wissenschaftliche Publikationen, München: 118-134.
- [77] **Förster H, Asskali F (1998)**. *Grundlagen der Anwendung von Hydroxyethylstärke – Was ist gesichert, was ist Spekulation?* Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung 5: 2-11.
- [78] **Weber C, Theisen A, Warnken U, Asskali F, Förster H (1998)**. *Vergleich der Organspeicherung von in vitro amylysespaltener HES und unbehandelter HES bei Wistar WU-Ratten*. Anaesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. Suppl. 33: 238.
- [79] **Metcalf W, Papadopolus A, Tufaro R, Barth A (1970)**. *A clinical physiologic study of hydroxyethyl starch*. Surg. Gynecol. Obstet. 131: 255-267.
- [80] **Ryan AJ, Holder GM, Mate C, Adkins GK (1972)**. *The metabolism and excretion of hydroxyethyl starch in the rat*. Xenobiotika 2: 141-146.
- [81] **Halmágyi M (1984)**. *Zur Bewertung des kolloidalen Volumenersatzmittels 6% HÄS 40/0,5*. Anaesthesist 33: 73-81.
- [82] **Lenz K, Schimetta W, Pölz W, Kröll W, Gruy-Kapral C, Magometschnigg D (2000)**. *Intestinal elimination of hydroxyethyl starch?* Intensive Care Med. 26: 733-739.
- [83] **Legendre C, Thervet E, Page B, Percheron A, Noel LH, Kreis H (1993)**. *Hydroxyethyl starch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation*. Lancet 342: 248-249.
- [84] **Jesch F, Hübner G, Zumtobel V, Zimmermann M, Messmer K (1979)**. *Hydroxyäthylstärke (HÄS 450/0,7) in Plasma und Leber – Konzentrationsverlauf und histologische Veränderungen beim Menschen*. Infusionsther. Klin. Ernähr. 6: 112-117.
- [85] **Paulini K, Sonntag W (1976)**. *Veränderungen des RHS der Ratte nach parenteraler Gabe von Dextran (Mw 40000) und Hydroxyethylstärke (Mw 40000) – Chemische, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen*. Infusionsther. Klin. Ernähr. 3: 294-299.

- [86] **Wikarczyk C (1981).** *Zum Verhalten von intravenös verabreichter Hydroxyäthylstärke im Vergleich zum Dextran.* Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- [87] **Pfeifer U, Kult J, Förster H (1984).** *Ascites als Komplikation hepatischer Speicherung von Hydroxyethylstärke (HES) bei Langzeitdialyse.* Klin. Wochenschr. 62: 862-866.
- [88] **Lukasewitz P, Kroh U, Löwenstein O, Krämer M, Lennartz H (1998).** *Quantitative Untersuchungen zur Gewebespeicherung von mittelmolekularer Hydroxyethylstärke 200/0,5 bei Patienten mit Multiorganversagen.* Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung 5: 42-46.
- [89] **Förster H, Meier B, Asskali F (1999).** *Aufnahme von Fluorescein-markierter Hydroxyäthylstärke durch organgebundene und zirkulierende Zellen des retikuloendothelialen Systems.* Infusionsther. Transfusionsmed. 26: 45-52.
- [90] **Bepperling F, Opitz J, Leuschner J (1999).** *HES 130/0.4, a new HES specification: tissue storage after multiple infusions in rats.* Crit. Care 3 Suppl. 1: P153.
- [91] **Lipfert B, Standl T, Düllmann J, Helmchen U, Schulte am Esch J, Lorke DE (1999).** *Histology and ultrastructure of liver and kidney following blood exchange with ultrapurified, polymerised bovine hemoglobin in comparison with hydroxyethyl starch.* Lab. Invest. 79: 573-582.
- [92] **Sirtl C, Laubenthal H, Zumtobel V, Kraft D, Jurecka W (1999).** *Tissue deposits of hydroxyethyl starch (HES): dose-dependent and time-related.* Br. J. Anaesth. 82: 510-515.
- [93] **Gretz N, Hocker A, Lasserre JJ, Strauch M (1992).** *HES as an osmotic agent for continuous ambulatory peritoneal dialysis solutions.* Nephron 61: 120.
- [94] **Theisen A, Weber C, Asskali F, Förster H (2002).** *Tissue storage of hydroxyethyl starch (HES) in an experimental repeated infusion study in rats.* Eur. J. Anaesth. 29 Suppl. 24: A-638.
- [95] **Schildt B, Bouveng R, Sollenberg M (1975).** *Plasmasubstitute induced impairment of the reticuloendothelial system function.* Acta Chir. Scand. 141: 7-13.

