

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. Dr. hc. Norbert Roewer

Auswirkung von Infusionslösungen mit  
Hydroxyethylstärke (HES) auf humane  
proximale Tubulusepithelzellen der Niere  
in vitro

*Inaugural — Dissertation*  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der  
Julius – Maximilians – Universität Würzburg

vorgelegt von  
Raphael Romano Bruno  
aus Wuppertal

Erlangen, Dezember 2014

Referent: Professor Dr. Christian Wunder  
Koreferent: Professor Dr. Kai Lopau  
Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2015

Der Promovend ist Arzt

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Infusionstherapie . . . . .	1
1.2	Überblick über verschiedene Infusionslösungen . . . . .	2
1.2.1	Definition der kristalloiden Lösungen . . . . .	2
1.2.2	Definition der kolloidalen Lösungen . . . . .	2
1.2.3	Definition des kolloidosmotischen Druckes . . . . .	3
1.2.4	Physiologische Grundlagen der Volumentherapie mit Kolloiden . . . . .	3
1.2.5	Infusionslösungen in der Volumentherapie . . . . .	5
1.2.6	Kristalloide . . . . .	6
	0,9% NaCl – Lösung . . . . .	6
	Die Ringer – Lösung und ihre Weiterentwicklungen . . . . .	8
	Balancierte Vollelektrolytlösungen . . . . .	10
1.2.7	Kolloide . . . . .	12
	Humanalbumin . . . . .	13
	Hydroxyethylstärke (HES) . . . . .	14
	Dextrane . . . . .	24
	Gelatine . . . . .	25
1.3	Infusionstherapie und das akute Nierenversagen . . . . .	26
1.3.1	Die Wirkung der Infusionstherapie auf die Nierenfunktion . . . . .	26
1.3.2	Exkurs: Die Niere beim kritisch Kranken . . . . .	27
1.4	Hinführung zur Fragestellung . . . . .	30
1.5	Fragestellung . . . . .	31
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
2.1	Herstellung der Versuchslösungen . . . . .	32
2.1.1	Einstellung des pH – Wertes und Bestimmung der Osmolalität . . . . .	34
2.1.2	Auftrennung von HES in einzelne Fraktionen . . . . .	35
2.1.3	Trocknung der HES – Moleküle . . . . .	36
2.1.4	Lösung der HES im Zellmedium . . . . .	36
2.1.5	Dialyse . . . . .	37
2.1.6	Herstellung einer 2% HES – Lösung der einzelnen Fraktionen . . . . .	38
2.2	Zellkultur . . . . .	39

2.3	APTS – Markierung von HES . . . . .	40
2.4	EZ4U – Versuche . . . . .	41
2.4.1	Funktionsprinzip des EZ4U: Durchführung . . . . .	41
2.4.2	Vorteile des EZ4U . . . . .	42
2.4.3	Aussaat der HK – 2 Zellen für den EZ4U . . . . .	43
2.4.4	Weitere EZ4U – Versuche . . . . .	44
	Messung der Interaktion zwischen HES und XTT – Farbstoff . . . . .	44
	Messung der Interaktion zwischen HES und Tetrazoliumsalz . . . . .	44
	Messung der Interaktion zwischen HES und Formazan . . . . .	44
	Stimulation der Zellen mit inflammatorischen Mediatoren . . . . .	45
	Reversibilitätsversuch . . . . .	46
2.4.5	Photometrische Messung der Extinktion . . . . .	47
2.4.6	Auswertung des EZ4U . . . . .	47
2.5	LDH – Versuche . . . . .	48
2.5.1	Funktionsprinzip des LDH – Tests . . . . .	48
2.5.2	Vorbereitung des LDH – Tests . . . . .	49
2.5.3	Durchführung des LDH – Tests . . . . .	49
2.5.4	Auswertung des LDH – Tests . . . . .	49
2.6	Die real-time quantitative RT-PCR . . . . .	50
2.6.1	Funktionsprinzip der real-time quantitative RT-PCR . . . . .	50
2.6.2	Aussaat und Lysis der HK – 2 Zellen für eine qRT – RT – PCR . . . . .	52
2.6.3	Extraktion der RNA . . . . .	53
2.6.4	Gewinnung der cDNA . . . . .	53
2.6.5	Durchführung der qRT – RT – PCR . . . . .	54
2.6.6	Auswertung der qRT – RT – PCR . . . . .	55
2.7	Verwendete Software . . . . .	55
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1	Die Aufnahme von HES in HK – 2 Zellen . . . . .	56
3.2	Bestimmung der Bedeutung der Inflammation . . . . .	58
3.2.1	Auswirkung von TNF $\alpha$ und LPS auf die Zellviabilität . . . . .	58
3.2.2	Die Auswirkung von TNF $\alpha$ auf die Expression inflammatorischer Marker . . . . .	61
3.2.3	Auswirkung von Infusionslösungen in der qRT – RT-PCR . . . . .	62
	Auswirkung von Infusionslösungen auf ICAM-1 . . . . .	63
	Auswirkung von Infusionslösungen auf CCL-2 . . . . .	64
3.2.4	Zusammenfassung der Bedeutung der Inflammation . . . . .	66
3.3	Die Auswirkungen von HES auf die Zellviabilität . . . . .	67

3.3.1	Validierung des EZ4U – Tests . . . . .	67
	Interaktion zwischen HES und dem Reaktant . . . . .	67
	Interaktion zwischen den anderen Versuchslösungen und dem Reaktant . . . . .	69
	Interaktion zwischen HES und dem Produkt . . . . .	69
	Dynamik der Messwerte nach verschiedenen Messintervallen . . . . .	71
3.3.2	Die Auswirkungen der einzelnen Infusionslösungen auf die Zellviabilität . . . . .	72
	EZ4U von Voluven <sup>®</sup> nach 21h . . . . .	73
	EZ4U von Gelafundin <sup>®</sup> nach 21h . . . . .	74
	EZ4U von Humanalbumin nach 21h . . . . .	75
	EZ4U von Sterofundin <sup>®</sup> ISO nach 21h . . . . .	76
	Zusammenfassung: EZ4U der Versuchslösungen nach 21h . . . . .	77
3.3.3	pH – Werte und Osmolalität der Versuchslösungen . . . . .	77
3.3.4	Auswirkungen pH – korrigierter Infusionslösungen auf die Zellviabilität . . . . .	79
	EZ4U pH – korrigiertes Voluven <sup>®</sup> nach 21h . . . . .	80
	EZ4U pH – korrigiertes Gelafundin <sup>®</sup> nach 21h . . . . .	81
	EZ4U pH – korrigiertes Humanalbumin nach 21h . . . . .	83
	EZ4U pH – korrigiertes Sterofundin <sup>®</sup> ISO nach 21h . . . . .	84
	Koinkubation der kolloidalen Lösungen im EZ4U . . . . .	85
	Zusammenfassung: EZ4U pH – korrigierte Versuchslösungen nach 21h . . . . .	86
3.4	Der Einfluss von Trägerlösung und Ursprung von HES auf die Zellviabilität . . . . .	87
	3.4.1 EZ4U mit balanciertem und 0,9% NaCl – HES 130 / 0,4 nach 21h . . . . .	87
	3.4.2 EZ4U mit balanciertem und 0,9% NaCl – HES 130 / 0,42 nach 21h . . . . .	89
	3.4.3 EZ4U mit in Medium gelöstem HES nach 21h . . . . .	90
	3.4.4 EZ4U mit 0,9% NaCl – HES 130 / 0,42 und 0,42 nach 21h . . . . .	91
	3.4.5 EZ4U mit balanciertem HES 130 / 0,42 und 0,4 nach 21h . . . . .	93
3.5	Der Einfluss von HES–Molekülgröße und –Generation auf die Zellviabilität . . . . .	94
	3.5.1 Untersuchung der Viabilität einzelner Fraktionen von 4% Voluven <sup>®</sup> . . . . .	94
	3.5.2 Untersuchung des prozentualen Anteils der einzelnen HES – Fraktionen . . . . .	96
	3.5.3 Untersuchung der Viabilität der einzelnen Fraktionen, die jeweils 2% Voluven <sup>®</sup> enthalten . . . . .	97
	3.5.4 Vergleich verschiedener HES – Generationen . . . . .	99
	3.5.5 Zusammenfassung: Einfluss von Molekülgröße und HES – Generation auf die Zellviabilität . . . . .	102
3.6	Der Einfluss der Inkubationsdauer auf die Wirkung von HES . . . . .	102
3.7	Der Anteil der direkten Zytotoxizität bei der HES – Wirkung . . . . .	105
	3.7.1 Die direkte Zytotoxizität von Volulyte <sup>®</sup> . . . . .	106
	LDH – Test von Volulyte <sup>®</sup> nach 4h . . . . .	106

	LDH – Test von Volulyte <sup>®</sup> nach 24h . . . . .	107
3.7.2	Die direkte Zytotoxizität der anderen untersuchten Infusionslösungen .	108
	LDH – Test von Gelatine <sup>®</sup> nach 24h . . . . .	108
	LDH – Test von Humanalbumin nach 24h . . . . .	109
	LDH – Test von Sterofundin <sup>®</sup> ISO nach 24h . . . . .	110
3.8	Untersuchung der potentiellen Reversibilität der HES – Wirkung . . . . .	111
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>115</b>
4.1	Inkorporation von HES in die proximale Tubulusepithelzelle . . . . .	115
4.2	HES schädigt die Zellen nicht durch Induktion von Inflammation . . . . .	117
4.2.1	ICAM–1 und MCP–1 als inflammatorische Marker . . . . .	117
4.2.2	TNF $\alpha$ und LPS wirken auf HK–2 . . . . .	118
4.2.3	Im EZ4U ist der Einfluss der Inflammation nicht messbar . . . . .	119
4.2.4	HK–2 Zellen können inflammatorisch stimuliert werden . . . . .	120
4.2.5	HES führt bei HK–2 nicht zur Hochregulation inflammatorischer Marker	120
4.2.6	Die negativen Auswirkungen von HES auf proximale Tubulusepithel- zellen <i>in vitro</i> sind nicht durch Inflammation zu erklären . . . . .	121
4.3	HES schädigt die proximale Tubulusepithelzelle <i>in vitro</i> . . . . .	121
4.3.1	Exkurs: Osmotische Nephrose . . . . .	121
4.3.2	Die aktuelle Lehrmeinung . . . . .	124
4.3.3	EZ4U ist geeignet für die Viabilitätsbestimmung von HK – 2 Zellen nach Inkubation mit HES . . . . .	124
4.3.4	HES beeinträchtigt die Zellviabilität proximaler Tubulusepithelzellen <i>in vitro</i> . . . . .	125
4.3.5	Mitochondriale Funktion als Schlüssel beim kritisch Kranken . . . . .	127
4.3.6	Die Koinkubation von HES mit Humanalbumin oder Gelafundin <sup>®</sup> hat keinen Einfluss auf die HES – Wirkung . . . . .	128
4.4	Die Viabilitätsreduktion ist ein gemeinsamer Effekt aller HES – Präparate . .	129
4.4.1	Die verwendeten HES–Konzentrationen sind klinisch relevant . . . . .	129
4.4.2	Auswirkungen des pH – Werts und der Osmolalität auf den HES – Effekt	130
	Der pH – Wert ist nicht ausschlaggebend . . . . .	130
	Die Osmolalität ist nicht ausschlaggebend . . . . .	131
4.4.3	Trägerlösung hat keine relevante Auswirkung . . . . .	131
4.4.4	Die Rolle des Chloridanteils kann <i>in vitro</i> nicht untersucht werden . .	132
4.4.5	Ursprung des HES – Präparates hat keine relevante Auswirkung . . . .	133
4.4.6	Größe des HES – Moleküls hat keine relevante Auswirkung . . . . .	135
	Zusammenhang zwischen Masse und Pathogenität der Fraktionen . . .	136

	HES mit 200 kDa, 70 kDa und 130 kDa im EZ4U vergleichbar . . . . .	137
	HES der 3. Generation ist seinen Vorgängern <i>in vitro</i> nicht überlegen .	138
4.5	Der HES – Effekt ist auch über die Inkubation hinaus messbar . . . . .	138
4.6	Der Reduktion der Zellviabilität durch HES steht vermutlich nur eine verzögerte Zytotoxizität gegenüber . . . . .	139
4.7	Einordnung der Ergebnisse dieser Dissertation in den aktuellen Diskurs . . . . .	141
4.7.1	Osmotische Nephrose geht mit Viabilitätsreduktion und Zellschaden einher . . . . .	141
4.7.2	Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen experimentellen Daten zu HES	141
4.7.3	Vergleich dieser Ergebnisse mit klinischen Studien und Reviews . . . . .	142
	Qualität und Vergleichbarkeit der Studien . . . . .	142
	Große klinische Studien . . . . .	143
	Kleinere klinische Studien . . . . .	146
	Reviews . . . . .	147
4.7.4	Zusammenfassung: Diskrepanz des theoretischen Modells und der klinischen Studien über HES . . . . .	150
	Die <i>in-vitro</i> -Ergebnisse dieser Arbeit und klinische Studien . . . . .	150
4.7.5	Die Anwendungsbeschränkung für HES-haltige Arzneimittel . . . . .	150
4.7.6	Vergleich dieser Ergebnisse mit dem klinischen Einsatz in Deutschland	152
	Einsatz von HES am Universitätsklinikum Würzburg . . . . .	152
	Einsatz von HES in Deutschland . . . . .	154
4.8	Betrachtung der Ergebnisse der anderen Infusionslösungen . . . . .	154
4.8.1	Gelatine – Lösungen zeigen <i>in vitro</i> ähnliche Effekte auf proximale Tubulusepithelzellen . . . . .	154
	Volumenwirksamkeit und therapeutische Äquivalenz von Gelatine und HES umstritten . . . . .	154
	Die Nephrotoxizität von Gelatine wird unterschiedlich beurteilt . . . . .	155
	Gelafundin <sup>®</sup> ist <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> noch nierenschädlicher als HES .	157
4.8.2	Disussion über Humanalbumin . . . . .	158
	Verbleibende Indikation für Humanalbumin . . . . .	159
	Humanalbumin führt zur erhöhten Aluminiumzufuhr . . . . .	161
	Humanalbumin unterscheidet sich in seiner Auswirkung <i>in vitro</i> von den synthetischen Kolloiden . . . . .	161
4.8.3	Sterofundin <sup>®</sup> ISO wirkt <i>in vitro</i> weitgehend inert . . . . .	162
	Stellenwert balancierter Kristalloide zur Volumentherapie umstritten .	162
	Balancierte Kristalloide in Studien 0,9% NaCl überlegen . . . . .	163
	Sterofundin <sup>®</sup> ISO <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nahezu inert . . . . .	164

4.9	Ausblick . . . . .	166
4.9.1	Die Ergebnisse dieser Arbeit im aktuellen Kontext . . . . .	166
4.9.2	Offene Fragen . . . . .	169
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>170</b>
<b>6</b>	<b>Ergänzendes Material</b>	<b>172</b>
6.1	Ein kurzer Abriss über die Geschichte der Infusionstherapie . . . . .	172
6.1.1	Ursprünge der Volumentherapie . . . . .	172
6.1.2	Entwicklung der Kolloide . . . . .	176
6.2	Wie die Nephrotoxizität von HES in den Vordergrund der Diskussion rückte .	178
6.3	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Hydroxyethylstärke . . . . .	180
6.4	Zusätzliche Abbildungen . . . . .	182
6.4.1	Abbildungen zur Studienlage zur Therapie mit Kolloiden, insbesondere zum Einsatz von HES . . . . .	182
6.4.2	Weltweite Verteilung der einzelnen Infusionslösungen . . . . .	184
6.4.3	Zusammensetzung der einzelnen Infusionslösungen . . . . .	185
6.4.4	Andere balancierte Vollelektrolytlösungen . . . . .	188
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>193</b>
	<b>Anhang</b>	<b>219</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema: Volumentherapie mit isotoner Kochsalzlösung . . . . .	4
1.2	Schema: Volumentherapie mit Hydroxyethylstärke . . . . .	5
1.3	Schema: Metabolismus von Acetate . . . . .	11
1.4	Zeichnung: Molekularer Aufbau von Stärke . . . . .	15
1.5	Schema: Chemische Synthese von HES . . . . .	16
1.6	Diagramm: HES vor Weiterverarbeitung . . . . .	19
1.7	Diagramm: HES nach Weiterverarbeitung . . . . .	20
2.1	Diagramm: Zusammensetzung der Infusionslösungen . . . . .	33
2.2	Schema: APTS – Bindungsreaktion nach [Neuhaus et al., 2006a] . . . . .	41
2.3	Schema: Standardablauf des EZ4U – Versuches . . . . .	42
2.4	Zeichnung: XTT – und MTT – Strukturformeln nach [Scudiero et al., 1988] .	43
2.5	Schema: Durchführung des EZ4U zur Reversibilität des HES – Effektes . . . .	47
2.6	Schema: Grundaufbau der Hybridisierungssonden in der qRT – RT – PCR . .	51
2.7	Schema: Funktionsprinzip der Hybridisierungssonden in der qRT – RT – PCR	52
2.8	Formel: ddCt Methode . . . . .	55
3.1	Fluoreszenzbilder: APTS – markiertes HES . . . . .	57
3.2	EZ4U: TNF $\alpha$ nach 21 Stunden . . . . .	59
3.3	EZ4U: LPS nach 21 Stunden . . . . .	60
3.4	qRT – RT – PCR: 100 ng / ml TNF $\alpha$ nach 21 Stunden . . . . .	61
3.5	qRT – RT – PCR: ICAM – 1 nach 21 Stunden Inkubation mit Infusionslösungen	63
3.6	qRT – RT – PCR: CCL – 2 nach 21 Stunden Inkubation mit Infusionslösungen	64
3.7	EZ4U: Bestimmung der Extinktion der Versuchslösungen ohne Zellen . . . . .	68
3.8	EZ4U: Bestimmung der Interaktion des XTT – Farbstoffs und HES . . . . .	70
3.9	EZ4U: Unterschiedliche Messzeitpunkte nach 21 Stunden . . . . .	72
3.10	EZ4U: Einfluss von Voluven <sup>®</sup> ohne pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	73
3.11	EZ4U: Gelafundin <sup>®</sup> ohne pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	74
3.12	EZ4U: Humanalbumin ohne pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	75
3.13	EZ4U: Sterofundin <sup>®</sup> ISO ohne pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	76
3.14	pH–Werte SterofundinISO . . . . .	78
3.15	EZ4U: Voluven <sup>®</sup> mit pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	80

3.16	EZ4U: Gelafundin® mit pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	81
3.17	EZ4U: Humanalbumin mit pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	83
3.18	EZ4U: Sterofundin® ISO mit pH – Korrektur nach 21 Stunden . . . . .	84
3.19	EZ4U: Koinkubation der kolloidalen Lösungen nach 21 Stunden . . . . .	86
3.20	EZ4U: Volulyte® und Voluven® nach 21 Stunden Inkubation . . . . .	87
3.21	EZ4U: Tetraspan® und Venofundin® nach 21 Stunden Inkubation . . . . .	89
3.22	EZ4U: HES in Medium gelöst nach 21 Stunden . . . . .	90
3.23	EZ4U: HES 130 / 0,4 und HES 130 / 0,42 auf 0,9% NaCl – Basis nach 21 Stunden . . . . .	91
3.24	EZ4U: HES 130 / 0,4 und HES 130 / 0,42 in balancierter VEL nach 21 Stunden	93
3.25	EZ4U: HES – Fraktionen von 4% Voluven® nach 21 Stunden . . . . .	95
3.26	Diagramm: Der Anteil der HES – Fraktionen von Voluven® . . . . .	96
3.27	EZ4U: Verschiedene Fraktionen mit derselben Konzentration (2%) von Voluven® nach 21 Stunden . . . . .	98
3.28	EZ4U: HES < 3 kDa mit 20% NaCl nach 21 Stunden . . . . .	99
3.29	EZ4U: 70 kDa, 130 kDa und 200 kDa HES nach 21 Stunden . . . . .	100
3.30	EZ4U: 1,5% 200 kDa, 70 kDa und 130 kDa im Vergleich nach 21 Stunden . .	101
3.31	EZ4U: Der Einfluss der Inkubationsdauer auf Viabilitätsreduktion durch HES .	103
3.32	EZ4U: Viabilitätsreduktion durch Voluven® nach 0 Stunden Inkubation zum Messzeitpunkt 30 Minuten . . . . .	104
3.33	LDH: Volulyte® nach 4 Stunden . . . . .	106
3.34	LDH: Volulyte® nach 24 Stunden . . . . .	107
3.35	LDH: Gelafundin® nach 24 Stunden . . . . .	108
3.36	LDH: Humanalbumin nach 24 Stunden . . . . .	109
3.37	LDH: Sterofundin® ISO nach 24 Stunden . . . . .	110
3.38	EZ4U: Volulyte® mit und ohne Präinkubation nach 21 Stunden . . . . .	112
3.39	EZ4U: Volulyte® mit Präinkubation nach 21 Stunden . . . . .	113
3.40	EZ4U: Volulyte® mit Präinkubation nach 21 Stunden und Medium als Kontrolle	114
4.1	Histopathologische Bilder septischen Rattenniere: HES . . . . .	116
4.2	EM – Bild: Osmotische Nephrose . . . . .	122
4.3	Schema: Rolle der Mitochondrien beim Multiorganversagen . . . . .	127
4.4	Übersicht über Viabilitätswerte von 2% Voluven® und Zytotoxizitätswerte von 2% Volulyte® über die Zeit . . . . .	140
4.5	Übersicht: Verbrauch Hydroxyethylstärke pro Monat im Universitätsklinikum Würzburg . . . . .	153
4.6	Histopathologische Bilder der septischen Rattenniere: Gelafundin® . . . . .	157

4.7	Histopathologische Bilder der septischen Rattenniere: Sterofundin® ISO . . .	165
4.8	Schema: Rolle der Glykokalyx bei der Volumentherapie . . . . .	168
6.1	Diagramm: Übersicht über den weltweiten Einsatz von Infusionslösungen . . .	184
6.2	Diagramm: Übersicht über den weltweiten Einsatz von Kolloiden . . . . .	185

# Tabellenverzeichnis

1.1	Vergleich Acetate und Laktat . . . . .	10
1.2	HES – Präparate: Klassifikation nach Substitutionsgrad . . . . .	17
1.3	HES – Präparate: Vergleich des C2 / C6 Verhältnisses . . . . .	18
1.4	HES – Präparate: Entwicklungsgeschichte . . . . .	22
1.5	HES – Präparate: Molekulare Eigenschaften . . . . .	22
1.6	HES – Präparate: Ursprung und Hersteller . . . . .	23
1.7	Gelatine – Präparate . . . . .	25
1.8	Häufigste Ursachen der akuten Nierenschädigung nach [Uchino et al., 2005] . . . . .	28
2.1	Verwendete Infusionslösungen . . . . .	32
2.2	Verdünnung der HES 130 / 0,4 – Reihe . . . . .	33
2.3	Umrechnung der einzelnen Versuchslösungen in [%] . . . . .	34
2.4	Verdünnung von getrocknetem HES in Zellmedium . . . . .	37
2.5	Versuchslösungen für den XTT – Interaktionstest . . . . .	45
2.6	Herstellung der inflammatorischen Lösungen (Angaben in [%]) . . . . .	46
2.7	cDNA – Kit . . . . .	54
2.8	Thermocycler für cDNA – Herstellung . . . . .	54
3.1	pH – Werte der Versuchslösungen vor deren Korrektur . . . . .	78
3.2	Osmolalität der Versuchslösungen nach 4 Stunden Inkubation . . . . .	79
3.3	Osmolalität der Versuchslösungen nach 21 Stunden Inkubation . . . . .	79
4.1	Physiochemikalische Unterschiede zwischen Voluven <sup>®</sup> und Venofundin <sup>®</sup> . . . . .	134
4.2	Langzeitmortalität [%] der 6S-Studie nach [Perner et al., 2014] . . . . .	144
4.3	Ergebnisse der CRISTAL – Studie zum Einsatz von HES und Ringer-Laktat . . . . .	145
6.1	Übersicht über die Geschichte der Infusionstherapie . . . . .	173
6.2	Zusammensetzung: Tutofusin <sup>®</sup> . . . . .	176
6.3	Zusammenfassung: Diskrepanz des theoretischen Modells und der klinischen Studien über Kolloide . . . . .	183
6.7	Zusammensetzung: 0,9% NaCl – Lösung . . . . .	185
6.8	Zusammensetzung: Ringer – Lösung . . . . .	186
6.9	Zusammensetzung: Ringer-Laktat . . . . .	186

6.10	Zusammensetzung: Sterofundin® ISO . . . . .	187
6.11	Zusammensetzung: Jonosteril® . . . . .	187
6.12	Zusammensetzung: PlasmaLyte® A . . . . .	188
6.4	Auswahl wichtiger klinischer Studien zu HES. <b>Patienten und Indikationen</b> .	189
6.5	Auswahl wichtiger klinischer Studien zu HES. <b>Mortalität</b> . . . . .	190
6.6	Auswahl wichtiger klinischer Studien zu HES. <b>Nierenersatzverfahren</b> . . . .	191
6.13	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	192

# 1 Einleitung

## 1.1 Infusionstherapie

In Krankenhäusern überall auf der Welt sind Infusionsflaschen ein häufiger Anblick. Viele Patienten erhalten während ihres Klinikaufenthaltes aus unterschiedlichen Gründen Flüssigkeit über eine Venenverweilkanüle. Vor allem im Operationssaal, auf der Intensivstation und in der Notfallmedizin sind intravenöse Flüssigkeiten nicht mehr wegzudenken. Die moderne Medizin wird auf diese Weise Tag für Tag von den optisch fast allgegenwärtigen Infusionslösungen begleitet. Der Umstand, dass es sich bei intravenösen Flüssigkeiten aber um Medikamente handelt, wird im klinischen Alltag häufig nur unzureichend wahrgenommen. Auch in der pharmakologischen Ausbildung im Medizinstudium führen sie ein Schattendasein, obwohl im Krankenhaus vermutlich kein anderes Medikament häufiger appliziert wird. Dabei haben die Infusionslösungen – wie andere Pharmaka auch – Indikationen, Kontraindikationen und vor allem eben auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Überspitzt kann man sagen, dass es sich eben nicht nur um ein „bisschen Wasser“, sondern um „echte“ Medikamente handelt [Myburgh and Mythen, 2013]. Die historischen Grundlagen können das Verständnis für die aktuelle Diskussion um die Infusionslösungen erleichtern, da traditionelle und ökonomische Aspekte im Diskurs häufig eine der evidenzbasierten Forschung ebenbürtige Rolle spielen. Ein kurzer Abriss der Geschichte der Infusionstherapie findet sich deshalb im Anhang im Kapitel 6.1 auf Seite 172. Auf die Entwicklungsgeschichte der in dieser Dissertation untersuchten kolloidalen Lösungen wird dort ebenfalls eingegangen. Gerade bei Infusionslösungen ist der Einfluss ökonomischer und historischer Faktoren bei der Herangehensweise und Einordnung von Forschungsergebnissen nicht zu unterschätzen. Im Zentrum dieser Einleitung steht ein Überblick über die nicht nur im klinischen Alltag relevanten, sondern auch bei den später gezeigten Experimenten untersuchten Infusionslösungen. Dabei wird insbesondere auf die Hydroxyethylstärke eingegangen. Abschließend wird geschildert, aus welchem Grund die Interaktion zwischen dem Organ Niere und den Infusionslösungen zum Thema der hier präsentierten Untersuchungen geworden ist.

## 1.2 Überblick über verschiedene Infusionslösungen

Die moderne Infusionstherapie unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Ansätzen bei der Zusammenstellung der Infusionslösungen. Zur Verfügung stehen kristalloide und kolloidale Lösungen. Diese Unterscheidung geht auf T. Graham<sup>1</sup> zurück, die dieser einführte, als er das Prinzip der Dialyse entdeckte [Graham, 1861].

### 1.2.1 Definition der kristalloiden Lösungen

Bei kristalloiden Infusionslösungen handelt es sich um Elektrolyte und / oder Glukose, die in Wasser gelöst sind. Kristalloide enthalten definitionsgemäß keine Makromoleküle [Adams, 2007]. Beim Menschen ist die Konzentration des Kations Natrium ausschlaggebend für die Plasmaosmolarität. Entsprechend kann man kristalloide Lösungen nach dem Natriumgehalt in Voll-, Zweidrittel-, Halb- und Eindrittellösungen einteilen. Daneben existieren auch elektrolytfreie Lösungen (z.B. Glukose 5%) [Thiel and Roewer, 2009]. An dieser Stelle soll nur auf die so genannten „Vollelektrolytlösungen“ eingegangen werden, deren Natriumgehalt zwischen 120 und 160 mmol / l liegt und die damit näherungsweise der Plasmaosmolarität, die bei etwa 290 mosmol / kg H<sub>2</sub>O entspricht. An dieser Stelle ist anzumerken, dass in den USA auch kristalloide Lösungen als „Plasma Expander“ gelten, während dieser Begriff in Deutschland nur für die kolloidalen Lösungen (siehe unten) reserviert ist [Hartog, 2014].

### 1.2.2 Definition der kolloidalen Lösungen

Der Begriff „Kolloid“ kommt vom altgriechischen Wort κολλα für „Leim“ und εις für „Form“. Definitionsgemäß werden so Teilchen bezeichnet, die in einem anderen Medium (bei den Infusionslösungen in Flüssigkeit), dem Dispersionsmedium, verteilt sind. Dabei ist das einzelne Kolloid gewöhnlich zwischen 1 nm und 1 µm groß. Die Bezeichnung „Hydrokolloide“ bedeutet, dass die Teilchen in wässriger Lösung gelöst sind. Bei den Kolloiden handelt es sich mehrheitlich um hochmolekulare Substanzen, die einen onkotischen Druck ausüben. Das bedeutet, dass ihr onkotischer Druck (siehe unten) gleich oder höher ist als der des Plasmas.

---

<sup>1</sup> Thomas Graham, schottischer Chemiker, \*1805 †1869

### 1.2.3 Definition des kolloidosmotischen Druckes

Der onkotische Druck wird auch als „kolloidosmotischer Druck (= KOD)“ bezeichnet. Er beschreibt den Teil des osmotischen Druckes, der durch Kolloide (im Blut hauptsächlich Albumin) ausgeübt wird. Dieser Druck gilt als für die Aufrechterhaltung des intravasalen Volumens essentiell, weil das Gefäßendothel beim Gesunden für kleinmolekulare Plasmabestandteile wie Ionen (unter anderem die Bestandteile der kristalloiden Lösungen) gut permeabel ist. Dadurch würde in diesem theoretischen Modell die osmotische Druckdifferenz ohne Kolloide von alleine ausgeglichen [Silbernagl, 2010]. Kolloide sollen dadurch, dass sie das Endothel nicht passieren können, nicht frei ins Interstitium diffundieren und durch die Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes freie Flüssigkeit intravasal binden können. Die (angenommene) Folge ist eine gute Volumenwirksamkeit und eine – im Vergleich zu Kristalloiden – lange intravasale Verweildauer. Kolloide werden weiter unterteilt in synthetische Kolloide (HES, Gelatine, Dextrane etc.) und „natürliche“ Kolloide (Humanalbumin).

### 1.2.4 Physiologische Grundlagen der Volumentherapie mit Kolloiden: Das Kolloid – Paradigma

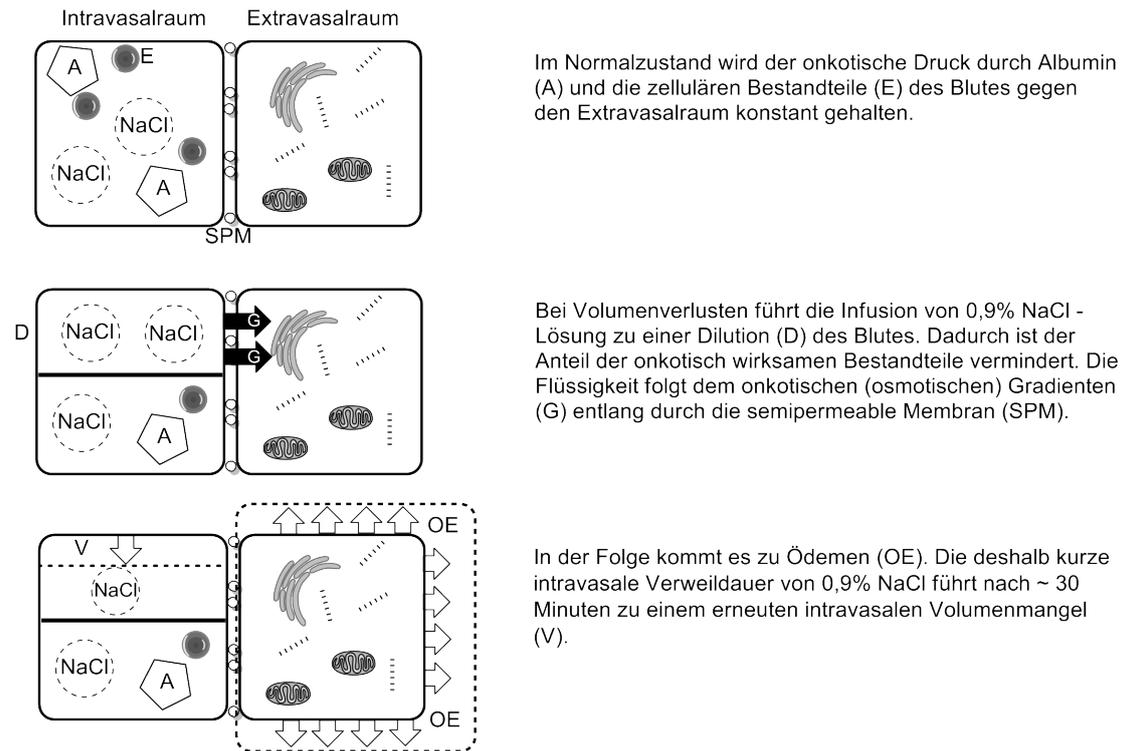
Anhand von zwei sehr vereinfachenden Schaubildern soll die physiologische Grundlage der Infusionstherapie kurz erläutert werden. Dieses auf Starlings<sup>2</sup> und Bayliss<sup>3</sup> Überlegungen zurückgehende Dogma wird zwar zunehmend in Frage gestellt [Koch, 2013] [Ragaller M, 2009], stellt aber für viele klinische Anwender immer noch die theoretische Grundlage für die Notwendigkeit der Anwendung kolloidaler Infusionslösungen dar. Das „Kolloid – Paradigma“ wurde von Bayliss bei seinen Erfahrungen mit Gummi arabicum 1920 aufgestellt [Bayliss, 1920]. Es besagt, dass nur Kolloide in der Lage sind, den intravaskulären kolloidosmotischen Druck zu stabilisieren (siehe oben). Dieses Paradigma wurde bis in die 1990er Jahre verhältnismäßig unreflektiert konserviert und dient zahlreichen Beteiligten noch immer als Grundlage bei der Diskussion über die Notwendigkeit des Einsatzes von Hydroxyethylstärke. Wie in der Diskussion dieser Arbeit erläutert werden wird, konnten sich diese theoretischen Überlegungen aber in den großen klinischen Studien nicht bestätigen, da sich herausstellte, dass auch Kristalloide diese Aufgaben erfüllen können.

---

<sup>2</sup>Ernest Henry Starling, britischer Physiologe,\*1866 †1927

<sup>3</sup>Sir William Maddock Bayliss, britischer Physiologe,\*1860 †1924

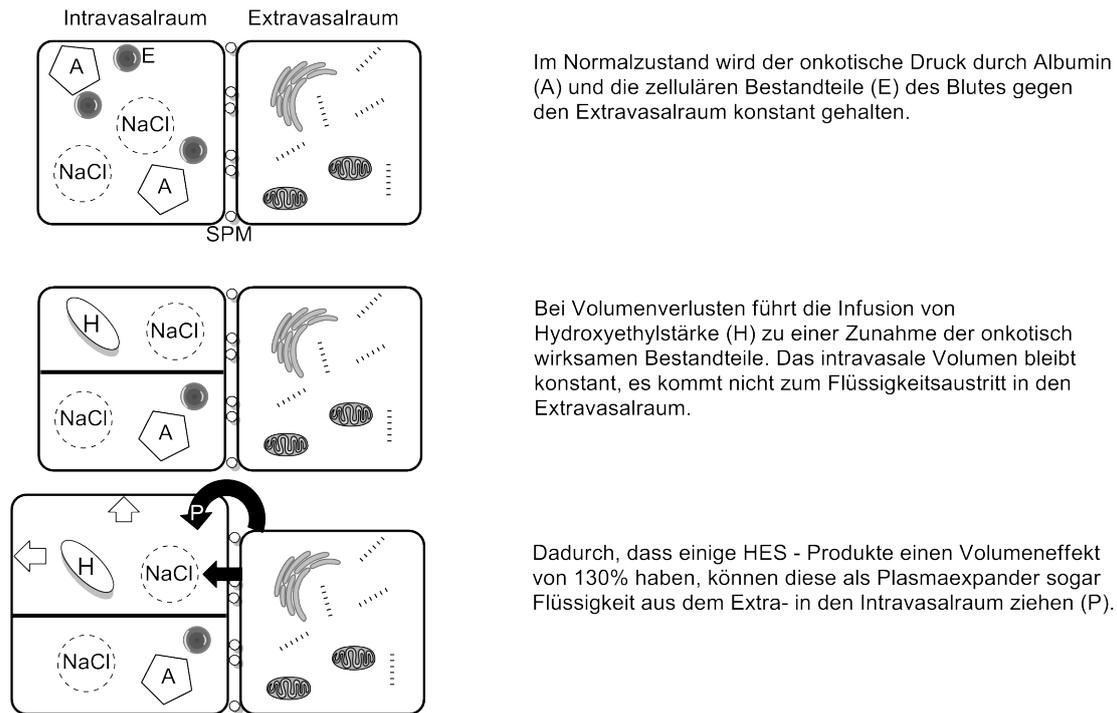
## 1 Einleitung



**Abb. 1.1:** Dargestellt ist die physiologische Grundüberlegung zur Volumentherapie mit einer kristalloiden Infusionslösung (exemplarisch 0,9% NaCl).

Gemäß dem Dogma von Bayliss und Starling [Starling, 1896] sind kristalloide Lösungen (Abbildung 1.1) in der Theorie aufgrund ihres Mangels an osmotisch wirksamen Bestandteilen nicht zur dauerhaften hämodynamischen Stabilisierung geeignet. Durch die – theoretisch – äußerst kurze Halbwertszeit [Kretz and Teufel, 2006] und den deshalb häufig etwa vierfach höher eingeschätzten Volumenbedarf (im Vergleich zur selben Menge an Kolloiden) [Larsen, 2011] komme es deshalb zur „Überinfusion“ von Flüssigkeit. Diese rufe wegen des raschen Austritts aus dem Intravasalraum in der Folge ubiquitäre Ödeme hervor [Marjanovic et al., 2010] [Jungner et al., 2010]. Die damit einhergehende stark positive Flüssigkeitsbilanz kann einen negativen Einfluss auf die Prognose von Intensivpatienten haben, wie zum Beispiel Cerda et al. und Payen et al. demonstrieren konnten [Cerda et al., 2010] [Payen et al., 2008]. In diesem theoretischen Modell sollen kolloidale Lösungen demgegenüber durch ihre osmotisch wirksamen Bestandteile den Intravasalraum stabilisieren und den parenteralen Volumenbedarf senken (Abbildung 1.2).

## 1 Einleitung



**Abb. 1.2:** Dargestellt ist die physiologische Grundüberlegung zur Volumentherapie mit einer kolloidalen Infusionslösung (exemplarisch Hydroxyethylstärke).

### 1.2.5 Infusionslösungen in der Volumentherapie

Oft wird betont, dass diese beiden Arten von Infusionslösungen – Kristalloide und Kolloide – nicht in Konkurrenz zu einander stünden, sondern viel mehr als sich gegenseitig ergänzende Konzepte zu betrachten seien. So haben beide strenge Indikationen und Kontraindikationen. Vor allem in Europa gilt der Volumenersatz als Domäne der Kolloide. Demgegenüber gilt die Flüssigkeitstherapie als primäre Aufgabe der kristalloiden Infusionslösungen. Dieser Form der Arbeitsteilung findet sich in den gängigen deutschen Lehrbüchern [Thiel and Roewer, 2009]. Dabei unterscheidet sich allerdings die Verbreitung verschiedener Typen von Infusionslösungen von Land zu Land stark. Beispielsweise werden in den USA und in Neuseeland nach wie vor kristalloide Infusionen zur Volumenersatztherapie angewandt, wie eine Untersuchung von Finfer et al. zeigte [Finfer et al., 2010]. Auch innerhalb der Kolloide finden sich höchst unterschiedliche Verteilungen. So wird in Großbritannien und Australien vermehrt auf Gelatine zurückgegriffen, während in zentraleuropäischen Ländern Hydroxyethylstärke dominiert [Finfer et al., 2010]. Im Anhang findet sich auf Seite 184 in Abbildung 6.1 eine an Finfer et al. [Finfer et al.,

2010] orientierte Darstellung des länderspezifischen Einsatzes von Kolloiden, Kristalloiden und Blutprodukten. Auf Seite 185 ist hingegen in Abbildung 6.2 der spezifische Anteil der verschiedenen Kolloide dargestellt. Die Situation in Deutschland wird in der Diskussion in Abschnitt 4.7.6 auf Seite 152 dargelegt.

### 1.2.6 Kristalloide

In diesem Kapitel werden kurz die Unterschiede und Gemeinsamkeiten einer Auswahl gängiger kristalloider Infusionslösungen besprochen.

#### Übersicht Kristalloide

- NaCl 0,9%
- Ringer – Lösung
- Ringer – Laktat
- Balancierte Vollelektrolytlösung (z.B. Sterofundin® ISO)

Eine Gemeinsamkeit fast aller kristalloider Infusionslösungen ist, dass sie aus galenischen Gründen einen niedrigen pH-Wert haben. Die Folgen davon sind im Weiteren auf Seite 8 ausführlich beschrieben verdeutlicht.

#### 0,9% NaCl – Lösung

**Beschreibung:** Die weltweit (vor allem in den USA und Australien) gebräuchlichste kristalloide Infusionslösung ist die so genannte „isotone Kochsalzlösung“ [Awad et al., 2008]. Diese stellt in gewisser Weise den Archetypus der Infusionslösungen dar. Trotzdem ist sie keineswegs „physiologisch“, obwohl sich der Begriff der physiologischen Kochsalzlösung im allgemeinen Sprachgebrauch zum Teil hartnäckig hält. Durch ihren  $\text{Na}^+$  – Gehalt von 154 mmol/l und  $\text{Cl}^-$  von 154 mmol/l hat sie eine deutlich höhere Natriumkonzentration und Chloridkonzentration als das Plasma (vgl. Tabelle 6.7). Andere Elektrolyte enthält die Kochsalzlösung nicht. Als „isoton“ bezeichnet man die 0,9% NaCl – Lösung, weil sie mit einer Osmolarität von 308 mmol/l näherungsweise der Plasmaosmolarität entspricht.

**Indikationen:** Der Einsatz von isotoner Kochsalzlösung in größerer Menge ist – in Deutschland – stark eingeschränkt, während der Gebrauch in den USA so groß ist, dass die FDA (Food and Drug Administration) im April 2014 wegen des hohen Bedarfs

## 1 Einleitung

sogar über ausgeprägte Lieferproblemen berichtete<sup>4</sup>. In Deutschland gibt es nur noch Ausnahmen, die eine Flüssigkeits— oder Volumentherapie mit 0,9% NaCl – Lösung notwendig machen. Ein extrazellulärer Volumenmangel, der mit einer Hyponatriämie oder einer Hypochlorämie einhergehen kann, könnte eine solche Ausnahme sein, da beide durch die NaCl – Zufuhr ausgeglichen werden können. Eine andere in der Praxis häufigere Konstellation ist die perioperative Flüssigkeitssubstitution bei einem (dialysepflichtigen) niereninsuffizienten Patienten. Dabei wird häufig angeführt, dass durch die eingeschränkte Nierenfunktion die Gabe von kaliumhaltigen Infusionslösungen eine Gefahr darstellen könne, da die Niere nicht mehr in der Lage ist, selbstständig den Kaliumspiegel effektiv zu senken. In einem solchen Fall könnte 0,9% NaCl von Vorteil sein, da diese die bisher einzige isotone kristalloide Infusion ohne Kaliumgehalt darstellt [Thiel and Roewer, 2009]. Sowohl die Evidenz als auch das zugrundegelegte theoretische Modell für dieses Procedere ist jedoch äußerst schwach. Bei Infusion von 1 l einer balancierten Vollelektrolytlösung (siehe unten) werden dem Patienten nur 4 – 5 mmol Kalium infundiert. Dies entspricht weniger als einem Zwanzigstel der bei normaler Diät aufgenommenen Kaliummenge [Kümpers, 2015]. Umgekehrt beobachteten Khajavi et al. im Rahmen nach Gabe von kaliumfreier 0,9% NaCl – Lösung im Rahmen von Nierentransplantationen eine erhöhte Inzidenz von Hyperkaliämien im Vergleich zu Ringer – Laktat [Khajavi et al., 2008]. Eine prospektive Studie von O Malley et al. mit demselben Setting musste aus Sicherheitsgründen abgebrochen werden, da unter 0,9% NaCl – Gabe nicht nur häufiger Hyperkaliämien, sondern auch metabolische Azidosen auftraten [O'Malley et al., 2005]. Einzelne Universitätskliniken – wie die Universitätsklinik Münster – sind aus diesen Gründen dazu übergegangen, die „unphysiologische“ Kochsalzlösung nicht mehr einzusetzen [Kümpers, 2015]. Daneben kann die 0,9% NaCl – Lösung als Trägersubstanz zum Aufziehen verschiedener Medikamente dienen, da sie – anders als Vollelektrolytlösungen – kein Calcium enthält [Karow, 2013].

**Probleme:** Die Gabe von 0,9% NaCl – Lösung in größeren Mengen beinhaltet das Risiko einer hyperchlorämischen Azidose [Handy and Soni, 2008] und der Dilutionsazidose [Larsen, 2011]. Letztere tritt auf, weil durch Infusion von 0,9% NaCl das Bikarbonat verdünnt werden und so dessen Pufferkapazitäten vermindert werden. Dabei gilt gerade der Bikarbonatpuffer als wichtigstes Puffersystem im Säure – Basen – Haushalt des Menschen. In der Folge kann es durch diese Dilution durch eine Verschiebung

---

<sup>4</sup><http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm382255.htm>, [Stand: 27.05.2014, 09:23]

## 1 Einleitung

des pH-Wertes zur Azidose kommen [Thiel and Roewer, 2009]. Es gibt Untersuchungen, dass 0,9% NaCl im Vergleich zu balancierten Vollelektrolytlösungen wegen seines schlechteren „metabolischen Profils“ als nierenschädigender sein könnte [Hadimioglu et al., 2008]. Die Dilutionsazidose gilt als eine der Ursachen für die Notwendigkeit von Weiterentwicklungen der Kochsalzlösung [Thiel and Roewer, 2009].

### Die Ringer – Lösung und ihre Weiterentwicklungen

**Beschreibung:** Die Ringer-Lösung stellt eine Weiterentwicklung der isotonischen Kochsalzlösung dar. Die nach ihrem Erfinder<sup>5</sup> benannte Ringer – Lösung<sup>6</sup> kommt der Elektrolytzusammensetzung des Blutplasmas deutlich näher als die 0,9% NaCl – Lösung (vgl. Tabelle 6.8 auf Seite 186 im Anhang). Sie enthält Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium und Chlorid [Hartmann, 1932].

**Die Entwicklung der balancierten Lösungen:** Hartmann<sup>7</sup> hatte bei seiner Tätigkeit als Pädiater beobachtet, dass unter Diarrhoe leidende Kinder nach Infusion konventioneller kristalloider Flüssigkeit verstarben, weil sie eine hyperchlorämische Azidose entwickelt hatten. Das Problem bei der ursprünglichen Ringer – Lösung war, dass sie – wie 0,9% NaCl – zuviel Chlorid, nämlich 156 mmol/l, enthielt. Die Lösungen Ringer – Laktat und Ringer – Laktat nach Hartmann stellen in dieser Hinsicht wichtige Weiterentwicklungen dar, weil sie „balanciert“ waren. Der Begriff „balanciert“ bedeutet, dass die bei physiologischer Konzentration von Natrium und Chlorid entstehende Anionenlücke durch Zugabe metabolisierbarer Anionen geschlossen wird und dadurch eine Isotonie der Lösung erreicht wird. Hartmann modifizierte die Ringer – Laktat Lösung noch einmal leicht, indem er den Gehalt an Kalium (5 mmol/l statt 5,4 mmol/l) und Calcium (1 mmol/l statt 1,8 mmol/l) reduzierte, während er dafür 1 mmol/l Magnesium hinzufügte.

**Metabolisierende Anionen:** Um die Induktion dieser Azidose zu verhindern, müssen dem Plasma mit der Flüssigkeit auch Puffer zugeführt werden. Ein zusätzliches Problem dabei ist, dass kristalloide Infusionslösungen aus galenischen Gründen im azidotischen pH-Bereich liegen. Die Infusion von kristalloiden Lösungen müsste also theoretisch

---

<sup>5</sup>Sydney Ringer, englischer Pharmakologe und Kliniker, Professor am University College Hospital in London, \*1836 †1910

<sup>6</sup>Im angelsächsischen Raum auch „Locke – Ringer Lösung“, nach F. S. Locke, englischer Physiologe, \*1871 †1949

<sup>7</sup>Alexis Hartmann, amerikanischer Pädiater an der Washington University School of Medicine, \*1898 †1964

## 1 Einleitung

dazu führen, dass der Blut pH-Wert von Patienten, die oft krankheitsbedingt schon zur Azidose neigen, noch weiter absänke. Der Infusionslösung müssen also Puffer zugesetzt werden.

Das Problem dabei ist, dass Bikarbonat den Infusionslösungen nicht als Puffer zugesetzt werden kann. Die Ursache dafür ist wieder der niedrige pH-Wert der Infusionslösungen<sup>8</sup>. Gäbe man  $\text{HCO}_3^-$  in eine Lösung mit einem pH-Wert niedriger als 6,1, zerfiel das  $\text{HCO}_3^-$  in  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$ . Wäre der pH-Wert alkalischer, so fiel  $\text{HCO}_3^-$  mit Calcium oder Magnesium zu unlöslichem Calcium- oder Magnesiumkarbonat aus. Zur Lösung dieses Problems enthält die Ringer-Laktat Lösung Laktat (Salz der Milchsäure). Dieses Laktat dient dem Organismus als metabolisierbares Anion. Das heißt, dass die Leber unter  $\text{O}_2$ -Verbrauch dieses Anion zu Bicarbonat verstoffwechseln und so zur Pufferung beitragen kann. Auf diese Weise können größere Mengen von Ringer-Laktat infundiert werden, ohne dass der pH-Wert des Blutes abfällt, wie es durch 0,9% NaCl der Fall ist [Williams et al., 1999].

**Probleme der Laktat – Applikation:** Der Wert des Laktats (Normwert: 5–20 mg / dl) aus einer venösen Blutabnahme wird in der Intensivmedizin als Parameter eines anaeroben Stoffwechsels bei kritisch kranken Patienten verwendet [Callaway et al., 2009] [Rixen et al., 2001]. Es erlaubt eine Einschätzung der peripheren Sauerstoffunterversorgung und gilt als diagnostischer Parameter für den Schweregrad und die Mortalität im Schock [Bakker et al., 1996]. Die Validität einer Laktat – Messung ist bei einem Patienten, dem Ringer-Laktat infundiert wurde, eingeschränkt bis nicht verwertbar. Außerdem wird der Einsatz von Laktat beim kritisch Kranken häufig stark eingeschränkt, da die Verstoffwechslung eine uneingeschränkte Leberfunktion erfordert (siehe Abbildung 1.1 auf Seite 10).

**Indikationen:** Ringer-Laktat wird weltweit eingesetzt zur Deckung des basalen Flüssigkeitsbedarfes, zum Ersatz geringer Volumenverluste, zur Flüssigkeitssubstitution bei iso- und hypotoner Dehydratation und als Flüssigkeitsersatz bei extrazellulärem Volumendefizit. Seine Halbwertszeit liegt – nach Lehrbuch – bei etwa 25 Minuten [Kretz and Teufel, 2006].

---

<sup>8</sup> Eine Ausnahme ist Gelifundol<sup>®</sup> (= 5,5% Oxypolygelatin) von Biotest Pharma, Dreieich, Deutschland. Diese enthält  $\text{HCO}_3^-$

### Balancierte Vollelektrolytlösungen

Die balancierte Vollelektrolytlösung stellt den pharmazeutischen Versuch dar, den Elektrolytverhältnissen des Blutplasmas möglichst nahe zu kommen. Dabei besitzt die balancierte Vollelektrolytlösung gegenüber der Ringer–Laktat Lösung (siehe Kapitel 1.2.6) einige Modifikationen. Im Folgenden werden die Eigenschaften von Sterofundin<sup>®</sup> ISO von B. Braun Melsungen AG als exemplarische Vollelektrolytlösung beschrieben. Die genaue Zusammensetzung von Sterofundin<sup>®</sup> ISO findet sich im Anhang in Abbildung 6.10 auf Seite 187.

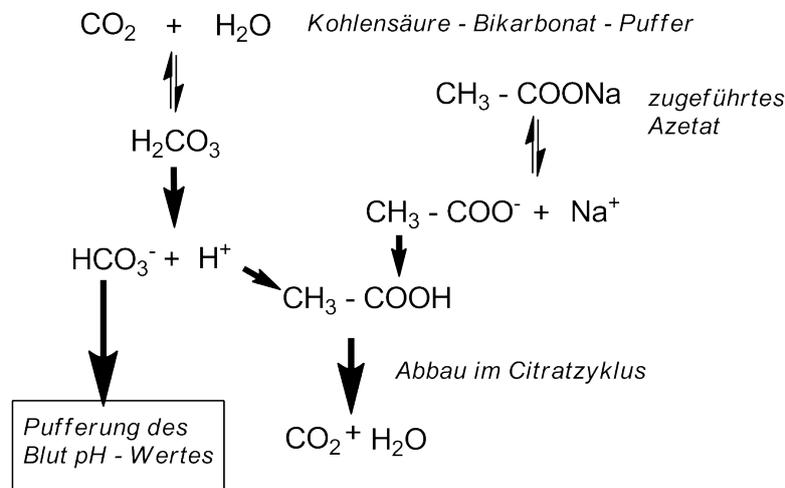
**Metabolisierbare Anionen:** Als metabolisierbare Anionen enthält Sterofundin<sup>®</sup> ISO Acetate (Salz der Essigsäure) und Malat (Salz der Apfelsäure). Die daraus resultierenden Vorteile gegenüber dem Laktat der Ringer – Lösung sind in Tabelle 1.1 dargestellt, die aus „Flüssigkeitstherapie“ von Zander übernommen wurde [Zander et al., 2007].

**Tabelle 1.1:** Vergleich Acetate und Laktat

Effekt	Acetate	Laktat
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> – Bildung	15 Min	verzögert
O <sub>2</sub> – Verbrauch	normal	gesteigert
Respiratorischer Quotient	0,5	0,67
Glukoneogenese (Leber)	normal	gesteigert
Hyperglykämie (Diabetes)	normal	gesteigert
Bindung von ionisiertem Kalzium	nein	ja
Laktat als Hypoxiemarker	ja	nein
<b>Metabolisierende Organe</b>		
normal	alle	Leber
im Schock	alle	nein

Über den Einsatz von Acetate als metabolisierbares Anion wurde erstmals 1910 beim Kampf gegen die Cholera berichtet [Cash et al., 1969]. Seit 1964 wird es für die Hämodialyse verwendet [Mion et al., 1964]. In diesem Rahmen wurde nach massiver Infusion von Acetate auch über systemische Nebenwirkungen in Form einer Vasodilatation berichtet. Die Datenlage dazu ist uneinheitlich. Im Rahmen der Infusionstherapie mit acetate – haltigen Lösungen wie Sterofundin<sup>®</sup> ISO gelten kardiozirkulatorische Nebenwirkungen aber als unwahrscheinlich [Zander et al., 2007]. Acetate und Malat

gelten als gleichwertige metabolisierbare Anionen. Um 1 mol  $\text{HCO}_3^-$  aus 1 mol Acetate zu gewinnen, werden 2 mol  $\text{O}_2$  benötigt. Malat hingegen benötigt dafür nur 1 mmol  $\text{O}_2$ . Der Vorteil des Acetates liegt in einer schnelleren Verstoffwechslung.



**Abb. 1.3: Metabolismus von Acetate.** Nach Infusion des metabolisierbaren Anions Acetate nimmt dieses das  $\text{H}^+$  aus dem Kohlensäure – Bikarbonat – Puffer auf. Die entstehende Essigsäure wird anschließend im Citrat – Zyklus zu Wasser und  $\text{CO}_2$  verstoffwechselt. Abbildung nach [Zander et al., 2007].

Da nicht alle Kliniken die gleichen kristalloiden Lösungen verwenden, werden die übrigen gebräuchlichen balancierten Vollelektrolytlösungen auf Seite 188 in Abschnitt 6.4.4 im Anhang kurz vorgestellt.

**Unerwünschte Arzneimittelwirkungen:** Nach Roewer et. al weisen balancierte Vollelektrolytlösungen drei wichtige Hauptnebenwirkungen auf [Wunder, 2012]: Die **Dilutionshypoproteinämie** kann dadurch entstehen, dass durch die Dilution des Plasma dessen kolloidosmotisch wirksamen Bestandteile relativ zum Gesamtvolumen abnehmen. Nach Starling wird dadurch die Extravasation von Flüssigkeit begünstigt [Starling, 1896]. Es kann in der Folge, wie oben bereits dargelegt, zu Ödemen kommen. Für die **Dilutionsazidose** ursächlich ist, dass alle Kristalloide – wie oben erläutert – kein Bikarbonat enthalten. Unabhängig von der Zugabe der metabolisierbaren Anionen kann es vorkommen, dass durch die Verdünnung des körpereigenen Bikarbonat-Anteils eine Azidose entsteht. Diese sind nach Roewer von folgenden vier Faktoren abhängig:

1. Infusionsmenge und -geschwindigkeit
2. Nierenfunktion

### 3. Leberfunktion

#### 4. Art und Konzentration der zugeführten Anionen [nach [Wunder, 2012], S. 87]

Am deutlichsten falle die Dilutionsazidose nach Applikation von 0,9% NaCl aus (siehe oben). Die so genannte **Post-Infusionsalkalose (= Rebound-Alkalose)** kann dadurch verursacht werden, dass balancierte Vollelektrolytlösungen nach „passagerer Azidifizierung“ [Wunder, 2012] auch nach längerer Verzögerung durch die Verstoffwechslung der metabolisierbaren Anionen bei gleichzeitig supprimierter Leberfunktion einen starken Basenüberschuss entstehen lassen. Die Konsequenzen dieses nach Roewer et al. nicht seltenen Phänomens können eine (Links-)Verschiebung der  $O_2$  – Bindungskurve, eine kompensatorische Hypoventilation, eine Abnahme des ionisierten Calciums und vieles mehr sein [Wunder, 2012].

**Indikationen:** Die Indikationen für balancierte Vollelektrolytlösungen sind umstritten. Während einige Länder und Autoren balancierte Vollelektrolytlösungen sowohl zur Flüssigkeitstherapie als auch zum Volumenersatz einsetzen, nutzen andere diese im Rahmen der Volumensubstitution nur als Ergänzung zu kolloidalen Lösungen. Die S2k-Leitlinie zur Sepsis erteilt eine Empfehlung des Grades „B“ zum Einsatz kristalloider Lösungen als Volumenersatz zur hämodynamischen Stabilisierung [F.M. Brunkhorst, 2010].

### 1.2.7 Kolloide

Kolloide unterscheiden sich von Kristalloiden durch die Anwesenheit von Makromolekülen (siehe Definition in Abschnitt 1.2.1 oben).

Im Folgenden werden die Kolloide

- Humanalbumin
- Hydroxyethylstärke
- Dextrose
- Gelatine

kurz vorgestellt. Dabei liegt der besondere Schwerpunkt auf der Darstellung der Hydroxyethylstärke.

### Humanalbumin

**Beschreibung:** Albumin ist ein in der Leber gebildetes Plasmaprotein. Es handelt sich um ein so genanntes „natürliches Kolloid“, weil es nicht synthetisch hergestellt, sondern aus dem gepoolten (= durch Zusammenführung verschiedener Plasmaspenden) Plasma gesunder Spender gewonnen wird. Deshalb zählt Humanalbumin zu den Blutprodukten. Entsprechend muss die Aufbereitung mit großem Aufwand betrieben werden, um potentielle Infektionsübertragungen zu verhindern. Dies geschieht unter anderem durch eine Pasteurisierung bei 60 °C über mindestens 10 Stunden. Auf diese Weise hat Humanalbumin das geringste Infektionsrisiko aller nicht – rekombinant gewonnener Blutprodukte [Lang-Roth and Karow, 2005]. Es stellt dadurch auch das mit Abstand teuerste Kolloid dar. Genauere Details dazu finden sich ausführlich bei Thiel et al. [Thiel and Roewer, 2009]. Am Ende müssen mindestens 95% Albuminmonomere (= Reinheitsgrad) enthalten sein. Das so aufbereitete Humanalbumin enthält herstellungsbedingt bis zu 200 µg/l Aluminium. Diese Grenze entspricht dem gerade als toxisch festgesetzten Grenzwert. Der Aluminiumgehalt des Plasmas ist 20 –fach niedriger als der eines Humanalbumin – Präparates.

**Molekulare Eigenschaften des Humanalbumins:** Das Molekül ist aus etwa 580 Aminosäuren aufgebaut. Es ist unter physiologischen Bedingungen für etwa 80% des onkotischen Plasmasdruckes verantwortlich [Vincent and Gottin, 2011]. Sein mittleres Molekulargewicht liegt bei 66 550 Da. Seine normale Konzentration im Serum liegt bei 35 bis 55 g/l. Es stellt somit 55 – 67 % aller Plasmaproteine. Humanalbumin transportiert wasserunlösliche Stoffe und kann durch seine ampholytischen Eigenschaften eine gewisse Pufferkapazität im Blut ausüben [Schmidt and Unsicker, 2003]. Das für die Infusionstherapie vorgesehene Humanalbumin hat meist eine Konzentration von 5%, während das für eine gezielte Albuminsubstitution hergestellte 20% enthält. Problematisch ist, dass Humanalbumin die endogene Albuminsynthese in der Leber (0,2 g/kg Körpergewicht / Tag) hemmt.

**Darreichungsform des Humanalbumins:** Humanalbumin ist käuflich zu erwerben als z.B. Human Albumin Baxter 50 g/l von der Firma Baxter. Als Trägerlösung dient eine Natrium – Chlorid Lösung (Na: 120 – 160 mmol/l, Chlorid: 100 – 150 mmol/l). Es gilt damit als „in etwa plasmaisoton“ und isoonkotisch [Thiel and Roewer, 2009]. Zwar beträgt die Plasmahalbwertszeit von 5% Humanalbumin nur wenige Stunden, durch die tubuläre Rückresorption nach glomerulärer Filtration kann die biologische

## 1 Einleitung

Halbwertszeit aber bei intakter Nierenfunktion auf durchschnittlich 21 Tage verlängert werden. Erst mit dem Verlust biologischer Funktionsfähigkeit wird Humanalbumin in der Leber abgebaut. Humanalbumin stellt das einzige Kolloid dar, dessen *in – vitro* Molmasse mit der *in – vivo* Molmasse übereinstimmt.