- [96] Förster H (1997). *Speicherung von HES als mögliche Ursache von Nebenwirkungen*. Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung 4: 24-33.
- [97] Ginz HF, Gottschall V, Schwarzkopf G, Walter K (1998). *Exzessive Gewebespeicherung von Kolloiden im retikuloendothelialen System*. Anaesthesist 47: 330-334.
- [98] Lenz G, Hempel V, Junger H, Werle H, Buckenmaier P (1986). *Auswirkungen von Hydroxyethylstärke, Oxypolygelatine und Humanalbumin auf die Phagozytosefunktion des Retikuloendothelialen Systems (RES) gesunder Probanden*. Anaesthesist 35: 423-428.
- [99] Mishler JM (1977). *Enhancement of phagocytosis by human neutrophils incubated with dexamethasone, hydroxylated amylopectin and tri-sodium citrate*. In: C.F. Hogman et al. (Hrsg.). Blood leucocytes-function and use in therapy. ISBT Publication, Uppsala.
- [100] Strauss RG, Snyder EL, Stuber J, Fick RB (1986). *Ingestion of hydroxyethyl starch by human leukocytes*. Transfusion 26: 88-90.
- [101] Eastlund DT, Douglas MS, Choper JZ (1992). *Monocyte chemotaxis and chemotactic cytokine release after exposure to hydroxyethyl starch*. Transfusion 32: 855-860.
- [102] Dietrich HJ, Brosig A (1995). *Speicherungsphänomene von Hydroxyethylstärke und Dextranen in kultivierten humanen Monozyten*. Anaesthesist 44 Suppl. 2: PS 50.
- [103] Engel JM, Welters I, Rupp M, Langenfeld T, Ruwoldt R, Menges T, Hempelmann G (2001). *Influence of colloid fluids on polymorphonuclear granulocyte function in vivo*. Acta Anaesthesiol. Scand. 45: 385-389.
- [104] White KL, Krasula RW, Munson AE, Holsapple MP (1986). *Effects of hydroxyethylstarch (Hespan®), a plasma expander, on the functional activity of the reticuloendothelial system. Comparison with human serum albumin and pyran copolymer*. Drug Chem. Toxicol. 9: 305-322.
- [105] Van Rijen EAM, Ward JJ, Little RA (1997). *Phagocytic reticuloendothelial function after hemorrhage and resuscitation: Modulation by different fluids*. Shock 8: 219-224.

- [106] **Jarecki-Black JC, Atkins L, Pratt KM, Pepkowitz SH, Glassmann AB (1986).** *Effect of hydroxyethyl starch in reducing parasite load in experimental visceral leishmaniasis.* Ann. Clin. Lab. Sci. 16: 450-454.
- [107] **Shatney CH, Chaudry IH (1984).** *Hydroxyethylstarch administration does not depress reticuloendothelial function or increase mortality from sepsis.* Circulatory Shock 13: 21-26.
- [108] **Nielsen VG, Tan S, Brix AE, Baird MS, Parks DA (1997).** *Hextend[®] (hetastarch solution) decreases multiple organ injury and xanthine oxidase release after hepatoenteric ischemia-reperfusion in rabbits.* Crit. Care Med. 25: 15656-1574.
- [109] **Dienes HP, Gerharz C-D, Wagner R, Weber M, John H-D (1986).** *Accumulation of hydroxyethyl starch (HES) in the liver of patients with renal failure and portal hypertension.* J. Hepatol. 3: 223-227.
- [110] **Christidis C, Mal F, Ramos J, Senejoux A, Callard P, Navarro R, Trinchet J-C, Larrey D, Beaugrand M, Guettier C (2001).** *Worsening of hepatic dysfunction as a consequence of repeated hydroxyethylstarch infusions.* J. Hepatol. 35: 726-732.
- [111] **Zijlstra WG, van Kampen EJ (1960).** *Standardization of hemoglobinometry. I. The extinction coefficient of hemoglobincyanide.* Clin. Chim. Acta 5: 719-729.
- [112] **Zijlstra WG, van Kampen EJ (1962).** *Standardization of hemoglobinometry. III. Preparation and use of a stable hemoglobin-cyanide standard.* Clin. Chim. Acta 7: 96-99.
- [113] **Meyer V (1992).** *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 7. Aufl.,* Salle und Sauerländer, Frankfurt.
- [114] **Debye P (1944).** *Light scattering in solutions.* J. Appl. Phys. 15: 338-342.
- [115] **Debye P (1947).** *Molecular weight determination by light scattering.* J. Phys. Coll. Chem. 51: 18-32.
- [116] **Zimm BH (1945).** *Molecular theory of the scattering of light in fluids.* J. Chem. Phys. 13: 141-145.
- [117] **Zimm BH (1948).** *The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions.* J. Chem. Phys. 16: 1093-1099.