**Einsatzgebiete des Humanalbumins:** Humanalbumin wird weltweit unterschiedlich eingesetzt und beurteilt. Während es in den USA zum Teil als Plasmaexpander der 1. Wahl bei Hypovolämie eingesetzt wird [Investigators et al., 2011], ist die Indikation in Deutschland aktuell unklar. In der Querschnitts–Leitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten ist das Kapitel „Humanalbumin“ aktuell noch ausgesetzt. Die Ursache dafür liegt im „sehr gravierenden wissenschaftlichen Fehlverhalten durch den Mitautor (sic) Prof. Dr. J. Boldt (...)“<sup>9</sup>. In Deutschland spielt Humanalbumin vor allem bei Patienten mit Leberzirrhose, nach Parazentese und im Rahmen des hepatorenenalen Syndroms eine Rolle. Beim nephrotischen Syndrom hingegen wird der Einsatz aktuell nicht empfohlen [Karow, 2013]. Die S2k–Leitlinie Sepsis empfiehlt, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis beziehungsweise septischem Schock eine Gabe von Humanalbumin erwogen werden könne (Empfehlung Grad E, (‘Evidenz’grad V: Expertenmeinung) [F.M. Brunkhorst, 2010].

### Hydroxyethylstärke (HES)

Die Hydroxyethylstärke (= HES, auch HAES) ist ein künstliches Kolloid, das aus Wachsmaisstärke oder Kartoffelstärke (siehe dazu Tabelle 4.1 auf Seite 134) gewonnen wird. Die Nomenklatur der vielen verschiedenen HES – Präparate ist kompliziert. Sie gibt wichtige Informationen über den molekularen Aufbau des HES – Präparates und den daraus folgenden pharmakokinetischen und – dynamischen Eigenschaften.

**Die Entdeckung von HES:** HES wurde bereits 1934 von W. Ziese erstmals hergestellt [Ziese, 1934] [Ziese, 1935]. Damals wurde HES allerdings in erster Linie für industrielle Zwecke erforscht und erst im Jahr 1956 begannen Husemann und Resz [Resz, 1956], HES als „Modellsubstanz für Amylase zum Studium fermentativen Abbaus und zur Feststellung etwaigen Abbaus bei verschiedenen Reaktionen“ zu synthetisieren<sup>10</sup>. Ende der 1950er Jahre verwendete Wiedersheim HES unter dem Namen „Oxyethylstarch“ auf experimenteller Ebene zur therapeutischen Anwendung [Wiedersheim, 1957]. Daraufhin

<sup>9</sup>Deutsches Ärzteblatt, Jg. 108, Heft 1–2, A 58, 10. Januar 2011

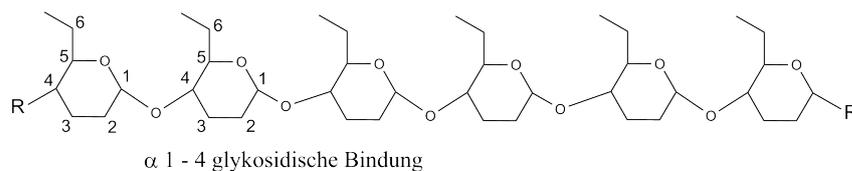
<sup>10</sup>Information aus Patent „DE 2814032 C2“, online unter <http://www.google.ca/patents/DE2814032C2?c1=de>, [Stand: 27.05.2014, 11:29]

## 1 Einleitung

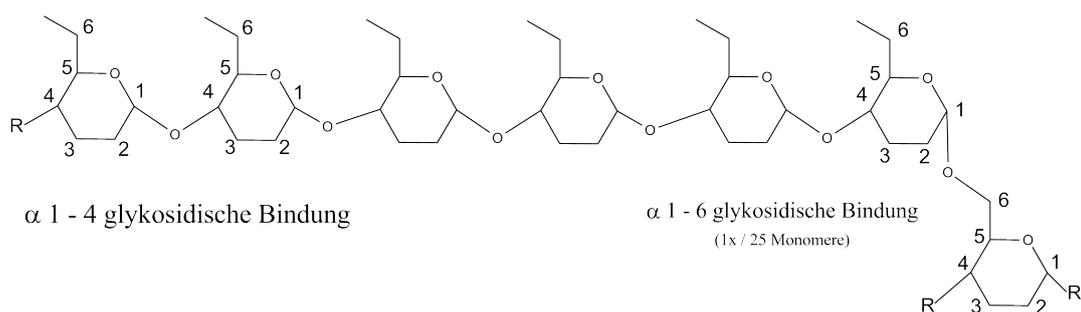
wurde HES hinsichtlich seiner Eignung im hämorrhagischen Schock in den 1960er Jahren zunächst am Hundemodell erprobt [Ballinger et al., 1966] [Vineyard et al., 1966]. Parallel dazu wurden begannen klinische Versuche am Menschen [Ballinger et al., 1966]. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei dem Ausschluss relevanter Antigenität des HES, da man Anfang bis Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts große Probleme mit allergischen Reaktionen nach Gabe synthetischer Kolloide beobachtet hatte (siehe dazu Abschnitt 6.1.2 auf Seite 176) [Brickman et al., 1966]. Eine der ersten großen Studien im klinischen Einsatz fand bis 1968 in Ibadan in Nigeria durch Solanke et al. an 29 Patienten statt [Solanke, 1968]. Dabei wurde neben der Verträglichkeit von HES auch die Wirkung im Schock im Vergleich zu Dextranen untersucht. Im Rahmen des Vietnam – Kriegs in den Jahren von 1959 bis 1975 wurde HES zunehmend zur Behandlung verwundeter US – Soldaten eingesetzt [Ertmer et al., 2009].

**Molekularer Aufbau von HES:** Die Grundbausteine von HES sind verzweigte Ketten von Glukosemolekülen. Dabei handelt es sich entweder um Amylose oder Amylopektin.

A: Amylose



B: Amylopektin



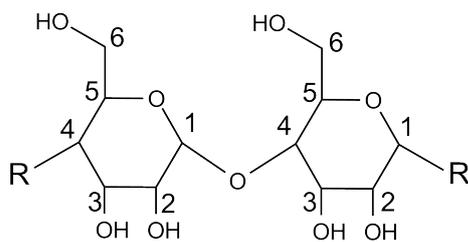
**Abb. 1.4:** Molekularer Aufbau von Stärke, A: Amylose, B: Amylopektin

Wie in Abbildung 1.4 verdeutlicht, besteht der entscheidende Unterschied zwischen

## 1 Einleitung

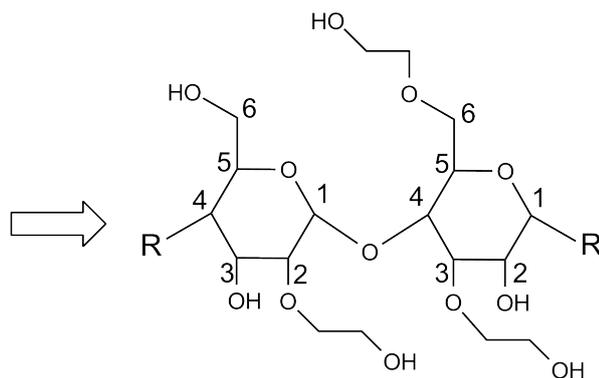
Amylose und Amylopektin darin, dass Amylose ausschließlich durch  $\alpha$  1,4 – glykosidische Bindungen verknüpft ist, während Amylopektin nach etwa jedem 25. Glukose – Monomer eine  $\alpha$  1,6 – glykosidische Bindung enthält. Auch das menschliche Glykogen verbaut neben den  $\alpha$  1,4 – glykosidischen Bindungen nach jedem 8. – 12. Glukose – Monomer eine solche  $\alpha$  1,6 – glykosidische Bindung. Native hochmolekulare Stärke kann aber unter anderem wegen ihrer kaum vorhandenen Wasserlöslichkeit infolge von intramolekularen und von intermolekularen Wechselwirkungen nicht für die Herstellung von Infusionslösungen benutzt werden. Außerdem würden körpereigene Glykosidasen (insbesondere die  $\alpha$  – Amylase) Amylose rasch zu Oligosacchariden, Maltose, Glukose und Isomaltose abbauen. Die Stärke muss also zunächst chemisch modifiziert werden, um wasserlöslich und resistenter gegen die  $\alpha$  – Amylase zu werden. Dies geschieht dadurch, dass die „freien“ Hydroxylgruppen der verwendeten Glukose mit einer Hydroxyethylgruppe substituiert werden. Freie Hydroxylgruppen sind dabei am C2, C3 und C6 – Atom. Abbildung 1.5 zeigt diese Modifikation exemplarisch.

### Grundstruktur **Amylose**



freie Hydroxylgruppen C2, C3, C6

### Grundstruktur **Hydroxyethylstärke**



Hydroxyethylgruppensubstitution an C2, C3 und C6

**Abb. 1.5:** Schema der chemischen Synthese von HES durch Substitution von Hydroxyethylgruppen an C2, C3 und C6 von Amylose

**Substitutionsgrad und molare Substitution:** Nicht jedes HES ist an denselben Hydroxylgruppen durch Hydroxyethylgruppen substituiert. Die Substitution ist aus mehreren Gründen von großer Bedeutung für die Pharmakokinetik. Eine Angabe über das Ausmaß der Hydroxyethylierung gibt der Substitutionsgrad. Für den Substitutionsgrad existieren

## 1 Einleitung

zwei verschiedene Angaben, die „molare Substitution“ (MS) und der eigentliche „Substitutionsgrad“ (= degree of substitution, DS). Beide Begriffe wurden ursprünglich 1973 durch den britischen Pharmakologen Banks festgelegt und werden als dimensionslose Zahl angegeben [Banks et al., 1973].

Die *molare Substitution* (MS) gibt das Verhältnis der Anzahl Hydroxyethylgruppen zur Gesamtzahl der Glukosemoleküle an. Die molare Substitution kann größer als 1 sein, wenn einzelne Glukosemoleküle mehr als eine Hydroxyethylgruppen erhalten haben.

Der *Substitutionsgrad* (DS) hingegen beschreibt das Verhältnis der Anzahl substituierter Glukoseeinheiten zur Gesamtzahl der verfügbaren Glukosemoleküle. Auch wenn ein Glukosemolekül mehrfach substituiert sein sollte, kann der Substitutionsgrad (DS) maximal 1 betragen. Die Zahl 1 bedeutet dann, dass jedes Glukosemolekül im HES mit mindestens einer Hydroxyethylgruppe versehen ist.

In der Praxis wird meistens die molare Substitution (MS) angegeben. Meistens liegen MS und DS so nahe beieinander, dass der Unterschied in der Praxis von keiner großen Bedeutung ist. Der Substitutionsgrad ist — vor allem im angelsächsischen Raum — namensgebend für das HES – Präparat. Der Name setzt sich zusammen aus dem griechischen Namen des Substitutionsgrades, dem „starch“ angehängt wird. Diese Bezeichnungen sind in Deutschland indes weniger gebräuchlich. Deshalb findet sich in Tabelle 1.2 eine Übersicht nach Boldt et al. [Boldt, 2009a].

**Tabelle 1.2:** HES – Präparate: Klassifikation nach Substitutionsgrad

Substitutionsgrad (MS)	Klassifikation	Beispiel
0,7	Hetastarch	<i>Hespan</i> <sup>®</sup>
0,6	Hexastarch	<i>Elohes</i> <sup>®</sup>
0,5	Pentastarch	<i>Hemohes</i> <sup>®</sup>
0,4	Tetrastarch	<i>Voluven</i> <sup>®</sup>

**Das C2 / 6 – Verhältnis:** Von großer pharmakokinetischer Bedeutung ist auch die Frage, an welchem C – Atom die Hydroxyethylgruppe substituiert wurde. Herstellungsbedingt gelingt die Hydroxyethylierung am besten an C2, das heißt die Reaktivität nimmt vom C2 – Atom über das C3 – Atom bis zum C6 – Atom hinweg ab [Lesch,

## 1 Einleitung

2003] [Weidhase et al., 1998]. Die Position am C2 – Atom gilt als deshalb so wichtig, weil sie das HES deutlich resistenter gegen die  $\alpha$  – Amylase macht. Die  $\alpha$  – Amylase ist das pharmakokinetisch entscheidende Enzym, da es die  $\alpha$  1,4 – glykosidischen Bindungen hydrolysiert und so die renalen Ausscheidung von HES beschleunigt. Je mehr C2 – Atome eine Hydroxyethylgruppe enthalten, desto länger braucht die  $\alpha$  – Amylase zum Abbau und desto länger ist die intravasale Wirkung. Das Verhältnis der am C – 2 Atom hydroxyethylierten Glukosemoleküle zu den am C – 6 Atom hydroxyethylierten Glukosemoleküle wird (vereinfachend) als *Substitutionsmuster* bezeichnet. Zur Bestimmung des C2 / C6 Verhältnisses erfolgt gaschromatographisch quantitativ nach vollständiger Hydrolyse des HES. Genauere Angaben zur Bestimmung des Verhältnisses finden sich bei Lesch [Lesch, 2003] und Weidhase [Weidhase et al., 1998].

**Tabelle 1.3:** HES – Präparate: Vergleich des C2 / C6 Verhältnisses

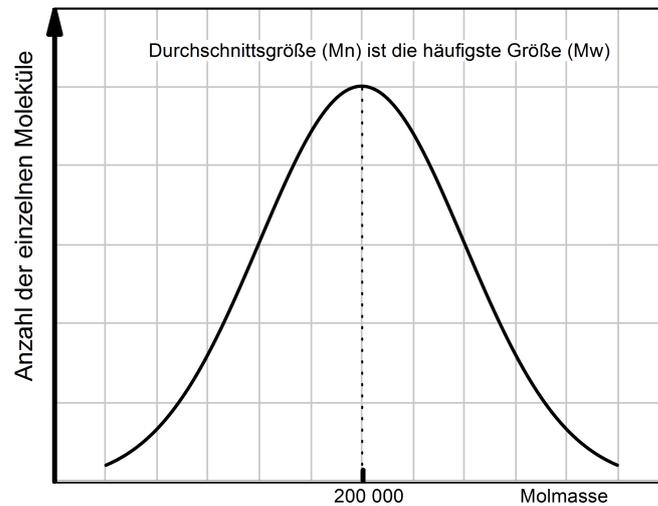
C2 / C6 Verhältnis	HES – Präparat
4 : 1	<i>Expafusin</i> <sup>®</sup>
5 : 1	<i>Hemohes</i> <sup>®</sup>
6 : 1	<i>Venofundin</i> <sup>®</sup>
9 : 1	<i>Voluven</i> <sup>®</sup>

**Exkurs zum molekularen Unterschied von HES und Dextrane:** Sowohl HES als auch Dextrane (siehe Abschnitt 1.2.7 auf Seite 24) basieren beide auf Ketten von Glukosemolekülen. Der entscheidende Unterschied ist, dass beim Dextrane vor allem 1,6 – glykosidische – Bindungen vorliegen, während HES – wie oben gezeigt – vor allem 1,4 – glykosidische Bindungen. Dadurch ist Dextrane anders als HES auch ohne Substitution von Hydroxyethylgruppen wasserlöslich. Trotzdem wird das Rohdextran zu kleineren Molekülen degradiert, um als Therapeutikum eingesetzt zu werden.

**Die mittlere Molmasse:** Die mittlere Molekülgröße schwankt aufgrund der Fertigung. Es handelt sich bei den künstlichen Kolloiden um „polydisperse Lösungen unterschiedlicher Molekülgrößen“ [Adams, 2007]. Das bedeutet, dass sich die HES – Moleküle vor der Weiterverarbeitung nach der Gaußschen Normalverteilung als Glockenkurve anordnen. Die ursprünglichen HES – „Rohstoffe“ beinhalten Teilchen mit einer Größe bis zu

## 1 Einleitung

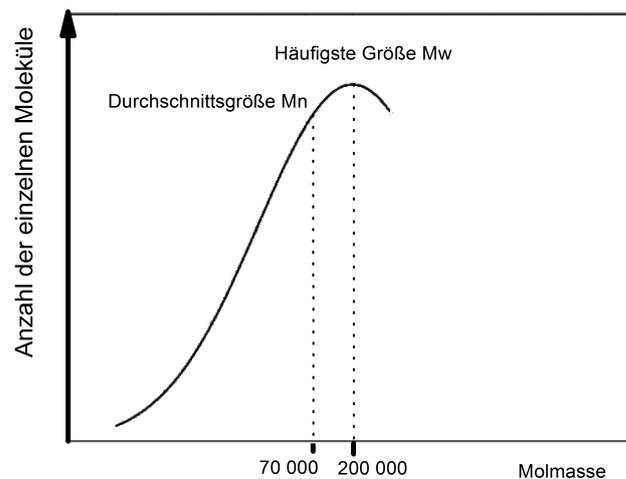
100.000 kDa. In Abbildung 1.6 ist dies am Beispiel von 200 000 HES dargestellt (nach Thiel [Thiel and Roewer, 2009]).



**Abb. 1.6:** HES vor der Weiterverarbeitung

Die meisten HES – Moleküle liegen dabei in nächster Nähe von 200 kDa, dabei sind 50% aller Moleküle schwerer und 50% leichter als 200 kDa. Die häufigste Molekülgröße ist 200 kDa (= Mw), diese stellt außerdem das molekulare „Zahlenmittel“ dar (= Mn). Diese Ursprungsmasse wird pharmazeutisch so verändert, dass die Moleküle mit einer Molmasse über einem bestimmten Grenzwert filtriert und entfernt werden. Dadurch entsteht eine Verteilung wie in Abbildung 1.7 nach Thiel [Thiel and Roewer, 2009].

## 1 Einleitung



**Abb. 1.7:** HES nach der Weiterverarbeitung

Durch diese Veränderung ist die häufigste molare Masse ( $M_w$ ) nicht mehr die Durchschnittsmasse ( $M_n$ ). Der Quotient von  $M_w / M_n$  wird auch als Verteilungsbreite charakterisiert. Die Verteilungsbreite von Voluven<sup>®</sup> liegt bei 2,6. Ein sehr umfangreicher Überblick zu diesem Thema findet sich bei Wagenblast [Wagenblast, 2004].

**Elimination:** HES, das kleiner als 50 kDa ist, wird schnell renal ausgeschieden [Dickenmann et al., 2008]. Neben diesem Eliminationsmechanismus werden größere HES – Moleküle auch durch das retikuloendotheliale System phagozytiert und gespeichert. Dies ist notwendig, weil die im HES vorkommenden  $\alpha$  1, 6 – Bindungen nicht von der  $\alpha$  – Amylase gespalten werden können. Diese Bindungen können nur intrazellulär aufgelöst werden [Thiel and Roewer, 2009]. Die anschließende lysomale Speicherung kommt auch bei den anderen Kolloiden vor. Bei HES gilt sie aber als besonders lang und ausgeprägt, so dass es zu einem Pruritus und einer Hepatosplenomegalie kommen kann (siehe Abschnitt 6.3 auf Seite 180). Die mittlere Molmasse ist dabei – anders als häufig angenommen – nicht ausschlaggebend für die intravasale Verweildauer. Diese wird durch die Metabolisierungsrate durch die körpereigenen Glykosidasen, also vor allem der  $\alpha$  – Amylase, bestimmt. Und die Metabolisierungsrate korreliert vor allem mit dem C2 / C6 – Verhältnis und dem Substitutionsgrad (siehe [Treib et al., 1999] und [Schramm et al., 2007]). Je höher beide sind, desto länger braucht die  $\alpha$  – Amylase zum Abbau des HES. HES wird dabei fortwährend abgebaut. Sinken einzelne Fragmente unter eine Größe von etwa 50 kDa, können sie renal ausgeschieden werden.

## 1 Einleitung

**Zusammenfassung:** HES und seine Pharmakokinetik werden also durch drei Faktoren maßgeblich beeinflusst :

1. den molekulare Substitutionsgrad ( z.B. 0,4 beim Voluven<sup>®</sup>, siehe Tabelle 1.2)
2. das Substitutionsmuster (= C2 / C6 Ratio, also z.B. 9 : 1 beim Voluven<sup>®</sup>)
3. die mittlere Molmasse ( z.B. 130 kDa beim Voluven<sup>®</sup>).

Die *Nomenklatur* der verschiedenen medizinisch verfügbaren Hydroxyethylstärke reflektiert diese Faktoren und den diesen zugrundeliegenden molekularen Aufbau. Die Bezeichnung setzt sich demnach aus mehreren Komponenten zusammen. Im Folgenden soll dies kurz am Beispiel von Voluven<sup>®</sup> verdeutlicht werden. Voluven<sup>®</sup> stellt den Handelsnamen dar. Der enthaltene Wirkstoff heißt „6% HES 130 / 0,4“. Im angelsächsischen Raum wird noch die Bezeichnung „Tetrastarch“ ergänzt (siehe Tabelle 1.2).

6% HES 130 / 0,4

**6%** beschreibt den prozentualen Anteil am Gesamtvolumen.  
(6% enthalten dementsprechend 60 g HES pro Liter)

**HES** steht für Hydroxyethylstärke

**130** steht für die mittlere Molmasse, angegeben in kDa

**0,4** steht für den molekularen Substitutionsgrad

**Unterschiedliche HES-Präparate:** Das heute eingesetzte HES 130 / 0,4 bzw. HES 130 / 0,42 (siehe Tabelle 1.5 auf Seite 22) wird häufig auch als „HES der 3. Generation“ bezeichnet. Zusammenfassend wird von der pharmazeutischen Industrie angegeben, dass HES 130 / 0,4 den bestmöglichen Volumeneffekt und die längst mögliche Verweildauer bei gleichzeitig minimiertem Risikoprofil habe [Boldt, 2009b] (siehe dazu auch Abschnitt 4.4.6 auf Seite 135). Eine kurze Übersicht über die verschiedenen Generationen von HES findet sich in Tabelle 1.4.

## 1 Einleitung

**Tabelle 1.4:** HES – Präparate: Entwicklungsgeschichte

Jahr	Typ	Generation
1974	6% HES 450 / 0,7	1. Generation
1977	6% HES 70 / 0,5	2. Generation
1978	6% HES 200 / 0,5	2. Generation
1980	3%, 6%, 10% HES 200 / 0,62	2. Generation
1999	6% HES 130 / 0,4	3. Generation
1999	6% HES 130 / 0,42	3. Generation
2007	6% HES 130 / 0,4 in balancierter Vollelektrolytlösung	3. Generation
2008	6% HES 130 / 0,42 in balancierter Vollelektrolytlösung	3. Generation

Entsprechend gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher HES – Präparate, die sich alle in einigen Punkten unterscheiden. In Tabelle 1.5 und 1.6 findet sich eine Auswahl von häufigen HES – Präparaten. Einige sind dabei aktuell nicht mehr käuflich zu erwerben (z.B. Rheohes<sup>®</sup>).

**Tabelle 1.5:** HES – Präparate: Molekulare Eigenschaften

Produktname	Molekül- größe (kDa)	Substitutions- grad	Träger- lösung	Osmotischer Druck (-ton)	Onkotischer Druck (-onkotisch)
<b>6% Rheohes<sup>®</sup></b>	70	0,5	0,9% NaCl	iso	iso
<b>6% Expafusin<sup>®</sup></b>	70	0,5 – 0,55	bal. VEL	iso	iso
<b>6% Voluven<sup>®</sup></b>	130	0,4	0,9% NaCl	iso	iso
<b>6% Volulyte<sup>®</sup></b>	130	0,4	bal. VEL	iso	iso
<b>6% Venofundin<sup>®</sup></b>	130	0,42	0,9% NaCl	iso	iso
<b>6% Tetraspan<sup>®</sup></b>	130	0,42	bal. VEL	iso	iso
<b>10% Voluven<sup>®</sup></b>	130	0,4	bal. VEL	iso	hyper
<b>3% HAES–steril<sup>®</sup></b>	200	0,5	0,9% NaCl	iso	hypo
<b>6% HAES–steril<sup>®</sup></b>	200	0,5	0,9% NaCl	iso	iso
<b>10% HAES–steril<sup>®</sup></b>	200	0,5	0,9% NaCl	iso	hyper
<b>6% Hemohe<sup>®</sup></b>	200	0,5	0,9% NaCl	iso	hyper
<b>6% HyperHAES<sup>®</sup></b>	200	0,5	7,2% NaCl	hyper	hyper

**Tabelle 1.6:** HES – Präparate: Ursprung und Hersteller

Produktname	Ursprung	Hersteller
<b>6% Voluven®</b>	Mais	Fresenius Kabi Deutschland
<b>6% Volulyte®</b>	Mais	Fresenius Kabi Deutschland
<b>6% Venofundin®</b>	Kartoffel	B.Braun Melsungen
<b>6% Tetraspan®</b>	Kartoffel	B.Braun Melsungen
<b>10% Voluven®</b>	Mais	Fresenius Kabi Deutschland
<b>3% HAES–steril®</b>	Mais	Fresenius Kabi Deutschland
<b>6% HAES–steril®</b>	Mais	Fresenius Kabi Deutschland
<b>10% HAES–steril®</b>	Mais	Fresenius Kabi Deutschland
<b>6% Hemohes®</b>	Kartoffel	B.Braun Melsungen
<b>6% Rheohes®</b>	Kartoffel	B.Braun Melsungen
<b>6% HyperHAES®</b>	Mais	Fresenius Kabi Deutschland
<b>6% Expafusin®</b>	Mais	Baxter

Selbst HES – Präparate derselben Generation, mit derselben durchschnittlichen Molekülgröße, einem fast gleichen Substitutionsgrad und derselben Trägerlösung können in vielerlei Hinsicht Unterschiede aufweisen [Westphal et al., 2009]. Besonders gut untersucht sind dabei Voluven® und Venofundin®. Die wesentlichen physiochemikalischen Unterschiede zwischen Voluven® und Venofundin® sind in der Diskussion in Tabelle 4.1 auf Seite 134 dargestellt. Die klinische Relevanz der Ausgangssubstanz für HES ist – wie in der Diskussion in Abschnitt 4.4.5 auf Seite 133 dargestellt – umstritten.

**Indikationen von HES:** HES galt in Deutschland bei einigen Indikationen lange Zeit als Mittel der ersten Wahl. Dazu zählen viele lebensbedrohliche Zustände, in denen es als akuter Volumenersatz bei Blut- oder Plasmaverlusten, schwerer Exsikkose oder dem hypovolämisch – hämorrhagischen Schock dient. Ferner soll HES die Plasmaviskosität vermindern. Daher soll es als Hämorheologikum bei Mikrozirkulationsstörungen zur Durchblutungsverbesserung eingesetzt werden. Dazu zählen die pAVK, der ischämische Apoplex, der Hörsturz, das Schädel – Hirn – Trauma, die Subarachnoidalblutung und die EPH – Gestose [Thiel and Roewer, 2009]. Außerdem wird HES eine „membranabdichtende“ und antiinflammatorische Wirkung attestiert, so dass es einige Lehrbücher 2009 noch als Mittel der 1. Wahl im SIRS empfohlen [Thiel and Roewer, 2009].

**Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Hydroxyethylstärke:** Für HES sind verschiedene unerwünschte Arzneimittelwirkungen bekannt, deren Inzidenz und Relevanz umstritten sind. Als typische Nebenwirkungen gelten eine Beeinträchtigung der Gerinnungsfunktion, eine Ablagerung im Gewebe, Pruritus, Hepatosplenomegalie, anaphylaktische Reaktionen und die im Zentrum dieser Arbeit stehende Nierenschädigung. Für eine ausführlichere Darstellung des Nebenwirkungsspektrums sei auf Abschnitt 6.3 auf Seite 180 im Anhang verwiesen.

**Small – Volume – Resuscitation:** Abschließend sei zu HES noch die in den Ergänzungen beschriebene hypertone Small – Volume Resuscitation kurz erläutert. Diese ist hypertone. Das heißt, dass sie einen größeren Natrium – Gehalt (7,2% NaCl) als das Blutplasma aufweist. Außerdem ist sie isoonkotisch. Diese speziellen HES – Lösungen dienen zur schnellen Volumenstabilisierung im Schock. So soll durch die Infusion von 250 ml HyperHAES<sup>®</sup> 6% – einer hypertone isoonkotische Lösung – im Rahmen der so genannten „Small – Volume – Resuscitation“ innerhalb von 2 – 5 Minuten bis zu 1000 ml Flüssigkeit aus dem Extravasalraum nach intravasal „rekrutieren“ [Müller, 2011]. Im Jahr 2014 erfolgte die Marktrücknahme dieser Produkte in Deutschland<sup>11</sup>.

### Dextrane

Der Vollständigkeit halber wird an dieser Stelle noch das Kolloid Dextrane erwähnt. Dieses findet sich zwar häufig noch in gängigen Lehrbüchern, die Bedeutung von Dextrane als Infusionslösung in der Anästhesiologie, Intensiv- und Notfallmedizin gilt allerdings als marginal [Schortgen et al., 2004]. Der Hauptgrund für das Verschwinden von Dextrane liegt in seiner vergleichsweise sehr hohen Rate von anaphylaktischen Reaktionen (siehe [Wills et al., 2005]), dem kein entsprechender therapeutischer Nutzen im Vergleich zu anderen Kolloiden gegenübersteht. Anders als bei der Hydroxyethylstärke ist die Grundsubstanz des Dextrane ein Disaccharid aus D – Glukose und D – Fruktose, das über  $\alpha$  1,6 – glykosidische Bindungen verknüpft ist. Außerdem enthält es keine Hydroxyethyl – Gruppen. Dextrane besteht also aus Glukosepolymeren, die als hochmolekulare, verzweigte und neutrale Bipolysaccharide durch bakterielle Synthese (*Leuconostoc mesenteroides*) gewonnen werden. Gängig waren früher Lösungen mit einer mittleren Molmasse von 40 und 60 kDa.

---

<sup>11</sup><http://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/pharmazie/news/2014/03/11/bfarm-gewaehrt-mehr-zeit-fuer-die-umsetzung/12286.html>, [Stand: 27.05.2014, 12:00]

## Gelatine

**Beschreibung und molekularer Aufbau:** Bei der Gelatine handelt es sich ebenfalls um ein künstliches Kolloid. Anders als die Hydroxyethylstärke und Dextrane besteht Gelatine aus bovinem Kollagen, also Proteinen. Gelatine wird industriell aus Rinderhaut und – knochen extrahiert [Marino and Sutin, 2012]. Die daraus gewonnene Grundsubstanz ist ein heterogenes Gemisch mit Molmassen im Bereich von 1 bis 100 kDa. Die hochmolekularen Fraktionen der Gelatine sind dabei für den gelförmigen Zustand der Grundsubstanz bei Raumtemperatur verantwortlich. Um den Schmelzpunkt zu senken und die Gelatine in flüssige Form zu bringen, müssen diese Polypeptide durch Succinylierung, Peroxidierung oder Harnstoffvernetzung hydrolytisch gespalten und dann neu vernetzt werden.

**Tabelle 1.7:** Gelatine – Präparate

Name	Inhalt	Hersteller
<i>Gelafundin</i> <sup>®</sup>	Succinylierte Gelatine	B.Braun Melsungen
<i>Gelifundol</i> <sup>®</sup>	Oxypolygelatine	Biotest Pharmazeutika, Wien
<i>Haemacel</i> <sup>®</sup>	Harnstoffvernetzte Gelatine	Piramal Healthcare, London

Alle in Tabelle 1.7 aufgeführten Gelatine – Präparate haben eine mittlere Molmasse von etwa 30 kDa. Von allen künstlichen Kolloiden haben die Gelatine – Präparate somit die geringste molare Masse.

**Pharmakokinetik:** Aufgrund dieser geringen molaren Masse wird Gelatine theoretisch sehr schnell renal ausgeschieden. Die Volumenwirksamkeit wird direkt durch die renale Elimination bestimmt. Andere Abbauege, wie die Zerlegung größerer Moleküle durch das retikulohistiozytäre System, sind kaum notwendig. *Gelifundol*<sup>®</sup> gilt als die einzige gängige Infusionslösung, die  $\text{HCO}_3^-$  enthält (siehe Diskussion dieses Themas in Abschnitt 1.2.6 auf Seite 8). Das in dieser Arbeit verwendete 4% *Gelafundin*<sup>®</sup> ist in einer NaCl – Lösung (Natrium: 154 mmol / l, Chlorid: 120 mmol / l) gelöst. Der Chloridanteil ist deshalb niedriger als bei einer 0,9% NaCl – Lösung, weil Gelatine negativ geladen ist. 4% *Gelafundin*<sup>®</sup> ist iso – bis gering hypoonkotisch und plasmaitoton, seine theoretische Osmolarität liegt bei 274 mosmol / l [BRAUN, 2008]. Entsprechend ist der intravaskuläre Volumeneffekt im Vergleich zu Albumin oder Hydroxyethylstärke mit zwei bis drei Stunden eher kurz und der onkotische Effekt eher gering ist [Vincent et al., 2003]. Für Gelatine sind allergische Reaktionen bekannt. Diese verlaufen aber deutlich schwächer als die der Dextrane – Lösungen.

**Indikationen:** Aktuell wird die Indikation von Gelatine zum Volumenersatz sehr unterschiedlich beurteilt. Ein mögliches Einsatzgebiet sehen Saner et al. in der Behandlung des hepatorenenalen Syndroms [Saner et al., 2004].

### 1.3 Infusionstherapie und das akute Nierenversagen

Bei klinischen Studien am kritisch kranken Patienten stehen heute – neben Mortalität und Hämodynamik – renale Komplikationen im Fokus, da diese entscheidende Auswirkungen auf das Outcome der Patienten haben. Ein wichtiger Standpfeiler der Behandlung vieler Krankheitsbilder kritisch kranker Patienten (z.B. Sepsis, Trauma) ist die Volumentherapie. Dem Wechselspiel der Elemente Infusionstherapie und Nierenfunktion kommt also entscheidende Bedeutung zu.

#### 1.3.1 Die Wirkung der Infusionstherapie auf die Nierenfunktion

Dass HES überhaupt renale Komplikationen auslösen kann, wurde 1992 von Legendre durch dessen Beobachtungen bei Nierentransplantationen (siehe Kapitel 4.3.1 auf Seite 121) bekannt [Legendre et al., 1993]. Ins Bewusstsein der Intensivmedizin gelangte dieser Problemkomplex aber erst durch die aus Sicherheitsbedenken vorzeitig abgebrochene VISEP – Studie (Intensive Insulin Therapy and Pentastarch Resuscitation in Severe Sepsis). In dieser konnten Brunkhorst et al. bei septischen kritisch Kranken zeigen, dass 10% HES 200 / 0,5 (Pentastarch) im Vergleich mit Ringer – Laktat zu einer signifikant höheren Inzidenz von Nierenversagen und der notwendigen Nierenersatztherapie führt [Brunkhorst et al., 2008]. Obwohl die Ergebnisse dieser Studie direkte Auswirkung auf die S3 – Leitlinie der Sepsis hatte – von der HES – Gabe wurde nun gänzlich abgeraten – wurde die Studie aus unterschiedlichen Gründen massiv kritisiert (siehe auch Abschnitt 6.2 auf Seite 178 im Anhang). In Deutschland kritisierten vor allem Zander und Boldt das Studien – Design der VISEP – Studie [Zander et al., 2007]. Im Zentrum der Kritik stand, dass 10% HES 200 / 0,5 in der Zwischenzeit durch 6% HES 130 / 0,4 ersetzt worden sei. Die Ergebnisse der VISEP – Studie könnten also nicht ohne weiteres auf das HES der 3. Generation übertragen werden. Außerdem wurde beanstandet, dass viele Patienten mehr HES erhalten hätten, als von Herstellerseite empfohlen wurde.

### 1.3.2 Exkurs: Die Niere beim kritisch Kranken

Die Niere (lateinisch *ren*, griechisch νεφός) nimmt bereits beim Gesunden eine Schlüsselstellung im Organismus ein. Sie ist das Organ, das über ihre Filtrationsrate das zirkulierende Volumen bestimmt, durch das Renin – Angiotensin – Aldosteron – System (RAAS) den arteriellen Blutdruck reguliert, zahlreiche Gifte und Stoffwechselabfallprodukte ausscheidet, mit der Lunge zusammen den pH – Wert des Blutes stabil und die Elektrolytkonzentrationen konstant hält, mit der Leber zusammen Quelle der Gluconeogenese ist und nicht zuletzt zahlreiche andere Hormonsysteme steuert (Erythropoetin – Synthese, Knochenstoffwechsel über Vitamin – D, Kinin– und Prostaglandinsynthese). Anders als eine Herz– oder Lungenschädigung fällt eine Nierenschädigung aber nicht sofort auf. Die Niere schmerzt nicht, Patienten empfinden keine Beschwerden, die subjektiv direkt auf die Niere zurückzuführen sind. Aus all diesen Gründen nimmt die Niere auch beim kritisch kranken Patienten eine besondere Schlüsselstellung ein. Bereits die Inzidenz und Prävalenz der renalen Komplikationen offenbaren, dass es sich um ein sehr häufiges Problem handelt. Schätzungsweise sind fast 35% aller Intensivpatienten vom akuten Nierenversagen betroffen [Ostermann and Chang, 2007]. Wohlhauer et al. berichten in ihrer Metaanalyse, dass die Entwicklung einer akuten Nierenschädigung andere intensivmedizinische Krankheitsbilder in ihrer Aussagekraft für die Entwicklung eines Multiorganversagens übertrifft [Wohlauer et al., 2012]. Die Niere wird sehr häufig bei Krankheitsbildern geschädigt, bei denen typischerweise die Volumentherapie einen herausragenden Stellenwert einnimmt (siehe Tabelle 1.8).

## 1 Einleitung

**Tabelle 1.8:** Häufigste Ursachen der akuten Nierenschädigung nach [Uchino et al., 2005]

<i>Ursache</i>	Anteil in %
<i>Mit Infusionstherapie assoziiert</i>	
Sepsis oder septischer Schock	47,4
Größere kardiovaskuläre Operation	23,2
Hypovolämie	25,5
Größere gastrointestinale Operation	11,4
<i>Ohne Infusionstherapie assoziiert</i>	
Hepatorenales Syndrom	5,7
Obstruktive Uropathie	2,7
Medikamenten assoziiert	19,0
Kardiogener Schock	26,9
Andere Faktoren	12,8

Die erste Klassifikation des akuten Nierenversagens geht auf Morgagni<sup>12</sup> zurück [Eknoyan, 2002]. Die englische Bezeichnung „acute kidney injury“ – AKI – wurde Anfang des 20. Jahrhunderts im Kontext einer akuten Quecksilberintoxikation eingeführt. Offiziell setzte sich dieser Begriff erst im Jahr 2002 durch. Die ADQI (Acute dialysis quality initiative) ersetzte den bis dahin verwendeten Terminus „acute renal failure“ (ARF) durch die akute Nierenschädigung [Bellomo et al., 2002]. Das akute Nierenversagen (besser: die akute Nierenschädigung, s.o.) stellt selbst eines der wichtigsten intensivmedizinischen Krankheitsbilder dar. Trotz stetiger intensivmedizinischer Verbesserungen, beispielsweise auch im Hinblick auf die Verfügbarkeit von Nierenersatzverfahren, bleibt die Prognose schlecht [Kierdorf and Sieberth, 1995]. Die Mortalität liegt, je nach Schwere des akuten Nierenversagens, zwischen 20,9% und 56,8% [Ostermann and Chang, 2007]. Ein Kernproblem dabei bleibt auch, dass seit der flächendeckenden Einführung der Dialyse in den 50er Jahren<sup>13</sup> kein bedeutender Erfolg zur Rettung der Niere mehr erzielt werden konnte. Und das, obwohl sich die Überlebenschancen eines Patienten nach einer akuten Nierenschädigung bei Entlassung aus dem Krankenhaus im Vergleich zu einem Nierengesunden um das drei- bis achtfache reduziert [Kellum et al., 2011].

<sup>12</sup> *Giovanni Battista Morgagni*, italienischer Mediziner, Anatom und Begründer der modernen Pathologie, \*1682 Forlì †1771 Padua

<sup>13</sup> *Georg Haas*, deutscher Internist und Erfinder der Dialyse, \*1886 †1971, *Willem Kolff*, niederländischer Internist, Durchbruch des Nierenersatzes, \*1911 †2009

## *1 Einleitung*

Von zentraler Bedeutung ist deshalb, bei der Behandlung kritischer kranker Patienten möglichst auf zusätzliche nephrotoxische Substanzen zu verzichten.

## 1.4 Hinführung zur Fragestellung

2010 konnten Schick et al. zeigen, dass 6 % HES 130 / 0,4 und 4% Gelatine bei der CLP – induzierten Sepsis der Ratte funktionell und morphologisch die Niere schädigen. In der Histologie der Niere (siehe auch Abbildung 4.1 auf Seite 116) wurden bei beiden Kolloiden zahlreiche intrazelluläre Vesikel gesehen. Bei der Gelatine – Gruppe konzentrierten sich diese Vesikel auf den proximalen Tubulus und bei der HES-Gruppe auf das gesamte Tubulussystem. Außerdem fanden sich deutliche Zeichen des Zellunterganges in Form von geschwollenen Zellen und defragmentierten Zellkernen. Bei den Kristalloiden (0,9% NaCl und Sterofundin<sup>®</sup> ISO) wurden keine derartigen Auffälligkeiten gefunden [Schick et al., 2010].

Da die Nierenfunktion auf der einen und die hämodynamische Stabilisierung durch die Infusionstherapie auf der anderen Seite von elementarer Wichtigkeit für den Erfolg der Mehrzahl der intensivmedizinischen Maßnahmen ist, richtete sich die Aufmerksamkeit unserer Arbeitsgruppe auf die Einordnung der beobachteten Vesikel hinsichtlich ihrer möglichen Pathogenität.

## 1.5 Fragestellung

Diese Arbeit sollte die Auswirkung gängiger Kolloide und Kristalloide, in erster Linie die der Hydroxyethylstärke 130 / 0,4, auf proximale Nierentubulusepithelzellen untersuchen.

Dies umfasste sowohl die Wirkung der Infusionslösungen auf gesunde, das heißt nicht durch Inflammation geschädigte Zellen, als auch durch Zytokine stimulierte Zellkulturen. Untersuchungsziel war in erster Linie die direkt gemessene Viabilität der behandelten Zellen *in vitro*. Dabei stand zunächst die Frage im Vordergrund, ob die Wirkung von HES durch die Gabe von proinflammatorischen Zytokinen verstärkt oder gar ausgelöst wird. Im Falle einer funktionellen Beeinträchtigung musste geprüft werden, ob tatsächlich das HES – Molekül für den Schaden ursächlich war und welchen Einfluss HES – Konzentration, der pH – Wert, die Osmolarität und die Trägerlösung der Versuchslösungen auf die Zellviabilität hatten. Außerdem war zu klären, ob es *in vitro* einen Unterschied zwischen HES 130 / 0,4 und HES 130 / 0,42 gibt. In diesem Zusammenhang war auch die Rolle der Molekülgrößen der einzelnen HES – Fraktionen näher zu beleuchten. Untersucht werden sollte auch wie lange der *in vitro* Kontakt zwischen HES und Zelle sein muss, bis messbare Effekte nachweisbar sind und ob diese potentiell reversibel waren. Obwohl der Schwerpunkt dieser Arbeit auf HES lag, sollten auch die anderen Kolloide, Humanalbumin und Gelatine, und das Kristalloid Sterofundin® ISO untersucht werden. Sollten HES und die anderen Kolloide die Zellviabilität reduzieren, musste außerdem untersucht werden, ob dies durch deren Zytotoxizität verursacht wurde.

Zusammengefasst stand die Frage im Zentrum, ob es sich bei den HES – Wirkungen um die Wirkung eines einzelnen Präparates oder einen präparatspezifischen Effekt handelt.

## 2 Methoden

In den folgenden Abschnitten wird zunächst die Herstellung der verwendeten Versuchslösung erläutert. Dieses umfasst nicht nur die Verdünnung, sondern auch die Fragmentierung, die Trocknung, die Dialyse und die Aufkonzentrierung. Anschließend werden die verwendeten Zellen und deren Kultivierung dargestellt. Danach werden die auf diesen Grundlagen durchgeführten APTS – Markierungen (8 – Aminopyren – 1, 3, 6 – Trisulfonische Säure) des HES, die Viabilitätsversuche (EZ4U, Cell Proliferation and Toxicity Assay), die Zytotoxizitätsversuche (LDH – Assay, Laktatdehydrogenase) und die mRNA – Expressionsmessungen (qRT – RT – PCR, real–time quantitativen reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction) vorgestellt.

### 2.1 Herstellung der Versuchslösungen

Alle Versuchslösungen wurden unter der Sterilbank hergestellt. Dabei wurden die in Tabelle 2.1 aufgezählten Infusionslösungen als Grundlage verwendet. Für die genaue Zusammensetzung und die pharmakologischen Eigenschaften sei auf die jeweilige ausführliche Darstellung der einzelnen Infusionslösungen in Kapitel 1.2 auf Seite 2 verwiesen.

**Tabelle 2.1:** Verwendete Infusionslösungen

Produktname	Inhalt
<b>6% Voluven®</b>	HES 130 / 0,4 auf 0,9% NaCl – Basis
<b>6% Volulyte®</b>	HES 130 / 0,4 in balancierter Vollelektrolytlösung
<b>6% Venofundin®</b>	HES 130 / 0,4 auf 0,9% NaCl – Basis
<b>6% Tetraspan®</b>	HES 130 / 0,42 in balancierter Vollelektrolytlösung
<b>6% Hemohe®</b>	HES 200 / 0,5 auf 0,9% NaCl – Basis
<b>6% Expafusin®</b>	HES 70 / 0,5 - 0,55 in balancierter Vollelektrolytlösung
<b>4% Gelafundin®</b>	Gelatinopolysuccinat auf 0,9% NaCl – Basis
<b>5% Humanalbumin</b>	Humanes Albumin 50 g/l
<b>Sterofundin® ISO</b>	Balancierte Vollelektrolytlösung

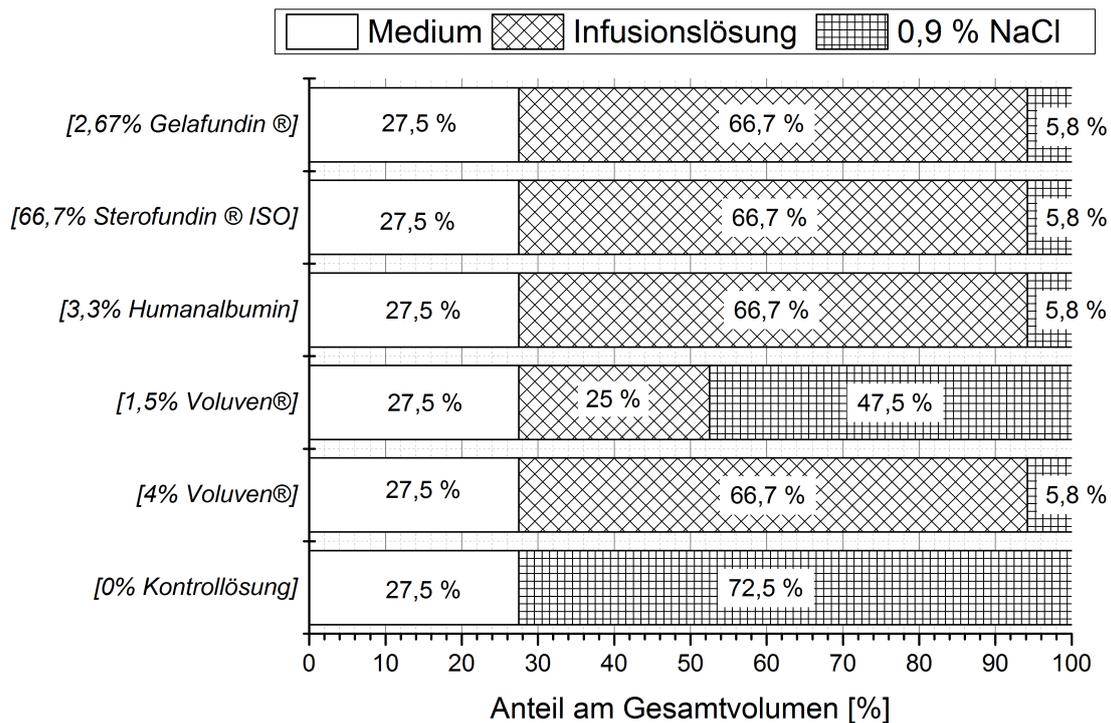
Jede hergestellte Versuchslösung enthielt denselben prozentualen Anteil an Nährmedium (27,5%). Variiert wurde nur der Anteil des 0,9% NaCl und der zu untersuchenden

## 2 Methoden

Infusionslösung. Als Vorlage des Verdünnungsschemas diene die Voluven<sup>®</sup> – Reihe. Wenn bei einem aufgeführten Versuch nicht explizit ein anderes Verdünnungsverfahren beschrieben wird, gilt das in Tabelle 2.2 dargestellte Schema.

**Tabelle 2.2:** Verdünnung der HES 130 / 0,4 – Reihe

Verdünnung Voluven <sup>®</sup> – Verdünnung	Nährmedium (%)	0,9% NaCl (%)	Infusionslösungsanteil e.g. 6% Voluven <sup>®</sup>
0%	27,5	72,50	0,00
0,1%	27,5	70,83	1,67
0,5%	27,5	64,17	8,833
1%	27,5	55,83	16,67
1,5%	27,5	47,50	25,00
2%	27,5	39,17	33,33
4%	27,5	5,83	66,67
Medium	100	0,00	0,00



**Abb. 2.1:** Zusammensetzung exemplarischer Infusionslösungen: 0% Kontrollösung, 1,5% Voluven<sup>®</sup>, 4% Voluven<sup>®</sup>, 3,3% Humanalbumin, 66,7% Sterofundin<sup>®</sup> ISO und 2,67% Gelafundin<sup>®</sup>

Bei der Voluven<sup>®</sup> – Verdünnungsreihe, die als Leitschema für die anderen Lösungen fungierte, orientierten wir uns möglichst nahe an der klinischen Realität. So wird die Plasmakonzentration von Hydroxyethylstärke bei gesunden Probanden nach Infusion von 500 ml 6% HES 130 / 0,4 mit bis zu 0,37% angegeben [Jungheinrich and Neff, 2005].

Orientierend am Voluven<sup>®</sup> – Schema ergibt sich für die anderen Infusionslösungen das in Tabelle 2.3 gezeigte Verdünnungsschema.

**Tabelle 2.3:** Umrechnung der einzelnen Versuchslösungen in [%]

6% Voluven <sup>®</sup>	4% Gelafundin <sup>®</sup>	50 g/l Humanalbumin	Sterofundin <sup>®</sup> ISO
0,1	0,07	0,08	1,67
0,5	0,33	0,42	8,83
1	0,67	0,83	16,67
1,5	1,00	1,25	25,00
2	1,33	1,67	33,33
4	2,67	3,33	66,67

### 2.1.1 Einstellung des pH – Wertes und Bestimmung der Osmolalität

Wie auf Seite 2 erläutert, kann der pH – Wert der Infusionslösungen aus galenischen Gründen im azidotischen Bereich liegen. Entsprechend waren auch die damit hergestellten Versuchslösungen trotz des Zusatzes von Zellmedium häufig nicht im physiologischen Bereich (siehe Kapitel 3.3.3 auf Seite 77). Deshalb wurde nach der Herstellung der Versuchslösungen der pH – Wert der Lösungen mit dem pH – Meter „pH 720 WTW – Series“ von der Firma inoLAB<sup>™</sup> bestimmt. Vor jeder Messung wurde das pH – Meter mittels der pH – Kalibrierungspuffer mit einem pH – Wert von 7 (1. Lösung) und einem pH von 10 (2. Lösung) kalibriert. Die Temperatureinstellung lag bei 23°C. Der Ziel pH – Wert der Versuchslösungen war 7,40 – 7,45. Dies wurde durch Applikation von HCl und NaOH in verschiedener molarer Konzentration erreicht. Der Ausgangs – pH und der erreichte pH – Wert wurden ebenso dokumentiert wie die Menge und Art der benutzten Pufferlösung. Die Einstellung des pH – Wertes erfolgte unter unsterilen Bedingungen außerhalb der Sterilbank. Deshalb wurden nach Einstellung des pH – Wertes alle Lösung unter der Sterilbank in 20 ml Spritzen (Steril BD Discardit<sup>™</sup> II) über 20G Kanülen (Steril BD Microlance<sup>™</sup> 3 20G 1 ½ – Nr. 1 0,9 x 40 mm) aufgezogen und mittels Filter (Sartorius stedim Minisart<sup>®</sup> Single use filter unit. Non – pyrogenic, steril, 0,2 µm) in neue sterile beschriftete 50 ml Biofugenröhrchen appliziert.

Anschließend konnten die Versuchslösungen dem jeweiligen Versuchsprotokoll entsprechend verwendet werden. Die Sterilfiltration der Lösungen hatte keinen Einfluss auf den pH – Wert. Für die Bestimmung der Osmolalität der Versuchslösungen wurden je 3 ml Lösung in jedes Well einer 6 – Wellplatte appliziert. Nach der vorgesehenen Inkubation (4 / 21 Stunden) wurde eine Probe entnommen und in das Labor der Universitätsklinik Würzburg gebracht. Dort wurde die Osmolalität über die Osmostation OM–6050<sup>1</sup> von der Firma Menarini bestimmt. Das Messprinzip beruht auf der so genannten USC („Ultra Supercooling“) Methode. Dabei handelt es sich um eine Messmethode zur Bestimmung des osmotischen Drucks. Diese Technologie wurde von der Firma ARKRAY speziell entwickelt, um die Temperatur in der Messzelle schnell auf den Gefrierpunkt abzusenken<sup>2</sup>.

### 2.1.2 Auftrennung von HES in einzelne Fraktionen

Voluven<sup>®</sup> und Volulyte<sup>®</sup> enthalten Hydroxyethylstärke mit einer mittleren molaren Masse von 130 kDa. Zur Verteilung der einzelnen Fraktionen siehe Kapitel 1.2.7 auf Seite 14. Die HES – Fraktionierung erfolgte mit Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 Centrifugal Filter Devices von der Firma MILLIPORE. Verwendet wurden Filter mit einer Porendurchlässigkeit von 100 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa und 3 kDa. Dadurch konnten folgende Fraktionen aufgetrennt werden:

1. >100 kDa
2. 50 >100 kDa
3. 30 >50 kDa
4. 10 >30 kDa
5. 3 >10 kDa
6. <3 kDa

Für die Auftrennung wurden 10 ml 6% Voluven<sup>®</sup> in das Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 100 kDa Röhrchen pipettiert. Als Gegengewicht wurden außerdem 10 ml Aqua dest. in ein Amicon<sup>®</sup> 100 kDa – Filterröhrchen pipettiert. Die Zentrifuge MULTIFUGE 1 S – R von Heraeus wurde auf 20 °C, 30 Minuten, 4 000 g, Beschleunigung 9, Abbremsen

<sup>1</sup>siehe auch <http://www.menariniagnostics.at/Produkte/harnanalyse/Osmo-Station>

<sup>2</sup>Für die Zurverfügungstellung dieser Information danke ich Frau Bettina Brendel, stellvertretende leitende MTA des Zentrallabors und der Gerinnungsambulanz des Universitätsklinikums Würzburg

9 eingestellt. Beide Röhrchen wurden vis – a – vis in die Zentrifuge gestellt und die Zentrifuge gestartet. Nach 30 Minuten erfolgte eine erste Kontrolle des Volumens, das Moleküle  $> 100$  kDa enthält. Der Wert wurde protokolliert. Weitere 30 Minuten später wurde dies wiederholt. Wenn eine große Differenz zwischen den beiden Messzeitpunkten vorlag, wurde entsprechend weitere 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Filterstück des Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 ml Röhrchen in das vorher beschriftete 50 ml Biofugenröhrchen gestellt. Das gewonnene Filtrat wurde immer mit 0,9% NaCl auf 10 ml aufgefüllt und in das nächst kleinere Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 ml Röhrchen pipettiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die letzte Fraktion ( $< 3$  kDa) hergestellt worden war.

### 2.1.3 Trocknung der HES – Moleküle

Die Trocknung der HES mit dem Ziel, dieses später zu verwenden, wurde mittels Speed – Vac durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen „Centrifugal evaporator“ (zentrifugaler Verdampfer). Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass – im Vergleich zum Beispiel zu einem konventionellen Exsikkator – die applizierte Hitze deutlich geringer ist. In der Folge ist das Risiko den getrockneten Stoff zu schädigen geringer. Zuerst wurden die vorgesehenen Eppstein – Cups<sup>®</sup> beschriftet, mit der Feinwaage gewogen und das Gewicht notiert. Zur Trocknung wurden anschließend je 0,5 ml / Eppendorf – Cup<sup>®</sup> 6% HES 130 / 0,4 unter der Sterilbank pipettiert. Das so abgefüllte HES wurde mittels Speed – Vac für 3 – 4 Tage getrocknet. Nach Abschluss der Trocknung wurden die Eppendorf – Cups<sup>®</sup> erneut gewogen. Von diesem Gewicht wurde das zuvor gemessene Leergewicht der Eppendorf – Cups<sup>®</sup> abgezogen, um die Masse der getrockneten Hydroxyethylstärke zu ermitteln. Theoretisch enthält eine 6% Voluven<sup>®</sup>, also eine auf 0,9% NaCl – basierende HES – Lösung – 30 mg HES und 4,5 mg NaCl. Für jede Probe wurde das Gewicht einzeln berechnet. Von diesem Wert musste zuletzt noch der Natriumchloridanteil abgezogen werden. Dieser wurde ermittelt, indem mehrere Eppendorf – Cups<sup>®</sup> mit 0,5 ml 0,9% NaCl getrocknet wurden und deren arithmetischer Mittelwert bestimmt wurde.

### 2.1.4 Lösung der HES im Zellmedium

Um den Einfluss der Trägerlösung der HES auf die HK – 2 Zellen im EZ4U – Test zu minimieren, wurde folgender Versuch durchgeführt. Zunächst wurde das HES, wie in Abschnitt 2.1.3 auf Seite 36 geschildert, getrocknet. Die gewonnene Trockenmasse

aus HES und NaCl wurde jeweils so in Zellmedium gelöst, dass die HES – Konzentration der Stocklösung 6% betrug. Die Stocklösung wurde – abweichend von dem oben geschilderten Schema – in reinem Zellmedium weiter verdünnt. Als Referenzgruppe wurde in diesem Versuch die mit reinem Zellmedium behandelte Gruppe definiert (= 100% Medium). Das für diesen Versuch genutzte Verdünnungsschema ist in Tabelle 2.4 auf Seite 37 verdeutlicht. Eine 4% HES – Lösung besteht also zu 66% aus einer 6% HES–in–Medium–Lösung und zu 33,3% aus Zellmedium.

**Tabelle 2.4:** Verdünnung von getrocknetem HES in Zellmedium

<b>Verdünnung</b> Voluven <sup>®</sup> – Verdünnung	<b>Zellmedium</b> (%)	<b>Stocklösung</b> 6% HES in Medium
Kontrolle	100	0,0
0,1%	98,3	1,7
0,5%	91,7	8,3
1%	83,3	16,7
1,5%	75,0	25
2%	66,7	33,3
4%	33,3	66,7

### 2.1.5 Dialyse

Die Dialyse der HES – Lösungen diente zur Normalisierung des NaCl – Anteils. Dieses Verfahren war notwendig für den EZ4U, der den Unterschied zwischen den einzelnen HES – Fraktionen untersuchte, die sich jeweils nur in der Größe der Fraktion, nicht aber im NaCl– oder absoluten HES – Gehalt unterscheiden sollten. Dafür wurden Dialysemembranen der Firma Calbiochem vom Typ Novagen<sup>®</sup>, D – Tube Dialyser midi, MWCO 3,5 kDa (Prod.Nr.: 71506 – 3) verwendet. Das Verfahren eignete sich für 50 – 800 µl Volumen. Das zu dialysierende HES musste zunächst auf Raumtemperatur gebracht werden. Zu Beginn wurden 800 µl deionisiertes Wasser in jedes Röhrchen gegeben. Diese wurden sanft zugeschraubt und für 20 Minuten (mindestens 5 Minuten) damit inkubiert. Dieser Schritt diente der Anfeuchtung der Membran. Dabei war besonders wichtig, die Membranoberfläche nicht zu berühren oder quetschen, um Reißen der Membran zu verhindern. Außerdem sollten wiedergetrocknete Membranen nicht mehr verwendet werden. Nach 20 Minuten wurden die Deckel entfernt, das Wasser abpipettiert, 500 µl Probe (HES – Lösung) hinzupipettiert und das Röhrchen wieder mit dem Deckel verschlossen. Das Membranröhrchen wurde in den Ständer gesteckt und der ganze Ständer anschließend in ein Gefäß mit Rührkern mit 100 bis 1000–facher Menge

an der gewünschten Dialyselösung gestellt. Dabei musste die gesamte Membranfläche mit äußerer Dialyselösung bedeckt sein. In der Praxis bedeutete dies, dass für 500 µl Lösung (HES – Lösung) 500 ml (0,9% NaCl) – Puffer in das Becherglas mit Rührkern kam. Becherglas und Rührkern wurden in den Kühlraum gebracht und der Rührkern auf Stufe 1 gestellt. Der Rührkern rührte für mindestens 3 Stunden. Dieser Zeitraum wird für niedermolekulare Salze und Puffer als ausreichend erachtet. Alternativ hätte auch über Nacht dialysiert werden können. Jeweils nach 3 Stunden und über Nacht musste ein kompletter Volumenwechsel im Kühlraum mit eiskaltem (0,9% NaCl-) Puffer erfolgen. Das heißt, dass die HES – Lösung in Summe gegen 3 x 500 ml dialysiert wurde. Die Dialyse wurde nach weiteren 3 Stunden am 2. Tag beendet.

### 2.1.6 Herstellung einer 2% HES – Lösung der einzelnen Fraktionen

Um die Wirkung der einzelnen Fraktionen mit einander vergleichen zu können, mussten diese auf die gleiche HES – Konzentration aufkonzentriert werden. Das Ziel war es, in jeder hergestellten Versuchslösung dieselbe Masse an HES – Molekülen zu haben. Entsprechend unterschied sich das Vorgehen von dem, das in Abschnitt 2.1.2 dargestellt wurde.

Für die Konzentration wurden 80 ml 6% Voluven<sup>®</sup> entnommen und je 10 ml in jedes Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 100 kDa Röhrchen pipettiert. Die Zentrifuge MULTIFUGE 1 S – R von Heraeus wurde – wie oben beschrieben – auf 20 °C, 30 Minuten, 4 000 g, Beschleunigung 9, Abbremsen 9 eingestellt. Alle Röhrchen wurden vis – a – vis in die Zentrifuge gestellt und die Zentrifuge gestartet. Nach 60 Minuten wurden die Röhrchen entnommen. Der Überstand, also die HES – Moleküle die > 100 kDa waren, wurden abpipettiert und in ein 15 ml Röhrchen gefüllt. Das Filtrat wurde jeweils abpipettiert und jeweils in Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 50 kDa Röhrchen gegeben. Dieses Verfahren wurde bis zum Amicon<sup>®</sup> Ultra – 15 3 kDa Röhrchen so fortgeführt.