- [118] **Atkins PW (1987)**. *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [119] **Kratochvil P (1987)**. *Classical light scattering from polymer solutions*. Polymer Science Library 5. Elsevier, Amsterdam.
- [120] **Wyatt Technology Deutschland GmbH (1994)**. *Eine kurze Einführung in die Ausschlusschromatographie-Vielwinkelstreulichtdetektor-Technik mit dem DAWN F*. Schlangenbad.
- [121] **Wyatt PJ, Jackson C, Wyatt GK (1988)**. *Absolute GPC determinations of molecular weights and sizes from light scattering*. Am. Lab. May & shyp 6.
- [122] **Johann C (1989)**. *GPC-Lichtstreuungkopplung*. Labor Praxis 13: 1106-1110.
- [123] **Ackermann H (1998)**. *BiAS für Windows 95/NT*. Epsilon-Verlag, Frankfurt.
- [124] **Grubbs FE, Beck G (1972)**. *Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations*. Technometrics 14: 847-854.
- [125] **Werner J (1992)**. *Biomathematik und Medizinische Statistik*. Urban & Schwarzenberg-Verlag, München, Wien, Baltimore.
- [126] **Brenner U, Mueller JM, Walter M, Keller HW (1985)**. *A catheter system for long-term intravenous infusion in unrestrained rats*. Lab. Anim. 19: 192-194.
- [127] **Lehnhardt FJ (1989)**. *Ein neues System zum Katheterismus der V. cava bei Ratten für Langzeitinfusionen (Implantofix)*. Z. Versuchstierkd. 32: 171-178.
- [128] **Jones PA, Hynd JW (1981)**. *Continuous long-term intravenous infusion in the unrestrained rat – a novel technique*. Lab. Anim. 15: 29-33.
- [129] **Bauer M, Marzi I, Ziegenfuss T, Seeck G, Buhren V, Larsen R (1993)**. *Comparative effects of crystalloid and small volume hypertonic hyperoncotic fluid resuscitation on hepatic microcirculation after hemorrhagic shock*. Circ. Shock 40: 187-193.
- [130] **Waschke KF, Albrecht DM, van Ackern K, Kuschinsky W (1996)**. *Coupling between local cerebral blood flow and metabolism after hypertonic/hyperoncotic fluid resuscitation from hemorrhage in conscious rats*. Anesth. Analg. 82: 52-60.
- [131] **Ostgaard G, Onarheim H (1996)**. *Retention and distribution of polygeline (Haemacel) in the rat*. Acta Anaesthesiol. Scand. 40: 96-101.

- [132] **Kellum JA (2002).** *Fluid resuscitation and hyperchloremic acidosis in experimental sepsis: Improved short-term survival and acid-base balance with Hextend compared with saline.* Crit. Care Med. 30: 300-305.
- [133] **Thrivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM (2002).** *Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat.* Brain Res. Brain Res. Protoc. 10: 84-94.
- [134] **Beynen AC, Baumanns V, Haas JWM, van Hellemond KK, Stafleu FR, van Tintelen G (1988).** *Assessment of discomfort induced by orbital puncture in rats.* In: Beynen AC, Solleveld HA (Hrsg.). *New Developments in Biosciences: their Implications for Laboratory Animal Science.* Mertinus Nijhoff Publishers, Dordrecht: 431-436.
- [135] **Van Herck H, Baumans V, Van der Craats NR, Hesp AP, Meijer GW, van Tintelen G, Walvoort HC, Beynen AC (1992).** *Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture.* Lab. Anim. 26: 53-58.
- [136] **Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (1995).** *Grundlagen der Versuchstierkunde.* Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- [137] **Anon. (2003).** *Rote Liste® Service GmbH (Hrsg.). Rote Liste® Online.* ECV Editio Cantor Verlag, Aulendorf.
- [138] **Ringler DH, Dabich L (1979).** *Hematology and clinical biochemistry.* In: Baker JH, Lindsey JR, Weisbroth S (Hrsg.). *The laboratory rat.* Academic Press, New York, Toronto, London, Sydney, San Francisco: 108.
- [139] **Krech I (1997).** *Molmassenbestimmung von Hydroxyethyl- und Acetylstärke nach intravenöser Applikation an freiwilligen Versuchspersonen.* Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- [140] **Burchard W, Seger B, Schulz L, Ebringerova A, Hromadkova Z, Vorwerk W, Krüger E, Grimm A (1994).** *Lichtstreuuntersuchungen an Polysaccharidlösungen.* Das Papier 12: 755-764.