Wegen der geringen Menge HES, die in den HES – Fraktionen < 10 kDa enthalten waren, war für diese Fraktionen der in Abschnitt 2.1.3 dargestellte Trocknungsprozess nicht praktikabel. Es mussten nämlich deutliche größere Volumina getrocknet werden als für die größeren Fraktionen (siehe dazu Kapitel 2.1.2). Deshalb wurde zur Trocknung dieser Fraktionen ein anderes Verfahren gewählt.

Die Fraktion > 3 kDa wurde mit Aqua so gelöst, dass die HES – Konzentration bei 3% lag, während die Fraktionen > 10 kDa mittels 0,9 % NaCl in eine 6% – Stocklösung HES verdünnt wurden. Dies war bei den Fraktionen > 10 kDa möglich, weil deren Volumina deutlich kleiner waren als das der Fraktion 3 bis 10 kDa. Die

Fraktion < 3 kDa konnte hingegen nicht dialysiert werden, weil die Porengröße der Dialysemembran 3,5 kDa betrug (siehe Abschnitt 2.1.5 auf Seite 37).

Die Fraktion < 3 kDa hatte deshalb zwar eine HES – Konzentration von 3%, der NaCl – Gehalt aber betrug etwa 20%. Bei der Berechnung wurde davon ausgegangen, dass die einzelnen Volumina vor der Trocknung einen NaCl – Anteil von 0,9 % (Voluven®) hatten. Entsprechend entstand eine mit 20% NaCl stark hypertone 3% HES – Lösung. Um die Auswirkungen trotzdem überprüfen zu können, wurde im EZ4U – Versuch eine Kontrollgruppe hinzugefügt. Diese Kontrollgruppe enthielt – wie die übliche 0% – Referenzgruppe – einen Mediumanteil von 27,5%, die hinzugefügte NaCl – Lösung aber enthielt 20% NaCl. Die NaCl-Lösung wurde hergestellt, indem 10 ml Aqua dest. mit 2 g kristallinem NaCl gemischt wurde. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung auf den physiologischen Bereich eingestellt.

## 2.2 Zellkultur

Es wurden Zellen der Zelllinie HK – 2 (= human kidney 2) in Kultur gehalten. Dabei handelte es sich um humane proximale Tubulusepithelzellen, die durch ein rekombinantes Retrovirus mit den Genen des „Humanen Papillomavirus“ HPV (= Humanes Papilloma – Virus) 16 E6/E7 immortalisiert wurden. Ursprünglich stammen diese Zellen aus dem Kortex einer nicht – infizierten menschlichen Niere und wurden von ATCC® als stabile Zellreihe etabliert. Diese Transformation soll keine signifikante Veränderung der Funktion oder des Phänotypes bewirken [Biewener, 2008]. Allerdings können die Gene E6/E7 immer noch durch PCR (polymerase chain reaction) im Genom der HK – 2 Zelle nachgewiesen werden. Die Zellen exprimieren typische funktionelle und morphologische Eigenschaften von humanen proximalen Tubulusepithelien und wurden 1994 von Ryan et al. charakterisiert (siehe [Ryan et al., 1994]).

Dabei gelten nach Ryan folgende Merkmale als spezifisch:

- lange dichtstehende Mikrovilli
- junktionale Komplexe
- für den Bürstensaum typische Enzyme (alkalische Phosphatase, saure Phosphatase,  $\gamma$  – Glutamyltransferase, Leucin – Aminopeptidase)

Ferner werden Strukturen von HK – 2 Zellen durch Antikörpern gegen Zytokeratin, Vimentin, Fibronectin und  $\alpha3 - \beta1$  Integrin erkannt, jedoch nicht von Faktor VIII, CALLA – Endopeptidase und 6.19 Antigen. Dies gilt als ein zusätzlicher Hinweis auf den

tubulären Ursprung und spezifischen Phänotyp dieser Zellen. Zusätzliche funktionelle Charakteristika proximaler Tubulusepithelzellen sind ein *in vivo* Natrium –abhängiger Phlorizin – sensitiver Glukosetransport und die Möglichkeit, die Adenylatcyclase durch Parathormon zu stimulieren. HK – 2 Zellen besitzen auch die Fähigkeit zur Glukoneogenese, Bildung und Speicherung von Glykogen. Werden HK – 2 Zellen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigt, entsprechen deren Auswirkungen den Ergebnissen von frisch isolierter proximaler Tubulussegmente [Biewener, 2008].

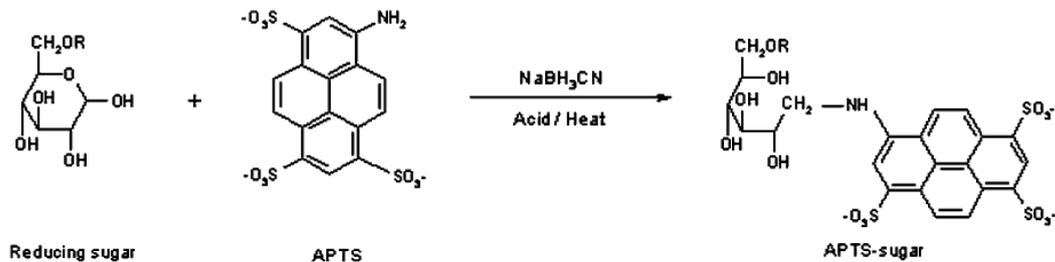
HK – 2 Zellen gelten somit als eine geeignete Zelllinie, um die Reaktion humaner proximaler Tubulusepithelzellen auf nephrotoxische und – protektive Substanzen zu untersuchen.

Bezogen wurden die HK – 2 Zellen von American Type Culture Collection, ATCC®, Rockville, USA. Die Zelllinie wurde in DMEM (Dulbeccos modified Eagle Medium) / HämF12 – Medium mit 10% FCS (Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum) und 1% Penicillin / Streptomycin (alle von GIBCO®, Invitrogen), das alle zwei bis drei Tage unter der Sterilbank gewechselt wurde, kultiviert. Das Wachstum erfolgte in mit 0,5% Gelatine beschichteten T – 75 Flaschen im Inkubator bei 37 °C mit angefeuchteter Luft bei einem CO<sub>2</sub> – Anteil von 5% für jeweils eine Woche pro Passage. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin / EDTA (= Ethylendiamintetraessigsäure) gelöst und – nach gründlicher Resuspension mittels Pipetboy® – in einem Verhältnis von 1 : 4 in neue T – 75 Flaschen ausgesät. Es wurden die Zellen von der Passage 12 bis 72 verwendet.

### 2.3 APTS – Markierung von HES

Um die Aufnahme von HES 130 / 0,4 in HK – 2 Zellen zu untersuchen, wurde HES mit fluoreszierendem 8 – Aminopyren – 1, 3, 6 – Trisulfonische Säure (APTS) markiert. Das Vorgehen orientierte sich an dem von Neuhaus et al. beschriebenen Verfahren zur Markierung des parazellulären Transportes von Dextranen [Neuhaus et al., 2006a]. Die Bindung von APTS an HES gelang wie in Abbildung 2.2 dargestellt durch eine reduktive Amination. Das Verfahren entspricht dem von Neuhaus et al., Chen et al. und Guttman et al. demonstriertem Vorgehen in einer leicht modifizierten Form [Neuhaus et al., 2006b] [Chen, 1995] [Guttman et al., 1996]. Die HES – Lösung wurde nicht getrocknet, sondern in 20 µl zweifach destilliertem (bidestilliertes) Wasser gelöst. Das Natriumcyanoborhydrid (NaBH<sub>3</sub>CN, Sigma – Alderich®, CAS Number 25895-60-7,

Produktnummer 296813) wurde in Tetrahydrofuran statt in Methanol gelöst. Die Markierungslösung bestand aus 20 µl HES 130 / 0,4 (Voluven<sup>®</sup>), 5 µl 0,1 M APTS (in 1 M Zitronensäure) und 7,5 µl 1 M NaBH<sub>3</sub>CN. Diese wurden zusammen bei 85 °C für 3,5 Stunden inkubiert.



**Abb. 2.2:** APTS – Bindungsreaktion nach [Neuhaus et al., 2006a]

Die APTS – HES Lösung wurde mit HK – 2 Medium zu einer 4,35% APTS – HES Lösung verdünnt und am 7. Tag nach Aussaat für 21 Stunden zu den HK – 2 Zellen gegeben. Anschließend wurden Fluoreszenzbilder aufgenommen wie bei Förster et al. beschrieben [Förster et al., 2005].

## 2.4 EZ4U – Versuche

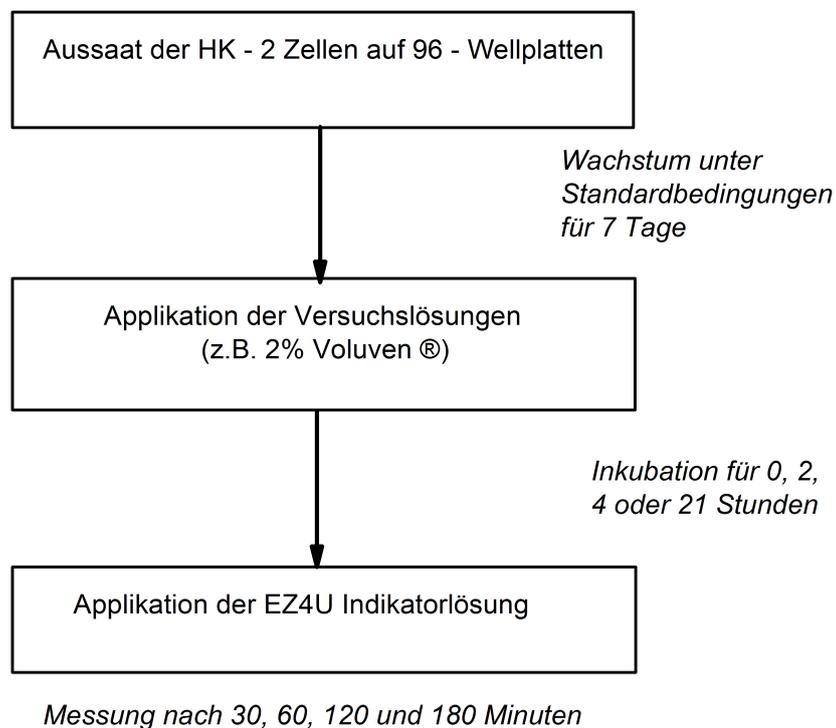
Bei dem EZ4U – Test (XTT – Farbstoff, Biomedica<sup>®</sup>) handelt es sich um einen etablierten nichtradioaktiven Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest.

### 2.4.1 Funktionsprinzip des EZ4U: Durchführung

Das Verfahren stellt eine Weiterentwicklung des MTT – Testes dar. Für den Test wurden die vorher auf 96 – Wellplatten ausgesäten HK – 2 Zellen (siehe Kapitel 2.2) mit dem XTT – Farbstoff (= Na-3,3'-[1-(Phenylamino)-Carbonyl-3,4-Tetrazolium] – bis(4-Methoxy – 6 – nitro) – Benzol-Sulfonsäurehydrat, C<sub>22</sub> H<sub>12</sub> N<sub>7</sub> O<sub>13</sub> S<sub>2</sub> Na, relative Molekülmasse = 674,53) – einem Tetrazoliumsalz – inkubiert [Shimamura et al., 2003]. Zusätzlich enthält der EZ4U – Test einen Aktivator, der die Farbentwicklung im Vergleich zum gewöhnlichen XTT – Test verbessert und die erforderliche Substratstabilität verbessert. Lebende Zellen mit funktionierenden Mitochondrien können durch mitochondriale Dehydrogenasen – vor allem der Succinatdehydrogenase – diese Tetrazoliumsalze zu Formazanen umsetzen. Diese Formazane können die Zellmembran nicht

mehr passieren und akkumulieren in intakten Zellen [Fotakis, 2006]. Voraussetzung für diese Reduktion sind intakte Zellen mit funktionsfähigen Mitochondrien. Bei einem Zellschaden verlieren die Mitochondrien ihre Fähigkeit bereits nach wenigen Minuten. Bei der Messung im Photometer resultiert durch die Herstellung von Fluoreszenzen bei 450 nm (Referenz: 620 nm) eine messbare Absorptionsänderung. Der EZ4U – Test gibt also Auskunft über die Anzahl und den Zustand der lebenden Zellen in einem Well an. Der Begriff „Viabilität“ oder „Zellviabilität“ beschreibt dabei die Gesamtaktivität einer Zellpopulation.

Abbildung 2.3 fasst den üblicherweise durchgeführten Ablauf noch einmal zusammen.



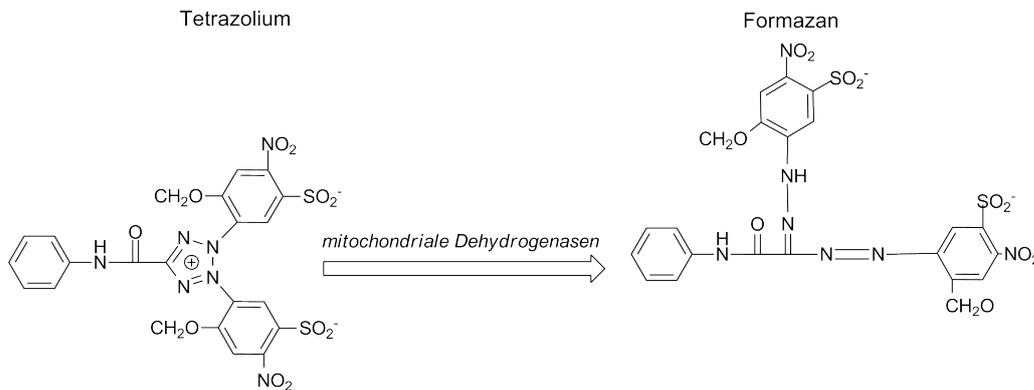
**Abb. 2.3:** Standardablauf des EZ4U – Versuches

### 2.4.2 Vorteile des EZ4U gegenüber dem klassischen MTT–Test

Gegenüber dem klassischen MTT – Test besitzt der EZ4U – Test den Vorteil, dass das gebildete Formazan wasserlöslich ist. Dadurch entfällt die Notwendigkeit der Zugabe von potentiell zytotoxischen Solubilisatoren wie z.B. DMSO. Dies führt dazu, dass die Zellen nach dem Versuch weiter benutzt werden können. Außerdem kann auch auf den

## 2 Methoden

zeitaufwändigen Zwischenschritt zur Lösung des Reaktionsproduktes verzichtet werden. Verantwortlich für diese Verbesserung ist die Einführung von Sulfonsäuregruppen in das Testreagens. Ein Nachteil dieser Modifikation ist, dass die Formazanprodukte eine geringe Stabilität und relativ niedrige Absorptionswerte aufweisen. Diese Probleme wurden durch das Puffergemisch des EZ4U ausgeglichen.



Formazan kann die Zellmembran nicht mehr passieren und akkumuliert in intakten Zellen.

XTT - Farbstoff

(= Na-3,3'-[1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzol-sulfonsäurehydrat,  $C_{22}H_{12}N_7O_{13}S_2Na$ )

nach [Shimamura et al., 2003]

Strukturformeln nach [Scudiero et al., 1988]

**Abb. 2.4:** XTT – und MTT – Strukturformeln nach Scudiero [Scudiero et al., 1988]

### 2.4.3 Aussaat der HK – 2 Zellen für den EZ4U

Für die Versuche wurden die HK - 2 Zellen in einer Konzentration von 50.000 Zellen /  $cm^2$  auf 96 – Well Platten, die zuvor mit 0,5% Gelatine beschichtet worden waren, ausgesät. Dabei ist zu beachten, dass die erste Reihe einer 96 – Wellplatte keine Zellen enthielt. Diese Reihe wurde später als Leerwert (BLANK) verwendet (siehe Kapitel 2.4.6 auf Seite 47). Das Wachstum erfolgte analog zu den oben geschilderten Bedingungen. Das Nährmedium – 200  $\mu l$  pro Well – wurde nach 7 Tagen entfernt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit „Dulbeccos Phosphate buffered saline without  $Ca^{2+}$  and without  $Mg^{2+}$ “ (PBS, Kat.Nr. I1825, Biochrome AG, Berlin) gewaschen und

die zu untersuchenden Lösungen appliziert. Je nach Versuchsaufbau wurden die HK – 2 Zellen für 0, 2, 4 oder 21 Stunden mit diesen Lösungen inkubiert. Wenn im Kapitel 3 nicht explizit anders erwähnt, galt dieses Standardverfahren.

### 2.4.4 Weitere EZ4U – Versuche

Neben dem Standardverfahren waren auch andere Aussaatszenarien notwendig. Dies betraf die Interaktion zwischen HES und den Versuchsreagenzien, die Stimulation der HK – 2 Zellen mit inflammatorischen Substanzen und die Prüfung einer potentiellen Reversibilität des HES – Effekts.

#### Messung der Interaktion zwischen HES und XTT – Farbstoff

Die zu untersuchende Substanz, die Hydroxyethylstärke, könnte theoretisch sowohl mit dem Substrat des EZ4U, dem Tetrazoliumsalz, als auch mit dem Produkt des EZ4U, dem Formazan, interagieren.

#### Messung der Interaktion zwischen HES und Tetrazoliumsalz

Um auszuschließen, dass das Substrat des EZ4U – Tests mit HES reagiert, wurden 96 – Wellplatten wie üblich mit Gelatine beschichtet. Dann wurden die Versuchslösungen (zur Herstellung der Versuchslösungen siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 32) 0%, 1% und 4% Voluven<sup>®</sup> und Volulyte<sup>®</sup>, sowie 0,67% und 2,67% Gelafundin<sup>®</sup> und 16,67% und 66,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO in die zelllosen Wells appliziert. Nach 4 Stunden Inkubation wurde die Extinktion im Photometer, wie in Abschnitt 2.4.6 auf Seite 47 beschrieben, gemessen. Um mögliche Interaktionen durch die Verdünnung zu vermeiden, wurden wie üblich mit Gelatine beschichtete 96 – Wellplatten mit unverdünntem 0,9% NaCl – Lösung und 6% Voluven<sup>®</sup> für 21 Stunden inkubiert. Anders als bei den übrigen Versuchen wurde bei der Messung der Interaktion zwischen HES und Tetrazoliumsalz darauf verzichtet, den Blank – Wert von den Messwerten abzuziehen.

#### Messung der Interaktion zwischen HES und Formazan

Um ferner auszuschließen, dass es zu einer Interaktion zwischen der zu untersuchenden Lösung Hydroxyethylstärke und dem Produkt des EZ4U (Formazan) kommt, wurde folgender Versuch durchgeführt. Zunächst wurde ein Well einer 6 – Wellplatte, in dem für 7 Tage HK – 2 Zellen unter Standardbedingungen (siehe 2.4.3 auf Seite 43) kultiviert worden waren, für 2 Stunden mit 0% – Lösung, die nur HK – 2 Medium und

## 2 Methoden

0,9% NaCl enthielt (siehe 2.1), inkubiert. Dann wurden sofort 1,2 ml EZ4U – Reaktionslösung hinzugegeben, um das Substrat umsetzen zu lassen.

**Tabelle 2.5:** Versuchslösungen für den XTT – Interaktionstest

HES in %	NaCl 0,9% [ml]	Medium [ml]	HES 6% [ml]
1	2,7915	1,375	0,8335
2	1,9585	1,375	1,6665
4	0,2915	1,375	3,3335

Währenddessen wurde eine 96 – Wellplatte mit 0,5% Gelatine beschichtet und danach die Lösungen pH – eingestellt und steril filtriert auf die Platten gegeben. Nach Ablauf der zwei Stunden Inkubation wurden je 1,8 ml 0% – Lösung mit umgesetztem XTT – Farbstoff von der 6 – Wellplatte und 1,8 ml von den hergestellten Voluven® – Lösungen in neue 50 ml Biofugenröhrchen pipettiert. Die fertigen Lösungen wurden gevortext. Abschließend wurden 220 µl in jedes Well der 96 – Well Platte appliziert. Die erste Messung im Photometer erfolgte sofort, die zweite nach 40 Minuten und die dritte nach 23 Stunden.

### Stimulation der Zellen mit inflammatorischen Mediatoren

Sollten die Auswirkungen inflammatorischer Mediatoren auf die HK – 2 Zellviabilität im EZ4U untersucht werden, wurden zunächst Zellen auf 96 – Wellplatten – wie in Abschnitt 2.4.3 auf Seite 43 beschrieben – ausgesät. Als inflammatorische Zytokine wurden TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor $\alpha$ ) und LPS (Lipopolysaccharid) benutzt. Das TNF $\alpha$  und das LPS (L6529) wurden von Sigma® bezogen. Vor der Applikation wurden Stocklösungen hergestellt. Das LPS von Sigma (E. coli 055:B5) hatte eine Konzentration von 1500 µg / ml. Dies wurde zuerst auf 100 µg LPS / ml verdünnt. Aus dieser Lösung wurde eine 1 zu 10 verdünnte Lösung mit 10 µg / ml hergestellt. Diese wiederum wurde nochmals 1 zu 10 verdünnt, so dass auch eine 1 µg / ml – Lösung hergestellt wurde. Diese 1 µg / ml LPS – Lösung wurde weiter verdünnt, sodass die Versuchslösungen 1 bis 1000 ng / ml LPS enthielten. Außerdem wurden Lösungen hergestellt, die

**Tabelle 2.6:** Herstellung der inflammatorischen Lösungen (Angaben in [%])

Versuchslösung:	Medium	NaCl 0,9%	TNF $\alpha$ / LPS	HES
0,1 ng TNF $\alpha$	27,5	71,5	1	–
1 ng TNF $\alpha$	27,5	71,5	1	–
10 ng TNF $\alpha$	27,5	71,5	1	–
100 ng TNF $\alpha$	27,5	71,5	1	–
1 ng LPS	27,5	71,5	1	–
10 ng LPS	27,5	71,5	1	–
100 ng LPS	27,5	71,5	1	–
1000 ng LPS	27,5	71,5	1	–
0%	27,5	71,5	1	–
10 ng TNF $\alpha$ + 1,5 % HES	27,5	46,5	1	25
10 ng LPS + 1,5 % HES	27,5	46,5	1	25

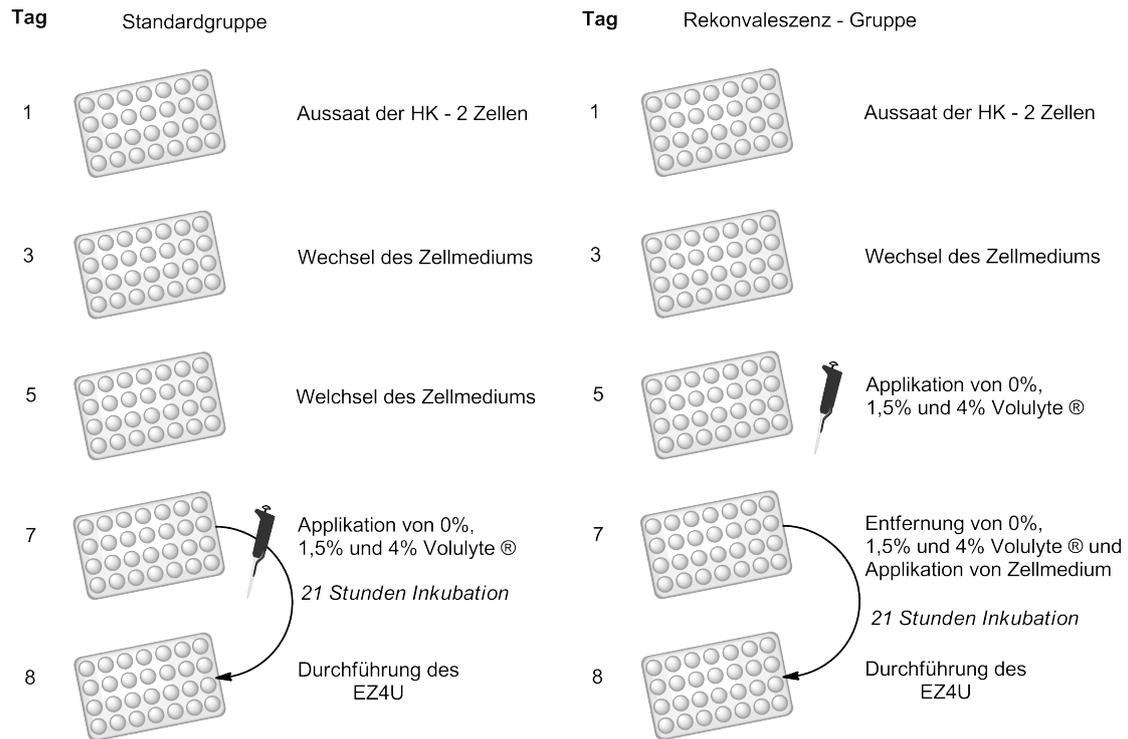
zusätzlich 1 % HES enthielten (siehe Abschnitt 2.6 auf Seite 46). Als Versuchslösungen dienten die in Tabelle 2.6 dargestellten Lösungen.

Die HK – 2 Zellen wurden 21 Stunden mit den Versuchslösungen inkubiert. Der LPS – Versuch wurde sowohl mit Voluven<sup>®</sup> als auch mit Volulyte<sup>®</sup> mit pH – Korrektur durchgeführt. Die Applikation des LPS erfolgte dabei nach der Sterilfiltration der pH – korrigierten Versuchslösungen, um zu verhindern, dass sich das LPS an die Plastikoberflächen des Filters anhaftet.

### Reversibilitätsversuch

Um zu bestimmen, ob es sich bei den beobachteten Auswirkungen der Versuchslösungen auf die HK – 2 Zellen um einen irreversiblen Effekt handelt, wurde folgender Versuch durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen wie in Kapitel 2.4.3 auf Seite 43 beschrieben ausgesät. Nach 4 Tagen Wachstum erhielten bestimmte Wells statt des Zellmediums die Versuchslösungen 0%, 1,5% Volulyte<sup>®</sup> oder 4% Volulyte<sup>®</sup> für 3 Tage. Nach diesen 3 Tagen erhielten diese Gruppen zur Rekonvaleszenz wieder für 21 Stunden Zellmedium. Dafür wurden die Zellen, die vorher 7 Tage lang nur Zellmedium erhalten hatten, für 21 Stunden die Versuchslösungen 0%, 1,5% Volulyte<sup>®</sup> oder 4% Volulyte<sup>®</sup>. Nach den 21 Stunden wurde der EZ4U wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben durchgeführt. Die Abbildung 2.5 veranschaulicht diesen Versuch.

## 2 Methoden



**Abb. 2.5:** Durchführung des EZ4U zur Reversibilität des HES – Effektes

### 2.4.5 Photometrische Messung der Extinktion

Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubation wurde das EZ4U – Substrat in dem zugehörigen Aktivator (ACT) gelöst und je 20 µl in jedes Well pipettiert. Nachdem alle Versuchsplatten so vorbereitet worden waren, wurden sie in den Inkubator zurückgebracht. Die photometrische Messung mittels des „Mircoplate reader Sunrise™“ von der Firma Tecan und die Datenanalyse durch die „Magellan™ – Software“ erfolgte nach 30, 60, 120 und 180 Minuten bei 450 nm (620 nm Referenz).

### 2.4.6 Auswertung des EZ4U

Die gemessenen Absorptionswerte wurden zunächst in das Microsoft® – EXCEL – Format konvertiert. Zuerst wurde der Mittelwert der zelllosen Reihe jeder Platte berechnet (= Blank). Im nächsten Schritt wurde dieser Mittelwert als Korrekturwert von allen anderen Messwerten subtrahiert. Um die Auswertung zu vereinfachen, wurde dann der plattenspezifische Mittelwert der 0% – Lösung (27,5% Nährmedium und 72,5% NaCl 0,9%) als plattenspezifische 100% Viabilität definiert. Eine Ausnahme stellt dabei der

EZ4U mit im Zellmedium gelöstem HES dar, der in Abschnitt 2.1.4 auf Seite 36 beschrieben wird. Bei diesem wird die Medium – Gruppe als 100% definiert. Im letzten Schritt wurde das prozentuale Verhältnis jedes einzelnen Messwertes zu dem als 100% definierten Mittelwert errechnet. Die statistische Analyse der Viabilitätswerte erfolgte durch einen zweiseitigen „Student's t – test“ (Microsoft Excel™). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte (= MW) ± Standardabweichung (= SD) des Mittelwertes. Eine Signifikanz wurde bei einem p – Wert < 0,001 angenommen.

## 2.5 LDH – Versuche

Neben dem EZ4U – Viabilitätstest wurde ein weiterer Test zur Bestimmung der Zellschädigung – der LDH–Test – herangezogen.

### 2.5.1 Funktionsprinzip des LDH – Tests

Bei dem LDH–Test handelt es sich um das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von der Firma Roche Applied Science®. Wie der EZ4U – Test gilt der LDH – Assay als valide und hinreichend erprobte Methode zur Detektion von irreversiblen Zelltod [Decker, 1988] [Fukumoto et al., 2001].

Anders als im EZ4U wird hierbei nicht die mitochondriale Funktionsfähigkeit der Zelle, sondern die Integrität der Zellmembran bestimmt [Fotakis, 2006]. Ist diese zum Beispiel durch einen nekrotischen Prozess beschädigt, gelangen normalerweise intrazellulär vorkommende Enzyme aus der Zelle heraus. Das Enzym LDH (= Laktatdehydrogenase) hat den Vorteil, dass es extrazellulär intakt und somit messbar bleibt. Daher wird die LDH auch in der klinischen Routine als Blutparameter für die Diagnose verschiedener Krankheiten eingesetzt [Steyerberg et al., 2012] [Gurkan et al., 2010] [Gkotzamanidou et al., 2011].

Die in allen menschlichen Zellen vorkommende Laktatdehydrogenase reduziert im LDH – Assay  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  indem es L–Laktat zu Pyruvat oxidiert. Im zweiten Schritt wird das dazugegebene blass gelbe Tetrazolium – Salz INT (2–[4–Iodophenyl]–3–[4–Nitrophenyl]–5–Phenyltetrazoliumchlorid) durch die Laktatdehydrogenase unter Zugabe eines Katalysators (Diaphorase) zu rotem Formazan umgesetzt. Dabei wird das  $\text{NADH} + \text{H}^+$  wieder zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Die anschließende Messung der Zytotoxizität geschieht durch die photometrische Messung der LDH – Menge nach der Inkubation mit der Versuchslösung. Je höher die gemessene Absorption ist, desto höher ist der Zellschaden.

### 2.5.2 Vorbereitung des LDH – Tests

Die Aussaat und Kultivierung der HK – 2 Zellen geschah wie für den EZ4U – Versuch (siehe Kapitel 2.4.3 auf Seite 43) auf 96 – Wellplatten. Nach 7 Tagen Wachstum wurde das HK – 2 Medium entfernt und die Zellen zweimal mit Hanks' balanced salt solution (HBSS, H9394 Sigma, Sigma–Aldrich®) gespült. Dieser Waschschrift war notwendig, weil im beim Zellwachstum eingesetzten HK – 2 Medium 10% FCS zugesetzt ist (siehe Kapitel 2.2 auf Seite 39). Im FCS ist physiologischerweise eine unbestimmte Menge an LDH vorhanden, das die Aussagekraft des LDH – Assays beeinträchtigen könnte. Die Zusammensetzung der Versuchslösungen wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 32). Allerdings wurde ein Pyruvat – freies Medium. zugesetzt, da das im HK – 2 Medium enthaltene Pyruvat das Produkt der LDH – Reaktion darstellt.

### 2.5.3 Durchführung des LDH – Tests

Nach 24 Stunden Inkubation mit den Versuchslösungen (siehe Kapitel 2.1 auf Seite 32) wurde 5 µl „Lysis solution“ in Wells pipettiert, die im Versuchsaufbau als „High control“ definiert worden sind. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgte die Applikation von 100 µl Reaktionsmix in jedes Well. Dieser besteht aus der Diaphorase und NAD<sup>+</sup>, das in einer Lösung aus Iodotetrazoliumchlorid (INT) und Natrium Lactat gelöst war. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden 50 µl / Well „Stop solution“ in jedes Well appliziert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung mittels des „Mircoplate reader Sunrise™“ von der Firma Tecan und die Datenanalyse durch das Programm „Magellan™– Software“ bei 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

### 2.5.4 Auswertung des LDH – Tests

Die gemessenen Absorptionswerte wurden zunächst in das Microsoft® – EXCEL – Format konvertiert. Zuerst wurde der Mittelwert zelllosen Reihe jeder Platte berechnet (= Blank). Im nächsten Schritt wurde dieser Mittelwert als Korrekturwert von allen anderen Messwerten subtrahiert.

Im Versuchsaufbau des LDH – Assays sind drei Kontrollen vorgesehen:

- „**High control**“: 0% – Kontrollgruppe (27,5% Nährmedium und 72,5% NaCl 0,9%), die 15 min vor Applikation lysiert wurde

- „**Low control**“: unbehandelte 0% - Kontrollgruppe (27,5% Nährmedium und 72,5% NaCl 0,9%)
- „**Medium**“: mit reinem Zellmedium Zellen

Die relative Zytotoxizität wurde berechnet, indem vom jeweiligen Einzelmesswert der Mittelwert der unbehandelten 0% – Kontrollgruppe subtrahiert wurde. Der erhaltene Wert wurde durch den Mittelwert der „High control“ – Gruppe abzüglich des Einzelmesswertes des Mittelwertes der unbehandelten 0% – Kontrollgruppe dividiert. Das Ergebnis wurde mit dem Faktor 100 multipliziert, um so das prozentuale Verhältnis zur maximalen Schädigung („High control“) zu erhalten.

$$\text{Zellschaden pro Well [\%]} = 100 \cdot \frac{(\text{Einzelmesswert} - \text{low control})}{(\text{high control} - \text{low control})}$$

Anschließend wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der Einzelwerte jeder Versuchslösung berechnet. Die statistische Analyse der Zytotoxizitätswerte erfolgte durch einen zweiseitigen „Student’s t – test“ (Microsoft Excel™). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes. Eine Signifikanz wurde bei einem p – Wert  $< 0,05$  angenommen.

## 2.6 Die real–time quantitative RT–PCR

### 2.6.1 Funktionsprinzip der real–time quantitative RT–PCR

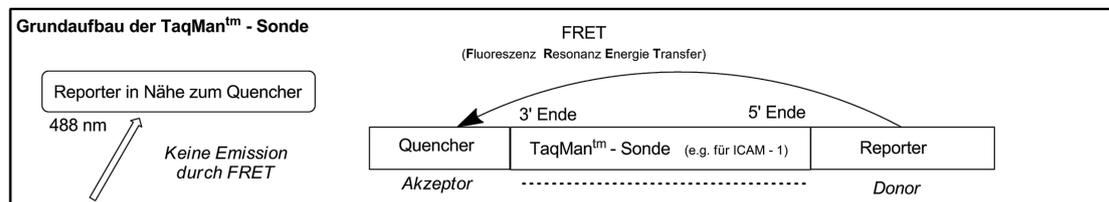
Bei der real–time quantitativen RT–PCR (auch qRT – RT – PCR) handelt es sich um eine etablierte Methode zur Quantifizierung der Expression bestimmter Gene [Wickert, 2007]. Im Prinzip handelt sich dabei um eine durch spezifische Primer – definierte enzymatische *in – vitro* – Replikation, bei der durch sich wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird.

Um zu quantifizieren, ob sich die Expression eines Gens in Form seiner RNA unter bestimmten Bedingungen verändert, mussten zunächst Zellen ausgesät (siehe unten), mit Versuchslösungen behandelt und lysiert werden. Aus dem Lysat musste die probenspezifische RNA extrahiert (siehe Abschnitt 2.6.3 auf Seite 53) und in cDNA umgewandelt werden (siehe Abschnitt 2.6.4 auf Seite 53). Untersucht wurde somit nicht eine veränderte Proteinexpression, sondern die Reaktion der HK – 2 Zelle auf bestimmte Stimuli, z.B. 2% Voluven® , auf der Ebene des veränderten mRNA – Gehaltes der Zelle.

Für die gesuchte RNA wurden verschiedene Sonden (TaqMan™ — Sonden) von der Firma Applied Biosystems bezogen. Jede dieser Sonden besteht aus drei Komponenten:

- Der *Primer*, einem Oligonukleotid, der komplementär zur gesuchten Zielsequenz (z.B. ICAM – 1) ist.
- Der *Reporter*, der einen Fluoreszenzfarbstoff enthält.
- Der *Quencher*, der bei intakter Sonde den *Reporter* unterdrückt.

Der Reporter ist mit seinem Fluoreszenzfarbstoff kovalent an das 5' – Ende, der Quencher an das 3' – Ende der Sonde gebunden. Die Unterdrückung der Emission des Reporters durch den Quencher geschieht dabei durch den „Fluoreszenz Resonance Energy Transfer“ (FRET). Der Reporter fungiert als Donor und der sich in ausreichender räumlicher Nähe befindende Quencher als Akzeptor von Energie. Der Austausch geschieht dabei strahlungsfrei und somit nicht über Emission und Absorption von Photonen [Förster, 1948]. Voraussetzung ist, dass sich beide in ausreichender Nähe zueinander befinden. Das Funktionsprinzip der Hybridisierungssonden ist in Abbildung 2.6 und 2.7 zusammengefasst.



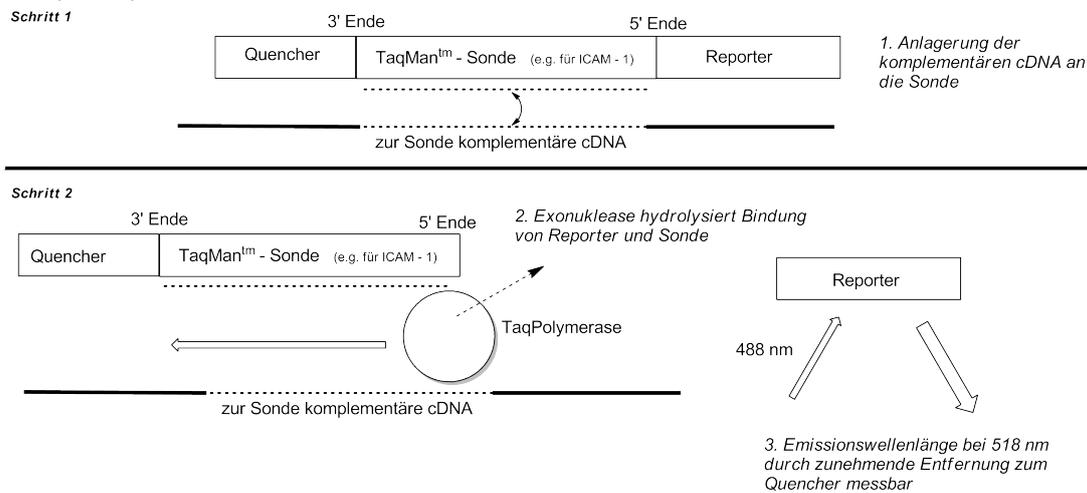
**Abb. 2.6:** Grundaufbau der Hybridisierungssonden in der Real – Time – PCR

Lagert sich der Primer der TaqMan™ – Sonde während der PCR an den komplementären DNA – Strang der Probe, wird durch die 5' – 3' – Exonukleaseaktivität der Taq – Polymerase der Reporter durch Hydrolyse abgespalten. Da nun kein Akzeptor mehr in unmittelbarer Nähe vorhanden ist, emittiert der Reporter sein spezifisches Emissionsspektrum. Dieses Emissionsspektrum ist bis zur Plateau – Phase der PCR proportional zum Vorkommen der gesuchten DNA / RNA. Dieses Verfahren ermöglicht somit die direkte Quantifizierung der DNA – Menge in Echtzeit [Wickert, 2007]. Der in der TaqMan™ eingesetzte Reporter benutzt dabei 6 – FAM – Phosphoramidit als Fluoreszenzfarbstoff. Bei 6 – FAM – phosphoramidit handelt es sich um das Phosphoramidit

## 2 Methoden

– Derivat des 6 – Carboxyfluorescein (FAM). Seine Anregungswellenlänge liegt bei 488 nm, die Emissionswellenlänge bei 518 nm.

### Prinzip der TaqMan<sup>™</sup> - Sonde



**Abb. 2.7:** Funktionsprinzip der Hybridisierungssonden in der qRT – RT – PCR

### 2.6.2 Aussaat und Lysis der HK – 2 Zellen für eine qRT – RT – PCR

Die unter Standardbedingung kultivierten HK – 2 Zellen (siehe Kapitel 2.2 auf Seite 39) wurden auf 0,5% Gelatine beschichtete 6 – Wellplatten (Nunclon<sup>™</sup>  $\Delta$  Surface) mit 50 000 Zellen / cm<sup>2</sup> ausgesät. Dies entsprach bei einer Oberfläche von 9,6 cm<sup>2</sup> und einem Füllvolumen von 3 ml / Well einer Aussaatlösung von 160 000 Zellen / ml. Danach wurden die 6 – Wellplatten analog zu den 96 – Wellplatten für 7 Tage kultiviert. Nach Abschluss des Wachstums wurde am siebten Tag das Nährmedium entfernt und durch die Versuchslösung ersetzt (siehe Kapitel 2.1 auf Seite 32).

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen für 4 oder 21 Stunden mit den Versuchslösungen inkubiert. Anschließend wurde die Wells mittels der Vakuumbabsaugung von den Versuchslösungen befreit und jedes Well mit 6 ml PBS – Lösung zweimal gespült. Zur RNA – Isolierung wurde das RNA – Isoliertkit „Nucleonspin – RNA II“ von Macherey Nagel (REF. 740955.250) verwendet. Sofern die im Kapitel 2.6.2 und 2.6.3 aufgeführten Materialien nicht explizit einem anderen Hersteller zugeordnet werden, entstammen sie diesem Kit. Um die Zellen zu lysieren, wurden 350  $\mu$ l RA – 1 Buffer des Kits und 3,5  $\mu$ l  $\beta$  – Mercaptoethanol pro Well appliziert. Zum Lösen der Zellen wurde der „Cell Scraper“ (CAT.No. 90020, SPL – Life sciences) benutzt. Die gewonnene Zellsuspension wurde in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und entweder bei – 80 °C eingefroren

oder direkt weiterverarbeitet (siehe Kapitel 2.6.3).

### 2.6.3 Extraktion der RNA

Die im RA – 1 Buffer mit 1%  $\beta$  – Mercaptoethanol lysierten Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abziehen in Insulinspritzen (Omnican<sup>®</sup> 40, B. Braun Melsungen) homogenisiert. Die auf diese Weise homogenisierten Proben wurden danach durch den Nucleospin – Filter filtiert und bei 11 000 g für eine Minute zentrifugiert. Das gewonnene Filtrat wurde in autoklavierte Eppendorf Reaktionsgefäße gefüllt und 70% absolutes Ethanol hinzugegeben. Nachdem die Proben gevortexed worden waren, wurden sie auf Säulentubes aus dem KIT aufgetragen und zentrifugiert. Es folgte die Applikation von 350  $\mu$ l MDB – Buffer (Entsalzungspuffer) pro Probe. Nach der Zentrifugation wurde 95  $\mu$ l DNase – Mix, bestehend aus je 10  $\mu$ l rDNase und 90  $\mu$ l Reaction buffer, pro Probe auf die Säulen der Tubes appliziert. Mit diesem wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation erfolgten drei Waschschrte mit zuerst 200  $\mu$ l RA2 – Buffer, dann 600  $\mu$ l RA3 – Buffer und zuletzt noch einmal 250  $\mu$ l RA3 – Buffer. Nach jedem Waschschrte wurden die Tubes zentrifugiert (30 Sekunden, 30 Sekunden, 3 Minuten bei 11 000 g). Zuletzt wurde 40  $\mu$ l RNase freies Wasser auf jede Probe gegeben und durch eine Minute Zentrifugation die so gelöste RNA gewonnen. Mittels des Spektrophotometers Nanodrop 2000 D (Thermo Scientific) wurde die Konzentration der RNA bei 260 / 280 nm in jeder gewonnenen Probe mit 1,2  $\mu$ l bestimmt.

### 2.6.4 Gewinnung der cDNA

Zur Umwandlung der gewonnenen Proben – RNA in cDNA wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor“ von Applied Biosystems<sup>™</sup> verwendet. Grundprinzip ist die Umschreibung der RNA in cDNA mittels der MultiScribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase. Dabei handelte es sich um eine rekombinante Transkriptase des Moloney murinen Leukämie Virus (rMoMuLV). Wenn die im Kapitel 2.6.4 aufgeführten Materialien nicht explizit einem anderen Hersteller zugeordnet werden, entstammen sie diesem Kit. Pro Probe wurde ein 2X RT Master Mix aus folgenden im Kit enthaltenden Komponenten benötigt (siehe Tabelle 2.7). Die RNA – Probe musste mit Nuclease freiem Wasser so verdünnt werden, dass ihre Konzentration im PCR – Cup 1  $\mu$ g RNA pro 20  $\mu$ l Ansatz betrug.

Nachdem in jedes PCR – Cup je 10  $\mu$ l 2X RT Master Mix, die zur Verdünnung erforderliche Menge an Nuclease freiem Wasser und die entsprechende Menge der RNA-Probe

**Tabelle 2.7:** cDNA – Kit

<b>COMPONENT</b>	<b>VOLUME</b> [ $\mu$ ] / Reaction
10X RT Buffer	2
25X dNTP (100Mm)	0,8
10X RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
RNAse Inhibitor	1
Nuklease free Water	3,2
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>

pipettiert worden war, wurde jedes Cup mit dem Vortexmischer behandelt. Im Thermocycler (Thermal cycler 2720 von Applied Biosystems™) erfolgte die reverse Transkription unter den in 2.8 aufgeführten Bedingungen.

**Tabelle 2.8:** Thermocycler für cDNA – Herstellung

THERMOCYLCER	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatur [ $^{\circ}$ C]	25	37	85	4
Time [min]	10	120	5	$\infty$

### 2.6.5 Durchführung der qRT – RT – PCR

Der erste Arbeitsschritt bestand in der Herstellung des Master – Mixes. Dieser enthielt pro Well 12,5  $\mu$ l Absolute RT – PCR ROX – Mix (AB – 1138, Applied Biosystems), 1,25  $\mu$ l der entsprechenden 20x TaqMan™ – Sonde und 6,25  $\mu$ l Nuclease freies Wasser. Für jede TaqMan™ – Sonde wurde also ein eigener Master – Mix hergestellt. Von diesem wurde dann je 20  $\mu$ l in jedes Well der 96 – Wellplatte (96-Well-plates von Nunc, Thermo scientific 167008) pipettiert. Anschließend wurden 5  $\mu$ l der vorher im Verhältnis 1 : 10 mit Nuclease freiem Wasser verdünnten Proben – cDNA in jedes Well pipettiert und mehrfach auf- und abgezogen. Sobald alle Wells der 96 – Wellplatte sowohl den Master – Mix als auch die cDNA enthielten, wurde die Versuchsplatte mit einer transparenten Kunststoffolie abgeklebt und für 5 Minuten in der Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16 R) zentrifugiert. Danach wurde sie in den PCR – Cyler (7300 Real-Time PCR-System, Applied-Biosystems) gegeben. Im Steuerungsprogramm „PCR – Cyler 7300“ wurde der Modus „Relative Quantification“ gewählt, die applizierten TaqMan™ – Sonden als „FAM“ eingestellt und die 18sRNA – Sonde als „ENDO“ (endogene Kontrolle) definiert.

Anschließend wurden alle Felder der 96 – Wellplatte mit Sondentyp (TaqMan™), Task (z.B. ENDO für die endogene Kontrolle) und Probe (z.B. 2 % Voluven®) beschriftet. Untersucht wurden die TaqMan™ – Sonden für CCL – 2 (Hs00234140\_m1, Part.Nr. 4331182, Applied Biosystems), ICAM – 1 (Hs00164932\_m1, Part.Nr. 4331182, Applied Biosystems) und 18sRNA (endogene Kontrolle, EUK18SrRNA, 4352930 – 0810022, Applied Biosystems).

### 2.6.6 Auswertung der qRT – RT – PCR

Die relative mRNA – Menge der 18sRNA wurden durch die ddCt Methode berechnet. Dabei wurde die folgende Formel angewandt:

$$2^{\text{Ct der 18s RNA} - \text{Ct der untersuchten Sonde}}$$

**Abb. 2.8:** Formel: Berechnung der relativen mRNA-Menge durch die ddCt Methode

Dabei steht Ct für den „threshold cycle value“ (Schwellenwert). Um die Proben zu vergleichen, wurden die Ergebnisse der 0% – Kontrolllösung als „1“ gesetzt.

## 2.7 Verwendete Software

Microsoft EXCEL™ 2007, TeXnicCenter, MikeTEX 2.8, ChemBioDraw Ultra 12.0, Jab-Ref 2.9.2, OriginPro 9.0G 32Bit, Adobe Acrobat Reader 11.0, Paint.Net v.3.5.11,

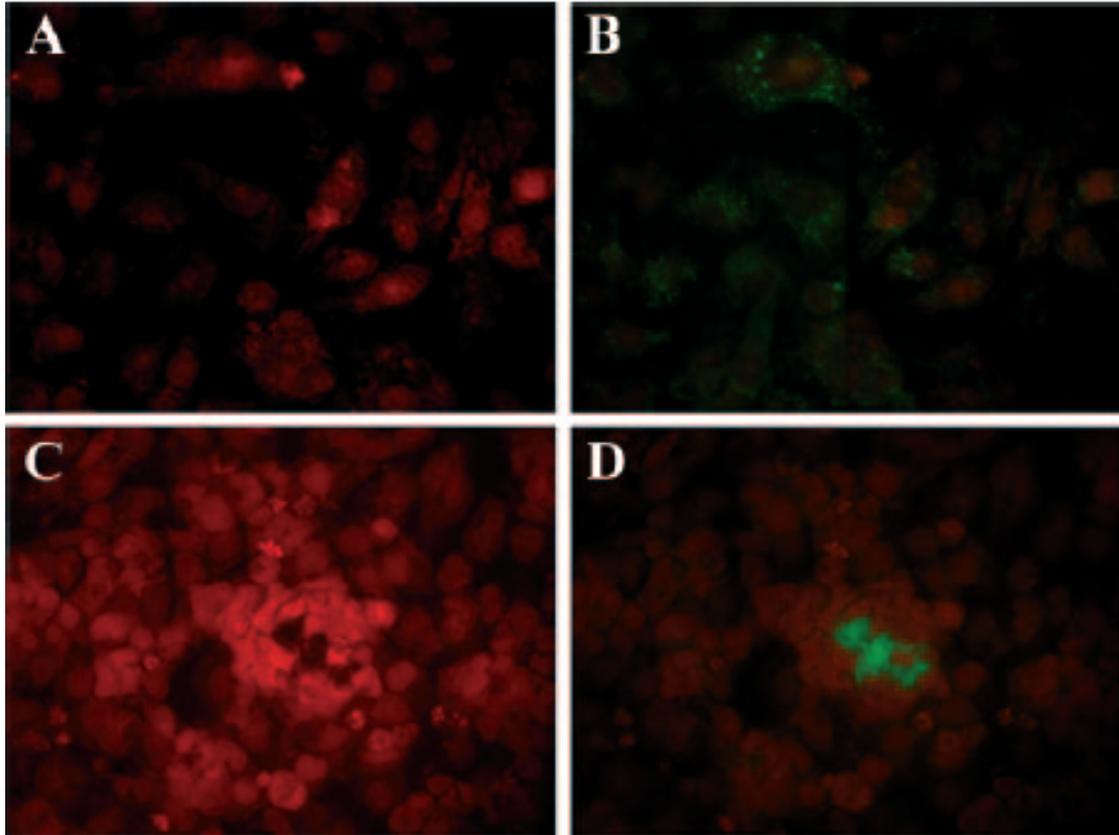
## 3 Ergebnisse

Wie in der Einleitung im Abschnitt 1.5 auf Seite 31 beschrieben, begann die Forschung für diese Dissertation mit der näheren Einordnung der nephropathologischen Auffälligkeiten, die Schick et al. in den mit kolloidalen Infusionslösungen behandelten Rattenieren gefunden hatte [Schick et al., 2010]. Das in der Folge entwickelte *in vitro* – Modell nutzt, wie in der Methodik im Kapitel 2.2 auf Seite 39 ausführlich dargelegt, immortalisierte humane proximale Tubulusepithelzellen. In diesem Modell sollten die Auswirkungen der zuvor *in vivo* erprobten Infusionslösungen Voluven<sup>®</sup>, Gelafundin<sup>®</sup>, Humanalbumin und Sterofundin<sup>®</sup> ISO auf die Viabilität der HK – 2 Zellen erforscht werden. Dabei ging es zunächst insbesondere um die Frage, inwiefern inflammatorische Prozesse bei der Schädigung der Nierenzellen eine Rolle spielen. Diese Fragestellung stand deshalb im Vordergrund, weil sowohl die *in vivo* – Vorarbeiten von Schick et al. als auch die großen klinischen Studien durch z.B. Brunkhorst et al. gezeigt hatten, dass HES in der Sepsis besonders schädlich wirkt. Danach sollte überprüft werden, ob *in vitro* überhaupt eine funktionell relevante Beeinträchtigung der Zellfunktion durch kolloidale Infusionslösungen vorliegt. Um diese Fragen diskutieren zu können, musste in einem ersten Schritt überprüft werden, ob die von Schick et al. gesehenen Vesikel im *in vitro* – Modell reproduziert werden konnten und ob diese überhaupt HES enthielten.

### 3.1 Die Aufnahme von HES in HK – 2 Zellen

Um dies zu überprüfen und optisch sichtbar zu machen, wurde HES 130 / 0,4 – wie in Abschnitt 2.3 auf Seite 40 dargestellt — mit fluoreszierendem APTS markiert. Die Versuchslösung bestand zu 72,5% aus der hergestellten 6% APTS – HES und zu 27,5% aus HK – 2 Zellmedium. Daraus entstand eine 4,35% APTS – HES Lösung. Diese wurde für 21 Stunden mit den HK – 2 Zellen inkubiert. Die anschließend durchgeführten Aufnahmen – gezeigt in Abbildung 3.1 – zeigen sowohl eine vesikelartige Anordnung (3.1 B) als auch größere Agglomerate (3.1 D) von APTS – HES um die rot gefärbte DNA herum gruppiert.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.1:** Fluoreszenzbilder der Aufnahme von APTS – Hydroxyethylstärke (grün) in HK – 2 Zellen. Für die Bilder wurden HK – 2 Zellen für 21 Stunden mit 4,35% APTS HES 130 / 0,4 inkubiert. Dabei zeigen sich sowohl vesikuläre (B), als auch Agglomerate (D) von APTS – markiertem HES. Die korrespondierenden Zellkerne (rot) wurden mit Propodiumiodid (A, C) angefärbt.

Diese Vorversuche konnten erstens zeigen, dass HES in die HK – 2 Zelle gelangt und sich zweitens auf eine der *in vivo* von Schick et al. gesehenen Art und Weise anordnet. Letzteres wird in Abschnitt 4.1 auf Seite 115 noch einmal näher diskutiert.

## 3.2 Bestimmung der Rolle von Inflammation bei den Auswirkungen von HES auf die Zellviabilität

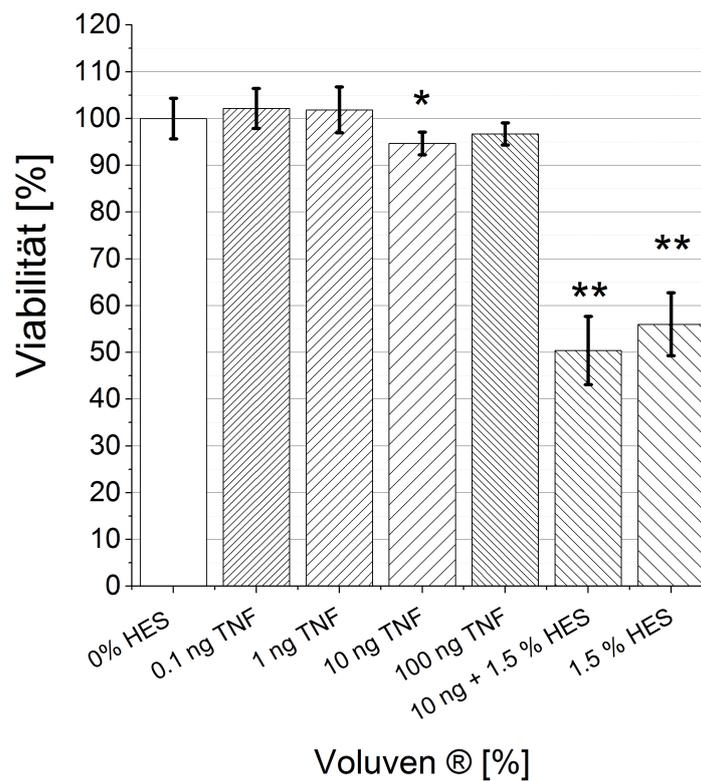
Aus klinischen Studien und den Vorarbeiten *in vivo* ist bekannt, dass HES im Rahmen inflammatorischer Zustände besonders negative Auswirkungen auf die Nierenfunktion aufweist [Schick et al., 2010] [Brunkhorst et al., 2008]. In den folgenden Versuchen soll untersucht werden, ob die vermutete negative Wirkung von HES auf die Zellviabilität durch die Induktion einer Inflammation erklärt werden kann oder durch Zugabe inflammatorischer Stimuli gesteigert wird.

Proximale Tubulusepithelzellen sind nicht nur Ziel entzündlicher Prozesse, sondern gelten als aktive Protagonisten bei der Steuerung inflammatorischer Prozesse, sie produzieren Zytokine, Chemokine und verschiedene Adhäsionsmoleküle [Park et al., 2010].

### 3.2.1 Die Auswirkung von $\text{TNF}\alpha$ und LPS auf die Zellviabilität

Zunächst wurde bestimmt, ob verschiedene Dosierungen von LPS und  $\text{TNF}\alpha$  eine funktionelle Beeinträchtigung der Zellviabilität bewirken können. Außerdem wurde untersucht, ob diese Auswirkungen mit der vermuteten durch HES hervorgerufenen Reduktion der Zellviabilität vergleichbar sind und ob die HES – Wirkung durch zusätzliche Gabe von LPS oder  $\text{TNF}\alpha$  verstärkt werden kann.

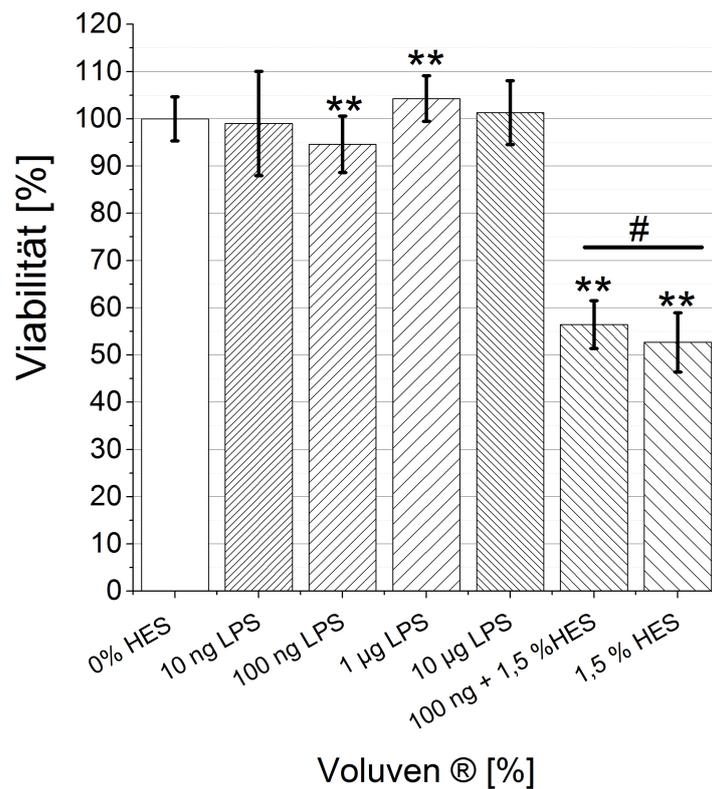
### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.2:** EZ4U: 0,1 ng / ml – 100 ng / ml TNF $\alpha$  und Voluven<sup>®</sup> (MW  $\pm$  SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%, n = 48 – 32) nach 21 Stunden

In Abbildung 3.2 werden die Messergebnisse des EZ4U mit verschiedenen Konzentrationen von TNF $\alpha$  mit und ohne zusätzlicher Voluven<sup>®</sup> – Gabe nach 21 Stunden Inkubation gezeigt. Dabei zeigt sich, dass sich die TNF $\alpha$  – Versuchslösungen mit Ausnahme der 10 ng / ml TNF $\alpha$  enthaltenden Lösung nicht statistisch signifikant unterscheiden. Die Viabilität lag für 0,1 ng / ml TNF $\alpha$  bei 85,23%  $\pm$  22,08% SD, für 1 ng / ml TNF $\alpha$  bei 101,84%  $\pm$  6,15% SD, für 10 ng / ml TNF $\alpha$  bei 94,67%  $\pm$  8,21% SD (statistisch signifikant gegenüber der 0% – Referenzlösung) und für 100 ng / ml TNF $\alpha$  bei 96,72%  $\pm$  5,95% SD. Die 1,5% Voluven<sup>®</sup> enthaltende 10 ng / ml TNF $\alpha$  – Lösung reduziert die Viabilität hingegen statistisch hoch signifikant auf 50,39%  $\pm$  8,43% SD. Die Messwerte dieser kombinierten Lösung unterscheiden sich allerdings statistisch nicht von 1,5 % Voluven<sup>®</sup> alleine, das die Viabilität statistisch hoch signifikant auf 52,69%  $\pm$  17,00% SD senkt.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.3:** EZ4U: 10 ng/ml – 10 µg/ml LPS und Voluven® (MW ± SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%, =  $p < 0,01$  gegeneinander  $n = 48 - 32$ ) nach 21 Stunden

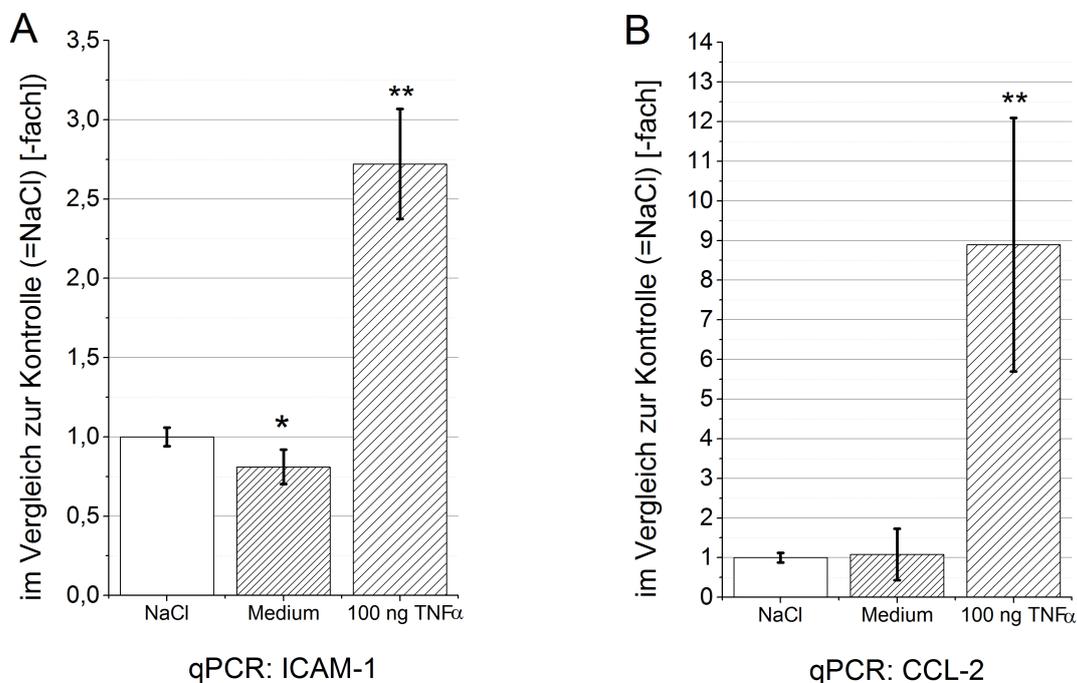
In Abbildung 3.3 werden die Messergebnisse des EZ4U mit verschiedenen Konzentrationen von LPS mit und ohne zusätzlicher Voluven® – Gabe nach 21 Stunden Inkubation gezeigt. Die im EZ4U gemessenen Effekte von LPS auf die Zellviabilität erscheinen inhomogen und widersprüchlich. So unterscheidet sich 10 ng/ml LPS mit einer Viabilität von  $99,00\% \pm 11,06\%$  SD nicht von der 0% – Referenzlösung. Die 100 ng/ml LPS enthaltende Lösung senkt die Viabilität statistisch hochsignifikant auf  $94,58\% \pm 5,98\%$  SD, während die 1000 ng/ml LPS enthaltende Lösung diese statistisch hochsignifikant auf  $104,28\% \pm 4,84\%$  SD erhöht. Die Versuchslösung mit 10 000 ng/ml LPS wiederum unterscheidet sich mit  $101,33\% \pm 6,77\%$  SD nicht von der 0% – Referenzlösung. Die kombinierte Versuchslösung aus 100 ng/ml LPS und 1,5% Voluven®  $56,46\% \pm 5,07\%$  SD senkt die Viabilität statistisch hoch signifikant und unterscheidet sich damit geringfügig, aber statistisch signifikant von der nur 1,5 % Voluven® – Lösung ( $52,66\% \pm 6,28\%$  SD).