- [141] **Ferber HP, Nitsch E, Förster H (1985).** *Studies on hydroxyethyl starch. Part II: Changes of the molecular weight distribution for hydroxyethyl starch in types 450/0.7, 450/0.5, 450/0.3, 300/0.4, 200/0.7, 200/0.5, 200/0.3 and 200/0.1 after infusion in serum and urine of volunteers.* *Arzneimittelforschung* 35: 615-622.
- [142] **Warnken UH (2001).** *Quantitative polymeranalytische Nachweismethoden und Untersuchungen zur Stabilität, Struktur und Substitution des Plasmaexpanders Acetylstärke (ACS) sowie Standardisierung der Analytik.* Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- [143] **Bogan RK, Gale GR, Walton RP (1969).** *Fate of ¹⁴C-labeled hydroxyethyl starch in animals.* *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 15: 206-211.
- [144] **McManus JFA (1946).** *The demonstration of certain fatty substances in paraffin sections.* *J. Path. Bact.* 58: 93-95.
- [145] **Thompson WL (1977).** *Erwiderung auf die Studie von G. Lindblad und J. Falk: Konzentrationsverlauf von Hydroxyethylstärke und Dextran in Serum und Lebergewebe von Kaninchen und die histopathologischen Folgen der Speicherung von Hydroxyäthylstärke.* *Infusionstherapie* 3: 301-310 (1976). *Infusionsther. Klin. Ernähr.* 4: 56-62.
- [146] **Parth E, Jurecka W, Szépfalusi Z, Schimetta W, Gebhart W, Scheiner O, Kraft D (1992).** *Histological and immunohistochemical investigations of hydroxyethyl-starch deposits in rat tissues.* *Eur. Surg. Res.* 24: 13-21.
- [147] **Köhler H, Kirch W, Pitz H (1978).** *Volumenzweiteffekt nach einmaliger Infusion von Hydroxyethylstärke.* *Klin. Wochenschr.* 56: 977-983.
- [148] **Pöhlmann R (1998).** *Hydroxyethylstärke – der Unterschied liegt im Detail. Wachsmais- und Kartoffelstärke im Vergleich.* *Krankenhauspharmazie* 4: 187-189.
- [149] **Mishler JM, Duerr HK (1979).** *Macroamylasaemia following the infusion of low molecular weight-hydroxyethyl starch in man.* *Eur. Surg. Res.* 11: 217-222.
- [150] **Kmiec Z (2001).** *Cooperation of liver cells in health and disease.* *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 161(III-XIII): 1-151.
- [151] **Weidhase R, Faude K, Weidhase R (1998).** *Hydroxyethylstärke – ein Zwischenbericht.* *Anaesthesiol. Reanimat.* 23: 4-14.

- [152] **Sonntag W, Paulini K (1978).** *Speicherung von Plasmaexpandern im RES.*
Vortrag auf dem internationalen Symposium über 1. Erkennung und Behandlung von Vergiftungen – 2. Arzneitherapie – Fortschritte, Fehler und Gefahren am 3. und 4. März 1978.
- [153] **Kiehl P, Metze D, Kresse H, Reimann S, Kraft D, Kapp A (1998).**
Decreased activity of acid α -glycosidase in a patient with persistent periocular swelling after infusions of hydroxyethyl starch. Br. J. Dermatol. 138: 672-677.

VII Abbildungsverzeichnis

Abb.I- 1: Glucose und Ausschnitt aus Dextran sowie einem an C2 bzw. C6 hydroxyethyliertem Glucosepolymer mit α -1-4 glycosidischer Bindung.	3
Abb.I- 2: Wirkung der Substitution auf das Verhalten von Stärke (stark vereinfacht): das Molekül wird „aufgebläht“ [aus 38].	6
Abb.I- 3: Halblogarithmische Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung mit Angabe der zur Beschreibung der Verteilung verwendeten Molmassenmittelwerte: Zahlenmittel M_n , Molmasse im Peakmaximum M_p und Gewichtsmittelwert M_w	7
Abb.II- 1: Debye Diagramm einer Polymerfraktion. Durch die Auftragung von $K \cdot c / R_\theta$ gegen $\sin^2 (\theta/2)$ wird eine Gerade erhalten, deren Achsenabschnitt $1 / M_w$ ergibt.	28
Abb.II- 2: Schematische Darstellung des Geräteaufbaus der SEC-MALLS-HPLC zur Molmassendetektion.	29
Abb.III- 1: Verlauf der Hämoglobinkonzentration in Prozent vom Ausgangswert vor Infusion nach Verabreichung von 18 mL 6%iger HES in 3 h. Bei signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$) vom Ausgangswert wird der Zeitpunkt mit *(HES 130/0,4), + (HES 450/0,7) bzw. # (HES 200/0,5) gekennzeichnet.	40
Abb.III- 2: Verlauf des Hämatokrit in Prozent vom Ausgangswert vor Infusion nach Verabreichung von 18 mL 6%iger HES in 3h. Bei signifikanten Abweichungen ($p < 0,05$) vom Ausgangswert wird der Zeitpunkt mit *(HES 130/0,4), + (HES 450/0,7) bzw. # (HES 200/0,5) gekennzeichnet.	41
Abb.III- 3: Molmassenverteilungen der zur Infusion eingesetzten HES-Präparate HES 450/0,7, HES 200/0,5 und HES 130/0,4 in halblogarithmischer Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung.	42
Abb.III- 4: M_w der aus den bei der Organentnahme erhaltenen Serumproben isolierten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.	43

- Abb.III- 5:** Mn der aus den bei der Organentnahme erhaltenen Serumproben isolierten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.44
- Abb.III- 6:** Verlauf des Polydispersitätsquotienten der HES im Serum. Ausgangswert und Mw/Mn der aus den direkt nach und an den Tagen 1, 3, 5, 10 und 50 nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 erhaltenen Proben.45
- Abb.III- 7:** Molmassenverteilung von HES (hier HES 130/0,4 und HES 450/0,7) und diese HES nach Abtrennung von der Leber (Methodenvalidierung) in halblogarithmischer Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung. Auch wenn im niedermolekularen Bereich Verunreinigungen vorliegen bleibt die Molmassenverteilung des höhermolekularen Anteils Deckungsgleich, das Peakmaximum (Mp) ändert sich nicht.47
- Abb.III- 8:** Mw der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.49
- Abb.III- 9:** Verschiebung der Peakbegrenzung zur Beurteilung der Molmassenverteilung in der Leber ohne Berücksichtigung der niedermolekularen Anteile, welche durch Störsubstanzen (insb. Glycogen) hervorgerufen sein könnten. ...50
- Abb.III- 10:** Mn der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.51
- Abb.III- 11:** Verlauf des Polydispersitätsquotienten der HES in der Leber. Ausgangswert und Mw/Mn der Molmassenverteilung direkt nach und an den Tagen 1, 3, 5, 10 und 50 nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mit und ohne Peakbegrenzung zum Ausschluss niedermolekularer Anteile, welche unter Umständen durch Störsubstanzen bedingt sind.53
- Abb.III- 12:** Mw der aus den am Versuchsende entnommenen Milzen ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.57

Abb.III- 13: Mn der aus den am Versuchsende entnommenen Milzen ermittelten Molmassenverteilung nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4. Mittelwert \pm SD.58

Abb.III- 14: Verlauf des Polydispersitätsquotienten der HES aus der Milz. Ausgangswert und Mw/Mn der Molmassenverteilung direkt nach und an den Tagen 1, 3, 5, 10 und 50 nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4.59

Abb.III- 15: Vergleich des Mw der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7.61

Abb.III- 16: Vergleich des Mn der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7.62

Abb.III- 17: Molmassenverteilungen der HES aus Serum, Leber und Milz bei einer Ratte 10 Tage nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7 in halblogarithmischer Darstellung der differentiellen Molmassenverteilung.63

Abb.III- 18: Vergleich des Mw der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 200/0,5.64

Abb.III- 19: Vergleich des Mn der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 200/0,5.65

Abb.III- 20: Vergleich der Polydispersitätsquotienten der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 200/0,5.66

Abb.III- 21: Vergleich des Mw der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 130/0,4.67