### 3 Ergebnisse

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Auswirkungen von  $\text{TNF}\alpha$  und LPS im EZ4U inhomogen und verglichen mit denen des HES schwach ausgeprägt sind. Im nächsten Schritt musste überprüft werden, ob die verwendeten HK – 2 sensibel auf  $\text{TNF}\alpha$  und LPS reagieren.

#### 3.2.2 Die Auswirkung von $\text{TNF}\alpha$ auf die Expression inflammatorischer Marker

Um die Frage hinsichtlich einer potentiellen Insensibilität der HK – 2 Zellen gegenüber den verwendeten proinflammatorischen Substanzen zu klären, wurden die Zellen für 21 Stunden mit 100 ng / ml  $\text{TNF}\alpha$  inkubiert und anschließend die Expression von ICAM – 1 und CCL – 2 mittels qRT – RT – PCR gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.4 dargestellt.



**Abb. 3.4:** qRT – RT – PCR mit 100 ng / ml  $\text{TNF}\alpha$  nach 21 Stunden, A: Expression von ICAM – 1 im Vergleich zur 0% – Referenzlösung (= NaCl), B: Expression von CCL – 2 im Vergleich zur 0% – Referenzlösung (= NaCl) (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,05$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,01$  zu 0%,  $n = 6 - 8$ )

Deutlich zu erkennen ist, dass die Synthese beide Marker durch die  $\text{TNF}\alpha$  – Zugabe massiv erhöht wird. So steigt die Expression der mRNA für ICAM – 1 um das

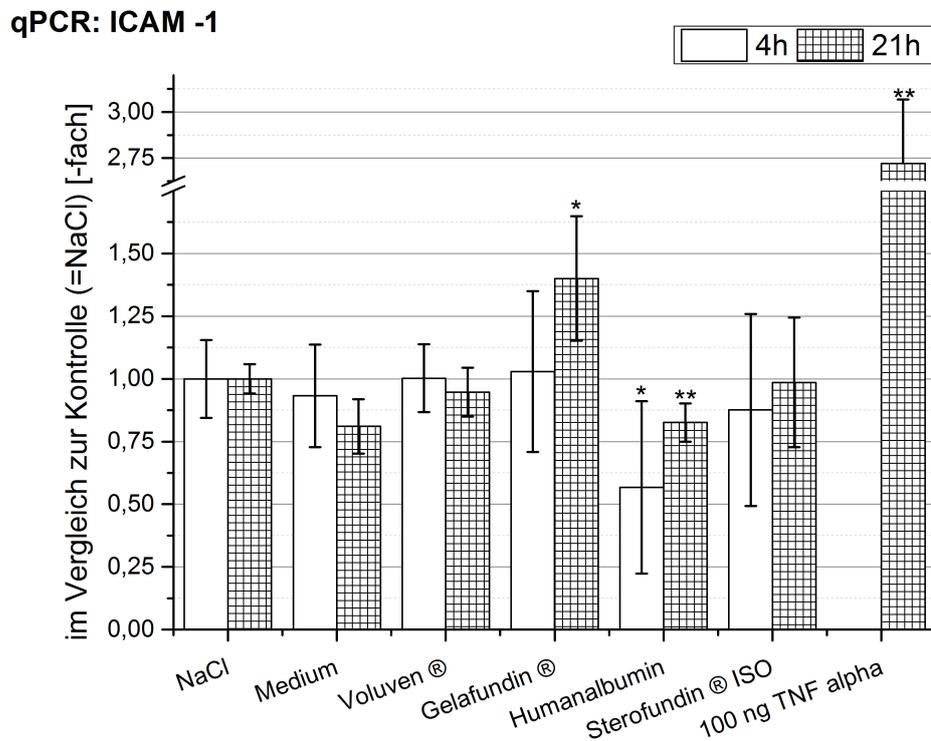
### 3 Ergebnisse

2,27-fache  $\pm$  0,35 SD und für CCL – 2 sogar um das 8,9-fache  $\pm$  3,2 SD statistisch hochsignifikant im Vergleich zur Kontrolle. Auffällig ist, dass es beim Vergleich zwischen dem reinen Zellmedium und der NaCl – Kontrolle für CCL – 2 gar keinen und für ICAM – 1 nur leichte antiinflammatorische Effekte gibt. Zusammenfassend wird deutlich, dass HK – 2 Zellen stark auf die Stimulation mit TNF $\alpha$  reagieren und inflammatorische Marker hochregulieren.

#### **3.2.3 Die Auswirkung der Infusionslösungen auf die Expression inflammatorischer Marker in der qRT – RT – PCR**

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die im EZ4U und LDH verwendeten Infusionslösungen (siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 32) ebenfalls in der Lage sind, die Zellen proinflammatorisch zu stimulieren. Um eine deutliche Reaktion auf die Infusionslösungen in Form einer Herauf- oder Herunterregulation der mRNA hervorzurufen, wurden die maximalen Dosierungen der Versuchslösungen für die qRT – RT – PCR verwendet. Dies waren 4% Voluven<sup>®</sup>, 2,67% Gelafundin<sup>®</sup>, 33,3% Humanalbumin und als kristalloide Lösung 66,7% Sterofundin<sup>®</sup> ISO.

## Die Auswirkung der Infusionslösungen auf die Expression von ICAM-1



**Abb. 3.5:** qRT – RT – PCR mit 4% Voluven®, 2,67% Gelafundin®, 3,33% Humanalbumin, 66,7% Sterofundin® ISO nach 4 und 21 Stunden, Expression von ICAM – 1 im Vergleich zur 0% – Referenzlösung (= NaCl) (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,05$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,01$  zu 0%,  $n = 6 - 8$ )

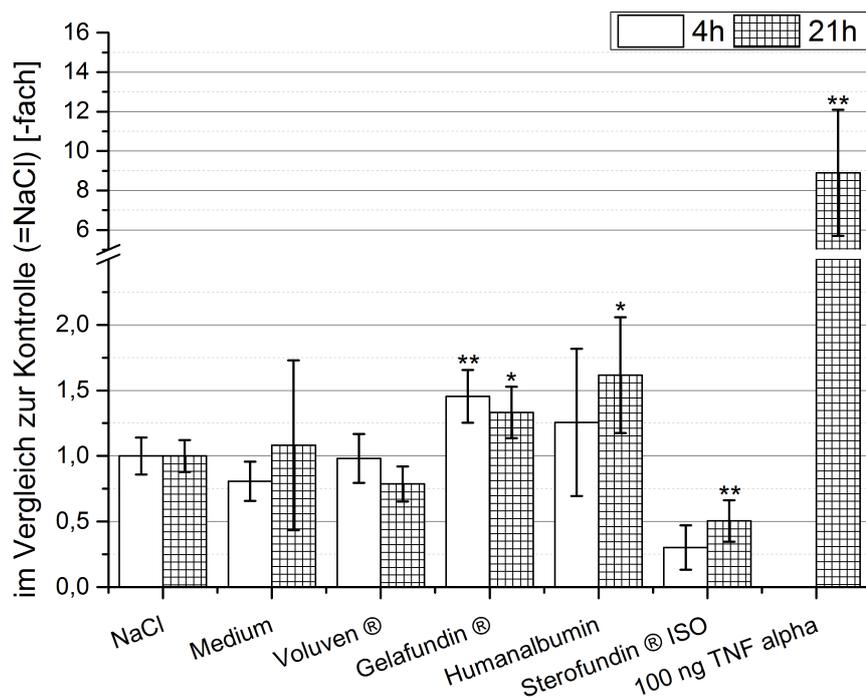
In Abbildung 3.5 werden die Auswirkungen der Versuchslösungen auf die Expression der mRNA von ICAM – 1 nach 4 und 21 Stunden Inkubation gezeigt. Als Referenzlösung dient dabei wie im EZ4U die 0% – Referenzlösung. Entsprechend liegt dessen Expressionswert nach 4 Stunden bei 1 (= 1-fache)  $\pm$  0,16 SD und nach 21 Stunden bei  $1 \pm 0,06$  SD. Das untersuchte Zellmedium unterscheidet sich nach 4 Stunden nicht signifikant mit einer Expression von  $0,93 \pm 0,21$  SD von der Referenzlösung, wirkt nach 21 Stunden durch eine verminderte Expression auf das 0,81-fache  $\pm$  0,11 SD aber antiinflammatorisch. Für das im Vordergrund dieser Untersuchung stehende 4% Voluven® findet sich weder nach 4 Stunden (1,00 –fache Expression von ICAM – 1  $\pm$  0,14 SD) noch nach 21 Stunden (0,95 –fache Expression von ICAM – 1  $\pm$  0,10 SD) eine Abweichung von der Referenzlösung. Das zweite untersuchte synthetische Kolloid Gelafundin® hingegen zeigt eine Wirkung. So steigert es die mRNA – Expression

### 3 Ergebnisse

für ICAM – 1 nach 21 Stunden Inkubation statistisch signifikant auf das 1,4-fache ( $\pm 0,25$  SD), während sich nach 4 Stunden für ICAM – 1 mit der 1,03-fachen Expression ( $\pm 0,32$  SD) kein signifikanter Unterschied zeigt. Das „natürliche“ Kolloid Humanalbumin zeigt einen gegensätzlichen Effekt zum Gelafundin®. Die mRNA für ICAM – 1 wird durch Humanalbumin nach 21 Stunden statistisch hochsignifikant auf das 0,83-fache ( $\pm 0,08$  SD) und nach 4 Stunden statistisch signifikant auf das 0,57-fache ( $\pm 0,34$  SD) vermindert exprimiert. Sterofundin® ISO hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von ICAM – 1, nach 4 Stunden liegt die Expression tendenziell antiinflammatorisch von ICAM – 1 bei der 0,88-fachen Expression ( $\pm 0,38$  SD) und nach 21 Stunden mit einer Expression vom 0,99-fachen ( $\pm 0,26$  SD) auf dem Niveau der Referenzlösung.

#### Die Auswirkung der Infusionslösungen auf die Expression von CCL-2

##### qPCR: CCL -2



**Abb. 3.6:** qRT – RT – PCR mit 4% Voluven®, 2,67% Gelafundin®, 3,33% Humanalbumin, 66,7% Sterofundin® ISO nach 4 und 21 Stunden, Expression von CCL – 2 im Vergleich zur 0% – Referenzlösung (= NaCl) (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,05$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,01$  zu 0%,  $n = 6 - 8$ )

### 3 Ergebnisse

Dass die beiden ausgewählten Marker nicht in gleicher Weise durch die Versuchslösungen beeinflusst werden, zeigt Abbildung 3.6. In dieser werden die Auswirkungen der Versuchslösungen auf die Expression der mRNA von CCL – 2 nach 4 und 21 Stunden Inkubation gezeigt. Als Referenzlösung dient dabei wieder die 0% – Referenzlösung. Dessen Expressionswert liegt nach 4 Stunden bei  $1 \pm 0,14$  SD und nach 21 Stunden bei  $1 \pm 0,12$  SD. Das mit untersuchte Zellmedium unterscheidet sich weder nach 4 Stunden mit einer Expression von 0,81-fachen Expression  $\pm 0,15$  von der Referenzlösung noch nach 21 Stunden (1,08-fache  $\pm 0,65$  SD). Wie bei der Untersuchung der Expression von ICAM – 1, findet sich für 4% Voluven<sup>®</sup> weder nach 4 Stunden (0,98-fache Expression von CCL – 2  $\pm 0,19$  SD) noch nach 21 Stunden (0,79-fache Expression von CCL – 2  $\pm 0,13$  SD) eine Abweichung von der Referenzlösung. Letzteres zeigt eine antiinflammatorische Tendenz. Das zweite untersuchte synthetische Kolloid Gelafundin<sup>®</sup> hingegen zeigt abermals eine deutliche Wirkung. So steigert es die mRNA – Expression für CCL – 2 nach 21 Stunden Inkubation statistisch signifikant auf das 1,33-fache ( $\pm 0,2$  SD) und nach 4 Stunden statistisch hoch signifikant auf die 1,46-fache Expression ( $\pm 0,20$  SD). Im Gegensatz zur Wirkung auf ICAM – 1 zeigt Humanalbumin für CCL – 2 eine proinflammatorische Tendenz. So steigt die mRNA für CCL – 2 durch Humanalbumin nach 4 Stunden statistisch nicht signifikant auf das 1,26-fache ( $\pm 0,56$  SD) und nach 21 Stunden statistisch signifikant auf das 1,62-fache ( $\pm 0,44$  SD) an. Sterofundin<sup>®</sup> ISO hingegen zeigt einen deutlichen Einfluss auf die Expression von CCL – 2, indem es nach 4 Stunden die Expression auf das 0,30-fachen Expression ( $\pm 0,17$  SD) und nach 21 Stunden auf das 0,51-fachen ( $\pm 0,16$  SD) senkt.

Bei Gesamtbetrachtung der in Abbildung 3.5 und 3.6 dargestellten Daten fällt auf, dass die Auswirkungen der Inkubation mit verschiedenen Infusionslösungen auf die mRNA – Expression höchst inhomogen ausfallen. Für das im Vordergrund dieser Arbeit stehende 4% Voluven<sup>®</sup> findet sich weder für ICAM – 1 (Abbildung 3.5), noch für CCL – 2 (Abbildung 3.5) ein statistisch signifikanter Unterschied zur jeweiligen NaCl – Kontrolle. Einzig 2,67% Gelafundin<sup>®</sup> reguliert sowohl ICAM – 1 (3.5) als auch CCL – 2 (3.6) hoch. Humanalbumin zeigt eine gegensätzliche Wirkung auf die beiden Marker. So findet sich nach 21 Stunden eine schwache statistisch signifikante Hochregulation von CCL – 2 durch 3,33% Humanalbumin um das 1,62-fache ( $\pm 0,4$  SD). Daraus auf eine proinflammatorische Wirkung des Humanalbumins abzuleiten ist nicht möglich, wie ein Blick in Abbildung 3.5 zeigt. In dieser wirkt Humanalbumin tendenziell antiinflammatorisch. Sterofundin<sup>®</sup> ISO zeigt auf die Expression von ICAM – 1 keine, auf die

### 3 Ergebnisse

von CCL – 2 eine protektive Wirkung. Wird bei der Interpretation der Expressionsdaten allerdings die Wirkung der Inkubation mit 100 ng / ml TNF $\alpha$  (ICAM – 1: 2,27–fache ( $\pm$  SD 0,35), CCL – 2: 8,9–fache Hochregulation  $\pm$  3,2 SD) betrachtet, schwindet die Relevanz der durch die Infusionslösungen ausgelösten Effekte.

#### 3.2.4 Zusammenfassung der Bedeutung der Inflammation bei der Viabilitätsreduktion von HK – 2 Zellen durch HES

Zusammenfassend fiel auf, dass – durch die qRT – RT – PCR nachgewiesen – HK – 2 Zellen zwar sehr sensibel auf TNF $\alpha$  reagieren, dieses jedoch im EZ4U in den verwendeten Dosierungen keinen relevanten Einfluss auf die Zellviabilität hatte. Ferner hatte eine Koinkubation von HES weder mit LPS noch mit TNF $\alpha$  einen relevanten Unterschied in der Reduktion der Zellviabilität zur Inkubation mit 1,5% Voluven<sup>®</sup> alleine. Umgekehrt war auf mRNA – Ebene keine der untersuchten Infusionslösungen in der Lage, eine dem TNF $\alpha$  vergleichbare inflammatorische Stimulation hervorzurufen. Dies gilt insbesondere für HES.

Aus diesen Gründen wurde bei den folgenden Versuchen auf eine zusätzliche Gabe inflammatorischer Substanzen verzichtet.

### 3.3 Die Auswirkungen von HES auf die Zellviabilität

Nachdem festgestellt worden war, dass die Inflammation keine entscheidende Rolle für eine mögliche pathogene Wirkung von HES auf die Nierenzellen hatte, wurden die nachfolgend demonstrierten Versuche ohne zusätzliche Inflammation durchgeführt. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob es sich bei den auf Seite 56 in Abschnitt 3.1 gezeigten Vesikeln um ein rein optisches Phänomen handelt oder ob es zu einer Beeinträchtigung der Viabilität der Zellen kommt.

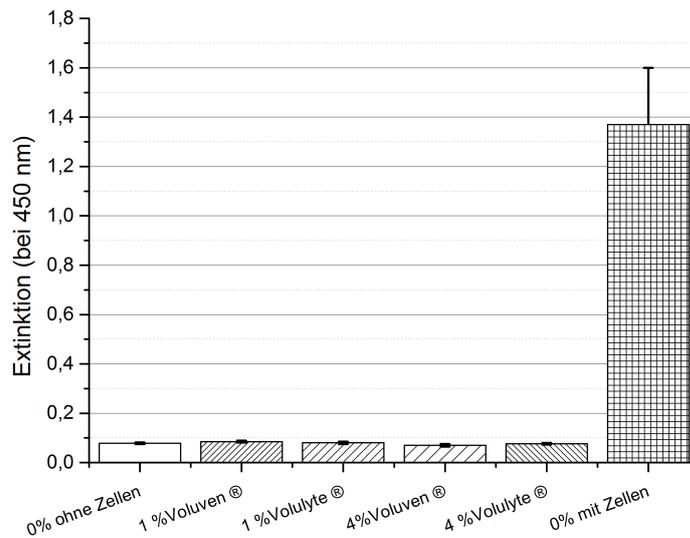
#### 3.3.1 Validierung des EZ4U – Tests als adäquates Testverfahren

Dafür musste in einem ersten Schritt der zur Bestimmung der Zellviabilität ausgewählte Versuchsaufbau (EZ4U, beschrieben auf Seite 41 in Abschnitt 2.4) hinsichtlich seiner Eignung für die Bestimmung einer möglichen Viabilitätsreduktion der Zellen durch HES überprüft werden. Dabei mussten verschiedene Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Versuchsreagenzien auf der einen und den HES – Molekülen auf der anderen Seite ausgeschlossen werden.

#### Interaktion zwischen HES und dem Reaktant

Zunächst musste ausgeschlossen werden, dass das Substrat des EZ4U – Tests, das Tetrazoliumsalz, mit HES reagiert. Für den in Abbildung 3.7 gezeigten Versuch, wurden die Lösungen 0% – Lösung, 1% und 4% Voluven<sup>®</sup>, 1% und 4% Volulyte<sup>®</sup> in eine mit Gelatine beschichtete zellulose 96 – Wellplatte gegeben. Zur besseren Einordnung wird in der Abbildung 3.7 außerdem die durchschnittliche Extinktion der 0% – Lösung nach Inkubation mit HK – 2 Zellen angegeben.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.7:** EZ4U zur Bestimmung der Extinktion der Versuchslösungen ohne Zellen. Dargestellt ist die im Photometer gemessene Extinktion folgender Versuchslösungen: 0% – Lösung, 1% und 4% Voluven<sup>®</sup>, 1% und 4% Volulyte<sup>®</sup> jeweils inkubiert in Wells ohne HK – 2 Zellen, sowie 0% – Lösung mit HK – 2 Zellen. Die Extinktion wurde gemessen nach 4 Stunden Inkubation, dargestellt ist der Messzeitpunkt nach 120 Minuten. (MW ± SD, n = 14)

Die mit Abstand stärkste Extinktion wurde in jenen Wells gemessen, die HK – 2 Zellen enthielten und mit 0% – Referenzlösung inkubiert worden waren. Der Messwert nach vier Stunden Inkubation betrug  $1,37 \pm 0,23$  SD. Für die Wells, die dieselbe 0% – Referenzlösung Lösung, aber keine Zellen enthielten, wurde eine Extinktion von  $0,08 \pm 0,003$  SD gemessen. Für die balancierte HES – Lösung Volulyte<sup>®</sup> wurde bei einer Konzentration von 1%  $0,08 \pm 0,005$  SD, für 4%  $0,08 \pm 0,003$  SD gemessen. Nach Applikation des auf 0,9% NaCl basierenden Voluven<sup>®</sup> wurde für die 1% – Lösung  $0,09 \pm 0,003$  SD und für die 4% – Lösung  $0,07 \pm 0,005$  SD gemessen. Obwohl die Messwerte nahe bei einander lagen, bestand ein statistisch hoch signifikanter Unterschied der 1% HES – Lösungen zur 0% – Lösung.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 3.7, dass sich die Extinktion der Versuchslösungen bei Koinkubation mit dem Substrat des EZ4U – Tests verglichen mit dem Ergebnis zellhaltiger Wells in einem sehr niedrigen Bereich der Extinktion bewegt.

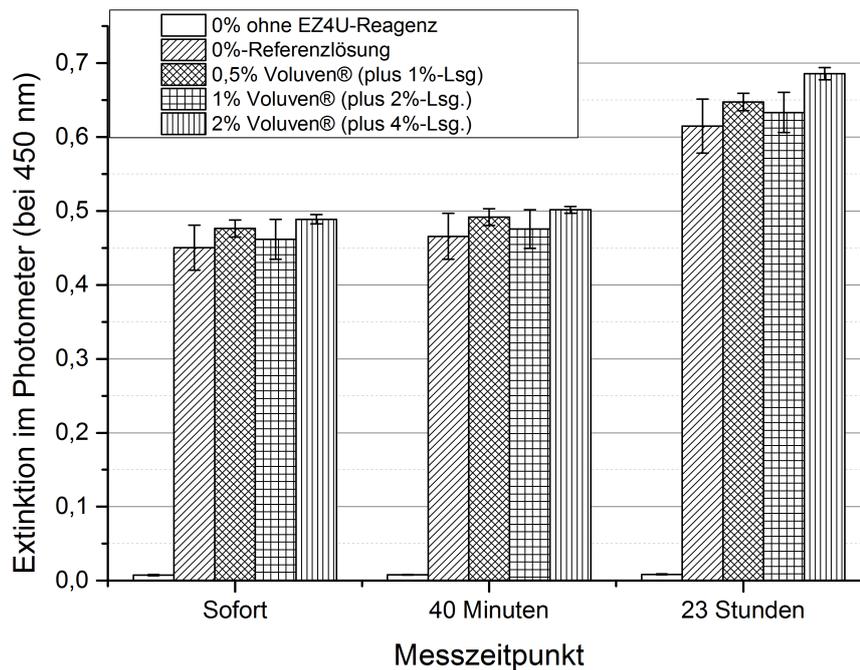
#### **Interaktion zwischen weiteren Versuchslösungen (Gelifundin<sup>®</sup> sowie Sterofundin<sup>®</sup> ISO) und dem Reaktant**

Die Untersuchung der Interaktion zwischen Gelifundin<sup>®</sup> und Sterofundin<sup>®</sup> ISO auf der einen, und dem Reaktant auf der anderen Seite zeigte ebenfalls nur sehr geringe Absorptionswerte. Dabei konnte für 16,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO  $0,08 \pm 0,002$  SD und für 66,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO  $0,08 \pm 0,00$  SD gemessen werden. Als für Mittelwert von 0,66% Gelifundin<sup>®</sup> konnte  $0,09 \pm 0,005$  SD und von 2,67% Gelifundin<sup>®</sup>  $0,12 \pm 0,005$  SD gemessen werden. Höhere Gelifundin<sup>®</sup> – Konzentrationen führen also nicht zu niedrigeren, sondern zu höheren Extinktionen.

#### **Interaktion zwischen HES und dem Produkt**

Im nachfolgend gezeigten Versuch wurde geprüft, inwiefern durch HK – 2 Zellen bereits umgesetztes Formazan, also das Produkt des EZ4U – Tests – durch die anschließende Inkubation mit HES ohne Zellen beeinflusst wird. Der in Abschnitt 2.4.4 auf Seite 44 beschriebene Versuch prüft inwiefern HES mit dem Produkt der von den Mitochondrien katalysierten Reaktion interagiert.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.8:** EZ4U zur Bestimmung der Interaktion des XTT – Farbstoffs und HES. Dargestellt ist die im Photometer gemessene Extinktion folgender Versuchslösungen: 0% – Lösung ohne Zusatz des EZ4U – Reagenz, 0% – Lösung mit Zusatz des EZ4U – Reagenz, 0,5%, 1% und 2% Voluven® jeweils mit Zusatz des EZ4U – Reagenz. Die Extinktion wurde gemessen sofort nach Applikation, nach 40 Minuten und nach 23 Stunden. MW  $\pm$  SD, n = 14

Die Abbildung 3.8 zeigt die photometrische Messung der Extinktion der Versuchslösungen sofort, 40 Minuten und 23 Stunden nach Applikation. Für die Bezeichnung der Konzentration der Lösungen ist zu beachten, dass 50% der Versuchslösung aus 0% – Lösung mit umgesetztem XTT und zu 50% aus 0%, 1%, 2% oder 4% Voluven® besteht. Sofort nach Applikation wurden für die 0% – Referenzgruppe, die nie mit HK – 2 Zellen in Kontakt gekommen war, ein Wert von 0,01 im Photometer gemessen. Dieser Wert blieb auch nach 23 Stunden konstant. Die aufsteigend konzentrierten HES – Lösungen zeigten sofort nach Beginn des Versuches die Messwerte  $0,48 \pm 0,01$  SD (0,5% Voluven®),  $0,46 \pm 0,03$  SD (1% Voluven®) und  $0,49 \pm 0,01$  SD (2% Voluven®). Im Vergleich dazu wurde für die 0% – Referenzlösung ein mit  $0,45 \pm 0,03$  SD marginal niedrigerer Wert gemessen. Beim nächsten Messzeitpunkt von 40 Minuten, wurde für 0,5% Voluven® die Werte  $0,49 \pm 0,01$  SD, für 1% Voluven®  $0,48 \pm 0,03$  SD und für 2% Voluven®  $0,50 \pm 0,00$  SD gemessen. Auch nach 40 Minuten lag die Extinktion der

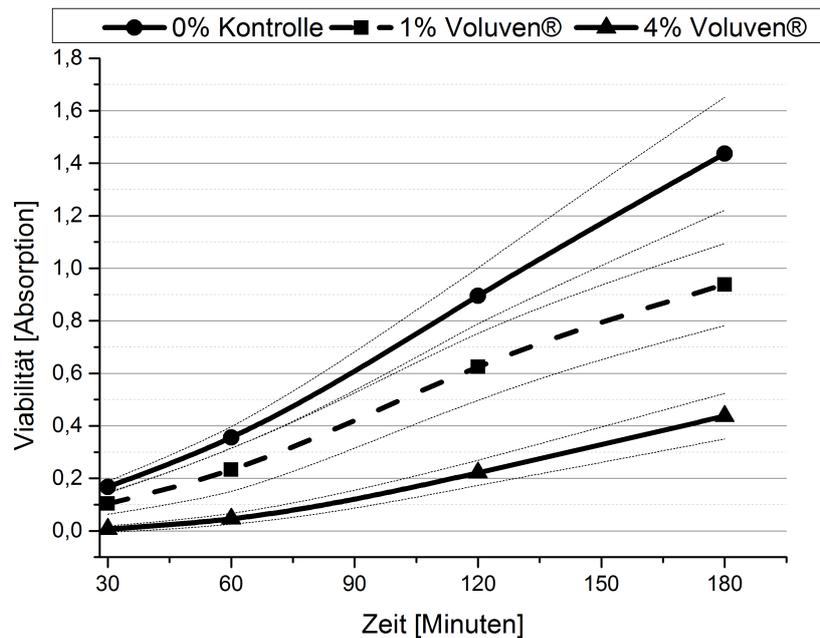
### 3 Ergebnisse

0% – Referenzlösung mit  $0,47 \pm 0,03$  SD niedriger als die der HES – Lösungen. Nach 23 Stunden waren die Messwerte etwas höher. So wurde für für 0,5% Voluven<sup>®</sup> die Werte  $0,65 \pm 0,01$  SD, für 1% Voluven<sup>®</sup>  $0,63 \pm 0,03$  SD und für 2% Voluven<sup>®</sup>  $0,69 \pm 0,01$  SD gemessen. Auch nach 23 Stunden wurde für die 0 – Referenzlösung ein mit  $0,61 \pm 0,04$  niedrigerer Wert gemessen als bei den HES – Lösungen. Zusammenfassend zeigen höher konzentrierte HES – Lösungen keine niedrigeren Extinktionen im Photometer als schwächer konzentrierte oder HES – freie Lösungen. Dies bedeutet, dass die aus der Extinktion bestimmte Viabilität nicht durch ein Messartefakt bei hohen HES – Konzentrationen falsch niedrig gemessen wird.

#### **Dynamik der Messwerte nach verschiedenen Messintervallen**

Die ersten Messungen erfolgten 30, 60, 120 und 180 Minuten nach Zugabe des Reagenz, so dass bei einer Inkubationsdauer von 21 Stunden nach 180 Minuten eine Gesamtversuchsdauer von 24 Stunden erreicht wurde. An den Messergebnissen für 1% und 4% Voluven<sup>®</sup> soll zunächst kurz gezeigt werden, aus welchem Grund in den folgenden Darstellungen für gewöhnlich der Messzeitpunkt nach 120 Minuten dargestellt wird.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.9:** Der Verlauf der absolut gemessenen Absorptionswerte für HK-2 Zellen, die mit 1% und 4% Voluven<sup>®</sup>, sowie mit der 0% – Kontrolllösung behandelt wurden, nach 30, 60, 120 und 180 Minuten, Inkubation 21 Stunden (Gestrichelte Linien = MW ± SD, n = 48 – 32)

In Abbildung 3.9 ist der zeitliche Verlauf der absolut gemessenen Absorptionswerte für 1% und 4% Voluven<sup>®</sup>, sowie für die 0% – Kontrolle nach 30, 60, 120 und 180 Minuten dargestellt. Nach 90 Minuten beginnt ein linearer Anstieg der Absorptionswerte, die gemessene Viabilität unterscheidet sich stärker von einander. Je länger allerdings eine Messung dauert, desto größer wird auch der Standardfehler. Aus diesem Grund erscheint der Messzeitpunkt nach 120 Minuten als gut geeignet zur vergleichenden Darstellung, da dieser im linear ansteigenden gut unterscheidbaren und mit einem akzeptablen Standardfehler behafteten Viabilitätsbereich liegt.