Abb.III- 22: Vergleich des Mn der in Serum, Leber und Milz gespeicherten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 130/0,4.68

VIII Tabellenverzeichnis

Tab.I- 1: Amylaseaktivität (U/L) vor und nach Infusion von HES 200/0,5 am Menschen und an Versuchstieren [aus 77].	14
Tab.II- 1: Charakterisierung der SEC-HPLC-Säulen für die Bestimmung der Molmassenverteilung der HES.	29
Tab.III- 1: Eigenschaften der HES-Präparate unter Angabe der Herstellerangaben (Mw und MS) sowie der unter Verwendung der SEC-MALLS-HPLC gemessenen Mw, Mn und Mp. Die Molmassenverteilungen der drei HES-Präparate wurden jeweils als Doppelbestimmung in fünf unterschiedlichen Verdünnungen gemessen.	36
Tab.III- 2: Durchschnittsgewichte der Versuchstiere in den einzelnen Versuchsgruppen bei einer Gruppengröße von n = 8.	37
Tab.III- 3: Mp der infundierten HES-Präparate und der HES aus den während der Organentnahme erhaltenen Serumproben nach Infusion von 18 mL 6%iger HES. Darstellung des Mittelwertes \pm SD.	46
Tab.III- 4: Mw (in Da) der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 mit Peakbegrenzung und damit ohne die niedermolekularen Anteile.	50
Tab.III- 5: Mn (in Da) der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 mit Peakbegrenzung und damit ohne die niedermolekularen Anteile.	52
Tab.III- 6: Polydispersitätsquotient (Mw/Mn) der aus den am Versuchsende entnommenen Lebern ermittelten HES nach Infusion von 18 mL 6%iger HES 450/0,7, HES 200/0,5 oder HES 130/0,4 mit Peakbegrenzung und damit ohne die niedermolekularen Anteile.	54
Tab.III- 7: Mp, Ausgangswerte der HES-Präparate und der HES aus der Leber nach Infusion von 18 mL 6%iger HES. Darstellung des Mittelwertes \pm SD.	55
Tab.III- 8: Mp, Ausgangswerte der HES-Präparate und der HES aus der Milz nach Infusion von 18 mL 6%iger HES. Darstellung des Mittelwertes \pm SD.	60

Vitamine (Standard Diät)

Zusatz in 1 kg Diät

Vitamin A	15.000,0 IU	Vitamin D3	600,0 IU
Vitamin E	75,0 mg	Vitamin K3	3,0 mg
Vitamin B1	18,0 mg	Vitamin B2	12,0 mg
Vitamin B6	9,0 mg	Vitamin B12	24,0 µg
Nikotinsäure	36,0 mg	Pantothensäure	21,0 mg
Folsäure	2,0 mg	Biotin	60,0 µg
Cholin	600,0 mg	Vitamin C	36,0 mg

Vitamine (fortified)

Zusatz in 1 kg Diät

Vitamin A	25.000,0 IU	Vitamin D3	1.000,0 IU
Vitamin E	125,0 mg	Vitamin K3	5,0 mg
Vitamin B1	30,0 mg	Vitamin B2	20,0 mg
Vitamin B6	15,0 mg	Vitamin B12	40,0 µg
Nikotinsäure	60,0 mg	Pantothensäure	35,0 mg
Folsäure	3,0 mg	Biotin	100,0 µg
Cholin	1.000,0 mg	Vitamin C	60,0 mg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen herzlich bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. H. Förster für die Überlassung des interessanten Themas, für die großzügige sachliche Unterstützung, welche die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und seine intensive wissenschaftliche und freundliche Betreuung bei der Erstellung dieser Dissertation,

Herrn Prof. Dr. W. Schoner für die engagierte Betreuung dieser Dissertation von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die gewissenhafte Durchsicht des Manuskripts und seinen hilfreichen Anregungen,

Frau Dr. F. Asskali für Unterstützung in der Analytik und ihre fachlichen Ratschläge,

Frau C. Tandi und Herrn Dr. A. Theisen für die Hilfe bei den Tierexperimenten, Herrn Dr. U. Warnken für die intensive fachliche Unterstützung bei der Methodenentwicklung, meinen Kollegen Frau S. Müller und Herrn Dr. G. Lehmann für ihre Unterstützung und dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten, sowie Frau Dr. I. Kurth für die Durchsicht der englischen Summary,

meinen Eltern, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben.

ISBN 3-936815-07-3



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: [Geschaeftsstelle @dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>