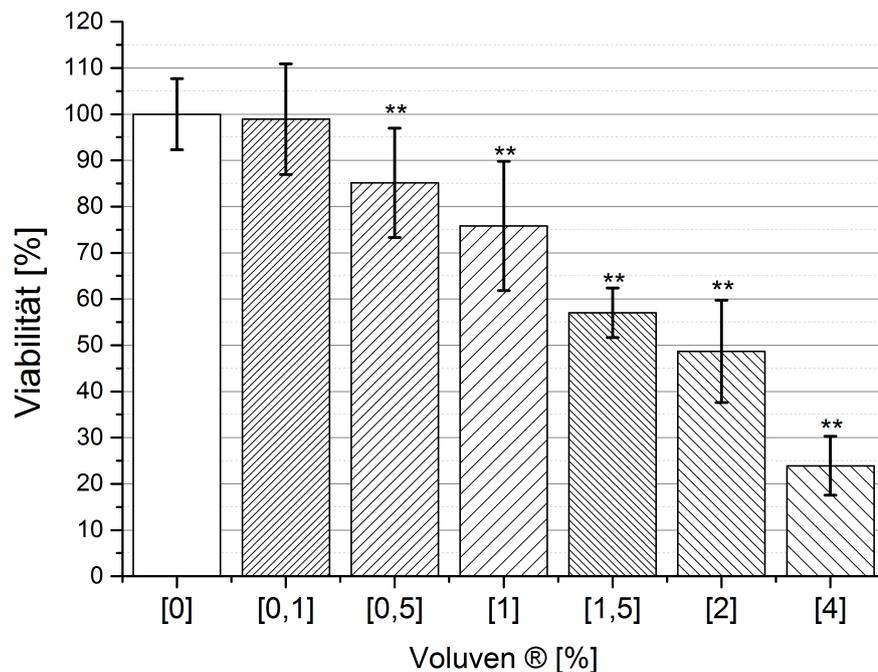
#### 3.3.2 Die Auswirkungen der einzelnen Infusionslösungen auf die Zellviabilität

Im Anschluss an die Versuche zur Eignung des EZ4Us wurden die Konzentrationsreihen wie in Kapitel 2.1 auf Seite 32 beschrieben hergestellt. Untersucht wurde jeweils eine Reihe klinische relevanter Konzentrationen der Kolloide Voluven<sup>®</sup>, Gelafundin<sup>®</sup> und Humanalbumin, sowie des Kristalloids Sterofundin<sup>®</sup> ISO. Nach 21 Stunden Inkubation wurde der EZ4U unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten

### 3 Ergebnisse

30, 60, 120 und 180 Minuten nach Zugabe des Reagenz. Wie in Abschnitt 3.3.1 auf Seite 71 erläutert, wird stets der Messzeitpunkt nach 120 Minuten dargestellt.

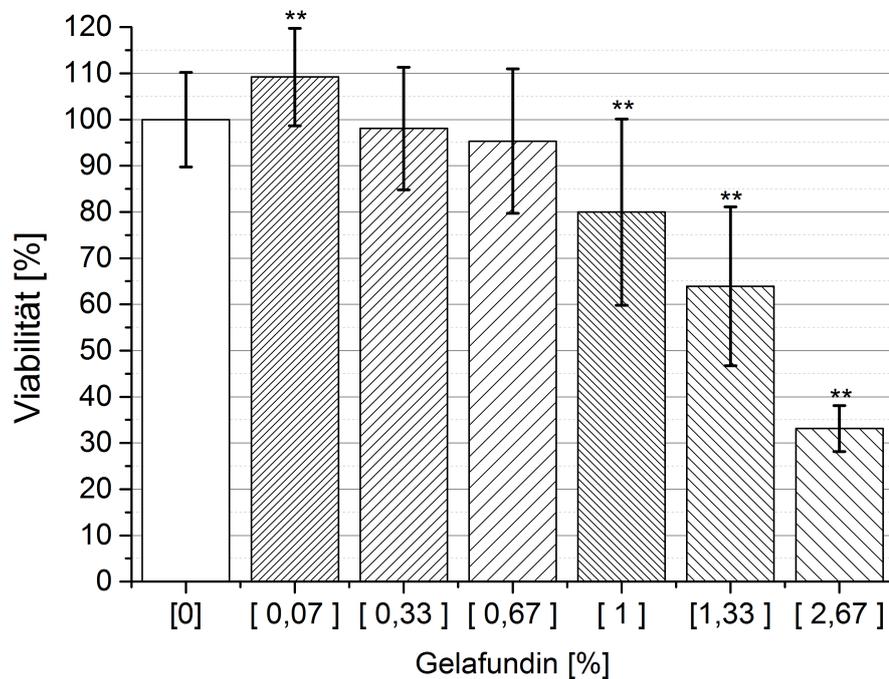
#### EZ4U von Voluven<sup>®</sup> nach 21 Stunden Inkubation



**Abb. 3.10:** EZ4U: Einfluss der Voluven<sup>®</sup> – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,01$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

In Abbildung 3.10 sind jeweils die nach 120 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für 0,1% bis 4% Voluven<sup>®</sup> nach 21 Stunden Inkubation dargestellt. Die niedrigste Dosis von 0,1% Voluven<sup>®</sup> unterscheidet sich mit  $98,93\% \pm 11,95\%$  SD nicht von der 0% Referenzlösung. Bereits eine Konzentration von 0,5% Voluven<sup>®</sup> reduziert die Zellviabilität statistisch hochsignifikant um  $14,86\% \pm 11,86\%$  SD. Mit steigender Voluven<sup>®</sup> – Konzentration sinkt die gemessene Viabilität weiter ab. So verringert die Konzentration von 1% Voluven<sup>®</sup> die Zellviabilität um  $24,19\% \pm 13,98\%$  SD auf  $75,81\%$  und die von 2% Voluven<sup>®</sup> um  $51,33\% \pm 11,07\%$  SD auf  $48,67\%$ . Damit ist die Viabilität im Vergleich zur 0% – Referenzgruppe halbiert. Die applizierte Maximaldosis von 4% senkt die Viabilität sogar noch deutlicher um  $76,1\%$  auf  $23,91\% \pm 6,38\%$  SD.

## EZ4U von Gelafundin® nach 21 Stunden Inkubation



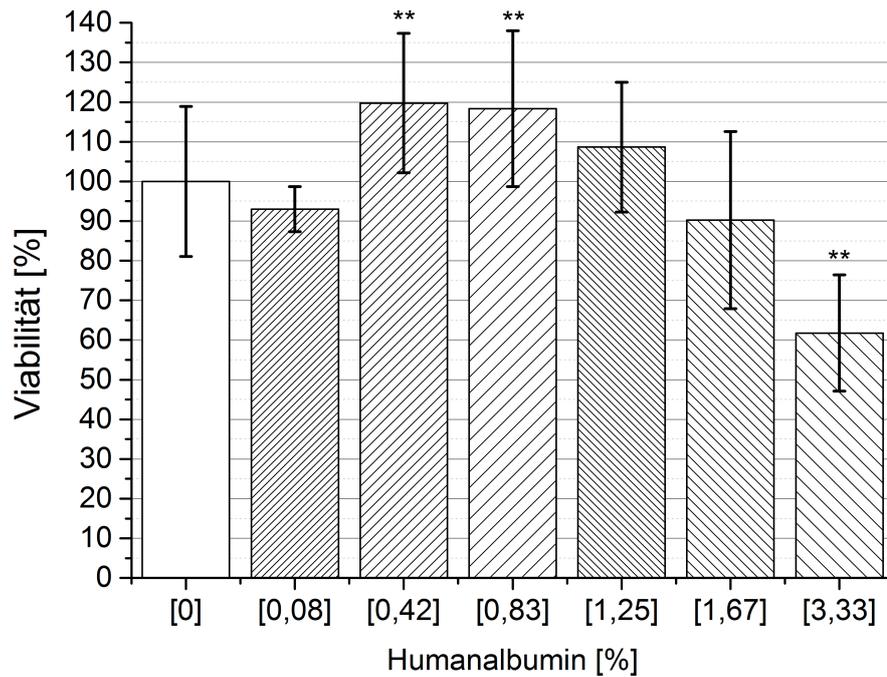
**Abb. 3.11:** EZ4U: Einfluss der Gelafundin® – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,01$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

In Abbildung 3.11 sind jeweils die nach 120 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für 0,07% bis 2,67% Gelafundin® nach 21 Stunden Inkubation dargestellt. Gelafundin® ähnelt hinsichtlich der Tendenz der Messwerte Voluven®. Anders als Voluven® erhöht allerdings die niedrigste untersuchte Konzentration von 0,07% Gelafundin® die Viabilität im Vergleich zur 0% – Referenzlösung statistisch hochsignifikant um  $9,2\% \pm 10,53\%$  SD. Die höher konzentrierten Gelafundin® – Lösungen von 0,33% und 0,67% Gelafundin® senkten demgegenüber zwar die Viabilität, die Reduktion fiel allerdings statisch nicht signifikant aus. Unter 0,33% Gelafundin® fiel die Viabilität auf  $98,06\% \pm 13,25\%$  SD und unter 0,67% Gelafundin auf  $95,34\% \pm 15,66\%$  SD. Dieser Trend setzt sich bei der Konzentration von 1% Gelafundin® fort, die die Viabilität statistisch hochsignifikant auf  $79,98\% \pm 20,15\%$  SD senkt. Auf 1,33% und 2,67% Gelafundin® steigende Dosierungen Gelafundin® lassen die Viabilität im Vergleich zur 0% – Referenzgruppe noch deutlicher absinken. Dabei reduziert 1,33%

### 3 Ergebnisse

Gelafundin<sup>®</sup> die Viabilität um 36,1% auf  $63,9\% \pm 17,2\%$  SD, während die applizierte Maximaldosis von 2,67% Gelafundin<sup>®</sup> die Viabilität auf  $33,12\% \pm 5,0\%$  SD absenkt.

#### EZ4U von Humanalbumin nach 21 Stunden Inkubation



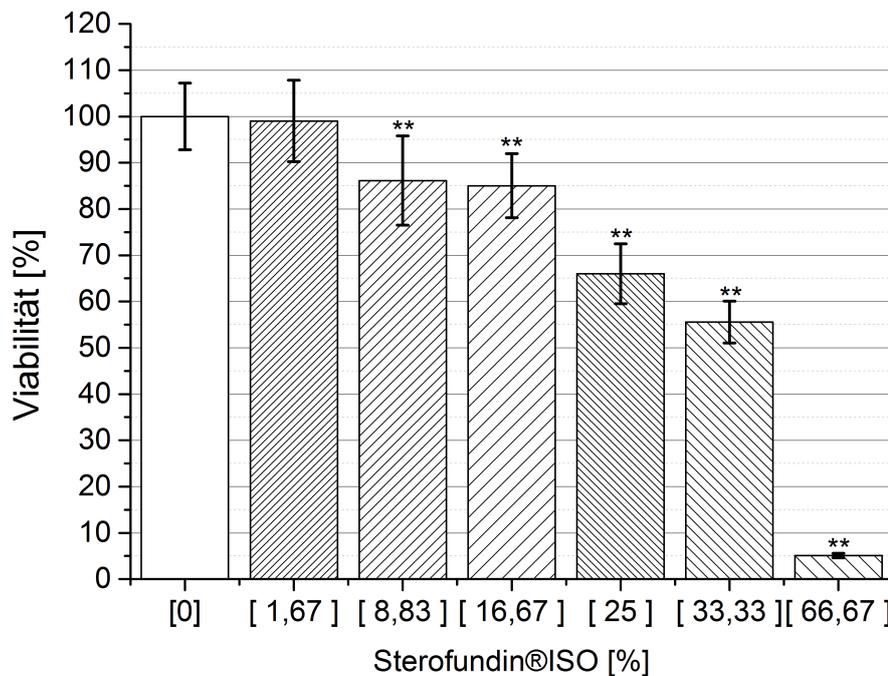
**Abb. 3.12:** EZ4U: Einfluss der Humanalbumin – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,01$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

In Abbildung 3.12 sind jeweils die nach 120 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitäts-werte für 0,08% bis 3,33% Humanalbumin nach 21 Stunden Inkubation dargestellt. Humanalbumin unterscheidet sich bereits auf den ersten Blick von den anderen beiden bisher gezeigten Kolloiden Voluven<sup>®</sup> und Gelafundin<sup>®</sup>. Zwar reduziert die niedrigste applizierte Dosis Humanalbumin von 0,08% die Viabilität im Vergleich zur 0% – Referenzgruppe um  $6,97\% \pm 5,69\%$  SD. Dieser Verlust an Viabilität ist allerdings statisch nicht signifikant. Demgegenüber zeigen die Konzentrationen von 0,42% und

### 3 Ergebnisse

0,83% Humanalbumin eine statistisch hochsignifikante protektive Wirkung. Im Vergleich zur NaCl – basierten Kontrollgruppe erhöhen die 0,42% Humanalbumin – Lösung die Viabilität auf  $119,75\% \pm 17,54\%$  SD und die 0,83% Humanalbumin auf  $118,34\% \pm 19,69\%$  SD. Auch 1,25% Humanalbumin verbessert erneut die Zellviabilität, allerdings nicht statistisch signifikant, auf  $108,64\% \pm 16,37\%$  SD. Die mit 1,67% Humanalbumin höher dosierte Lösung reduziert die Viabilität statistisch nicht signifikant um  $9,75\% \pm 22,35\%$  SD. Erst die Maximaldosis von 3,33% Humanalbumin verwandelt diesen Trend in eine statistisch hochsignifikante Reduktion der Zellviabilität um 38,23% auf  $61,78\% \pm 14,65\%$  SD.

#### EZ4U von Sterofundin® ISO nach 21 Stunden Inkubation



**Abb. 3.13:** EZ4U: Einfluss der Sterofundin® ISO – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,01$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

Abbildung 3.13 zeigt die Viabilität der HK – 2 Zellen nach 21 Stunden Inkubation mit einer Konzentrationsreihe von 1,67% bis 66,67% Sterofundin® ISO . Während die

### 3 Ergebnisse

geringste Konzentration von 1,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO mit einer Viabilität von 99,03%  $\pm$  8,83% SD annähernd der Referenzlösung entspricht, reduziert bereits die nächst höher konzentrierte Lösung von 8,83% Sterofundin<sup>®</sup> ISO diese statistisch hochsignifikant um 13,87%  $\pm$  9,64% SD. In diesem Rahmen bewegt sich auch die 16,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO – Lösung, die die Viabilität auf 85,04%  $\pm$  6,95% SD senkt. Dieser Trend setzt sich bei der zu einem Viertel aus Sterofundin<sup>®</sup> ISO bestehenden Lösung (25%) fort. Diese reduziert die Zellviabilität um 34,0%  $\pm$  4,53% SD. Erhöht sich der Anteil an Sterofundin<sup>®</sup> ISO auf 3,333%, sinkt die Viabilität erneut um weitere 10,46% auf 55,54%  $\pm$  4,53% SD. Die höchste Konzentration von 66,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO supprimiert die Zellfunktion sogar um 94,9%  $\pm$  0,46% SD.

#### **Zusammenfassung der EZ4U – Versuche der Versuchslösungen nach 21 Stunden Inkubation**

Alle untersuchten Lösungen zeigten nach 21 Stunden Inkubation eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei bewegten sich die Messwerte der beiden Kolloide Voluven<sup>®</sup> und Gelafundin<sup>®</sup> auf einem vergleichbaren Niveau. Das „natürliche“ Kolloid Humanalbumin zeigte in niedrigen Dosierungen zytoprotektive Effekte und reduzierte die Zellviabilität erst in der Höchstdosierung von 3,33%. Die balancierte Vollelektrolytlösung Sterofundin<sup>®</sup> ISO beeinträchtigte die Zellviabilität deutlich. Die nach Inkubation mit 66,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO gemessene Viabilität war die mit Abstand niedrigste dieser Versuchsreihe.

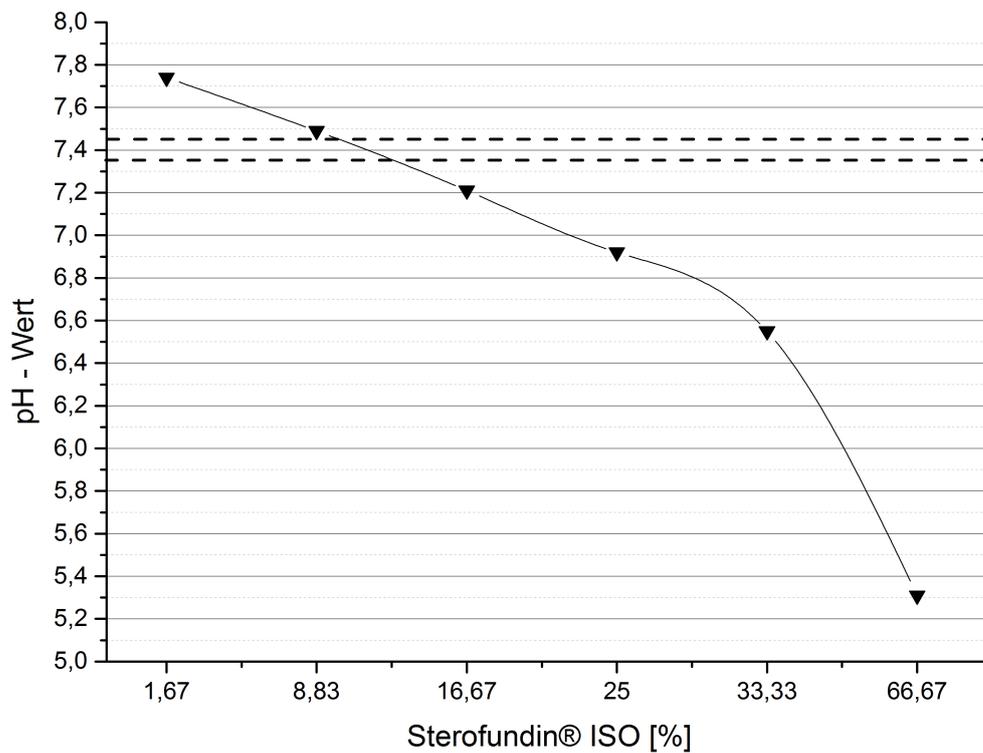
#### **3.3.3 pH – Werte und Osmolalität der Versuchslösungen**

Während sich die Ergebnisse dieses Versuches hinsichtlich der kolloidalen Lösungen im Rahmen dessen bewegten, das durch die *in vivo* – Versuche erwartet worden war, überraschte die rapide abnehmende Zellfunktion unter Sterofundin<sup>®</sup> ISO. Bei der Suche nach den möglichen Ursachen rückte zunächst der pH – Wert der Lösungen in den Fokus. Die Messung der pH – Werte von Sterofundin<sup>®</sup> ISO – dargestellt in Tabelle 3.1 und in Abbildung 3.14 – ergab, dass die Versuchslösungen mit steigender Konzentration immer azidotischer wurden.

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.1:** pH – Werte der Versuchslösungen vor deren Korrektur

Versuchslösung	pH – Wert
66,67% Sterofundin® ISO	5,31
33,33% Sterofundin® ISO	6,55
25% Sterofundin® ISO	6,92
16,67% Sterofundin® ISO	7,21
8,83% Sterofundin® ISO	7,49
1,67% Sterofundin® ISO	7,74
0% Kontrolllösung	7,76
<i>Zum Vergleich</i>	
2,67% Gelafundin®	7,67
4% Voluven®	7,49



**Abb. 3.14:** pH-Werte der Versuchslösungen mit Sterofundin®ISO (gestrichelte horizontale Linien zeigen den physiologischen Bereich zwischen 7,35 und 7,45), n = 48 – 32

### 3 Ergebnisse

Die pH – Werte der anderen Lösungen waren zwar auch nicht im physiologischen Bereich ( $\text{pH } 7,4 \pm 0,5$ ), zeigten aber deutlich geringere Schwankungen und Abweichungen vom Normbereich. Bevor eine Versuchsreihe mit pH – korrigierten Lösungen durchgeführt werden konnte, wurde zunächst noch die Osmolarität der Lösungen bestimmt.

**Tabelle 3.2:** Osmolalität der Versuchslösungen nach 4 Stunden Inkubation (n=1).

<i>Versuchslösung</i>	Osmolalität [mosmol / kg]
4% Voluven®	303
2,67% Gelafundin®	277
3,33% Humanalbumin	292
66,67% Sterofundin® ISO	296
100% Zellmedium	314
0% NaCl – Kontrolllösung	294

**Tabelle 3.3:** Osmolalität der Versuchslösungen nach 21 Stunden Inkubation (n=1).

<i>Versuchslösung</i>	Osmolalität [mosmol / kg]
4% Voluven®	302
2,67% Gelafundin®	279
3,33% Humanalbumin	293
66,67% Sterofundin® ISO	298
100% Zellmedium	314
0% NaCl – Kontrolllösung	294

Wie Tabelle 3.2 und 3.3 zeigen, befinden sich alle bestimmten Osmolalitäten sowohl nach 4 als auch nach 21 Stunden Inkubation in etwa im physiologischen Normbereich (280 – 300 mosmol / kg H<sub>2</sub>O). Eine Ausnahme stellt dabei das reine Zellmedium dar, das in den Viabilitätsmessungen aber immer die geringste funktionelle Beeinträchtigung der Zellen zeigte.

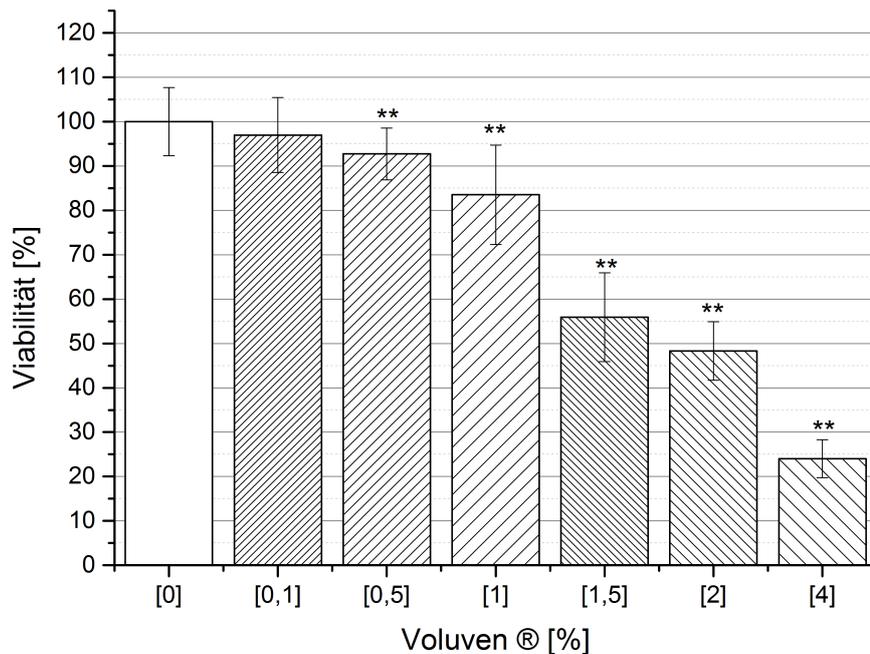
#### 3.3.4 Die Auswirkungen der pH – korrigierten Infusionslösungen auf die Zellviabilität

Infolge dieser Ergebnisse wurden die Versuchslösungen der folgenden Versuche vor der Durchführung pH – korrigiert. Entsprechend wurde wie in Abschnitt 2.1.1 auf Seite

### 3 Ergebnisse

34 beschrieben, der pH – Wert gemessen, auf einen physiologischen Bereich (pH 7,4  $\pm$  0,5) eingestellt und kontrolliert.

#### EZ4U von pH – korrigiertem Voluven<sup>®</sup> nach 21 Stunden Inkubation



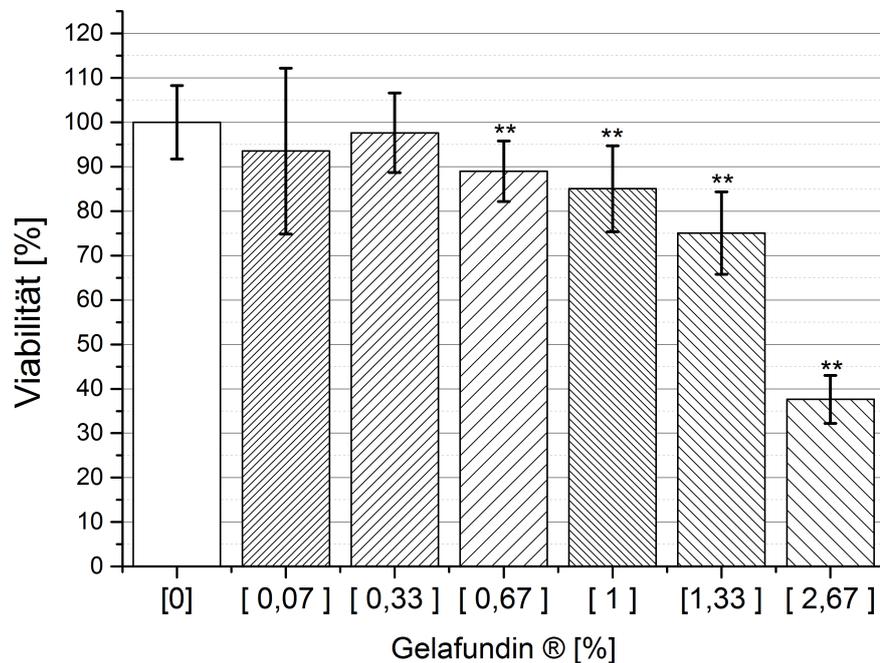
**Abb. 3.15:** EZ4U: Einfluss der pH – korrigierten Voluven<sup>®</sup> – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* = p < 0,01 zu 0%, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 48 – 32)

In Abbildung 3.15 sind – wie für den Vorversuch ohne pH – Korrektur – jeweils die nach 120 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für 0,1% bis 4% Voluven<sup>®</sup> nach 21 Stunden Inkubation dargestellt. Während sich die Viabilität nach Inkubation mit 0,1% Voluven<sup>®</sup> mit 96,98%  $\pm$  8,44% SD statistisch nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet, ist bereits für 0,5% Voluven<sup>®</sup> eine statistisch hochsignifikante Reduktion um 7,27%  $\pm$  5,82% SD sichtbar. Mit steigender Voluven<sup>®</sup> – Konzentration sinkt die gemessene Viabilität weiter ab. So verringert die Konzentration von 1% Voluven<sup>®</sup> die Zellviabilität um 16,48%  $\pm$  11,22% SD auf 83,52% und die von 2% Voluven<sup>®</sup> um 51,7%  $\pm$  6,59% SD auf 48,3%. Damit ist die Viabilität – wie es auch für im Versuch

### 3 Ergebnisse

mit nicht pH – korrigiertem Voluven<sup>®</sup> der Fall war – im Vergleich zur 0% – Referenzgruppe halbiert. Die applizierte Maximaldosis von 4% Voluven<sup>®</sup> senkt die Viabilität sogar noch deutlicher um 75,98% auf 24,02%  $\pm$  4,27% SD. Zusammenfassend sind die Messwerte des EZ4Us nach 21 Stunden Inkubation mit pH – korrigiertem Voluven<sup>®</sup> mit denen des nicht pH – korrigierten – gezeigt in Abbildung 3.10 auf Seite 73 – vergleichbar.

#### EZ4U von pH – korrigiertem Gelafundin<sup>®</sup> nach 21 Stunden Inkubation



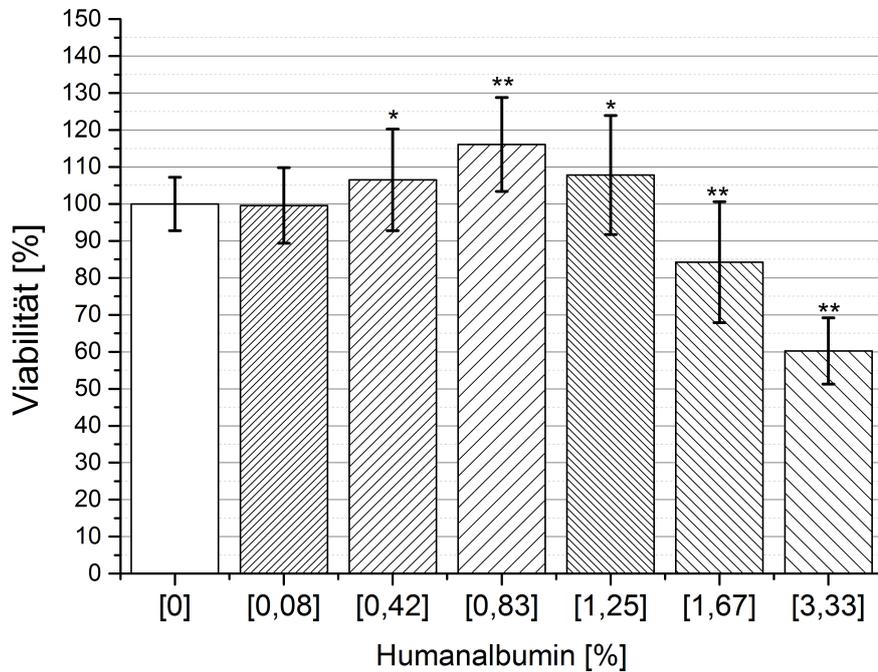
**Abb. 3.16:** EZ4U: Einfluss der pH – korrigierten Gelafundin<sup>®</sup> – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* = p < 0,01 zu 0%, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 48 – 32)

In Abbildung 3.16 sind jeweils die nach 120 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für pH – korrigiertes Gelafundin<sup>®</sup> in einer Konzentrationsreihe von 0,07% bis 2,67% nach 21 Stunden Inkubation dargestellt. Anders als nicht pH – korrigiertes

### 3 Ergebnisse

Gelafundin<sup>®</sup> – dargestellt in Abbildung 3.11 auf Seite 74 – zeigen die niedrigen Dosierungen keine statistisch signifikante Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Referenzgruppe. Zwar gibt es bei der niedrigsten untersuchten Konzentration von 0,07% Gelafundin<sup>®</sup> eine Reduktion der Viabilität auf  $93,52\% \pm 18,69\%$  SD, dafür erhöht sich – ebenfalls statistisch nicht signifikant – diese nach Inkubation mit 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> auf  $101,28\% \pm 11,18\%$ . Die erste statistisch signifikante Reduktion in diesem Versuch findet sich nach Inkubation mit 0,67% Gelafundin<sup>®</sup>, welches die Viabilität auf  $95,39\% \pm 7,33\%$  senkt. Die darauf folgenden Gelafundin<sup>®</sup> – Lösungen entsprechen zwar von der Tendenz her den im Vorversuch gemessenen Werten, allerdings fällt der Viabilitätsverlust unter 1% Gelafundin<sup>®</sup> mit  $88,11\% \pm 10,73\%$  SD und unter 1,33% mit  $80,47\% \pm 9,96\%$  SD geringer aus. Erst die Maximaldosis von 2,67% Gelafundin<sup>®</sup> ist hinsichtlich der Viabilitätsreduktion um 59,66% auf  $40,34\% \pm 5,8\%$  SD wieder mit dem nicht pH – korrigierten Gelafundin<sup>®</sup> vergleichbar.

## EZ4U von pH – korrigiertem Humanalbumin nach 21 Stunden Inkubation



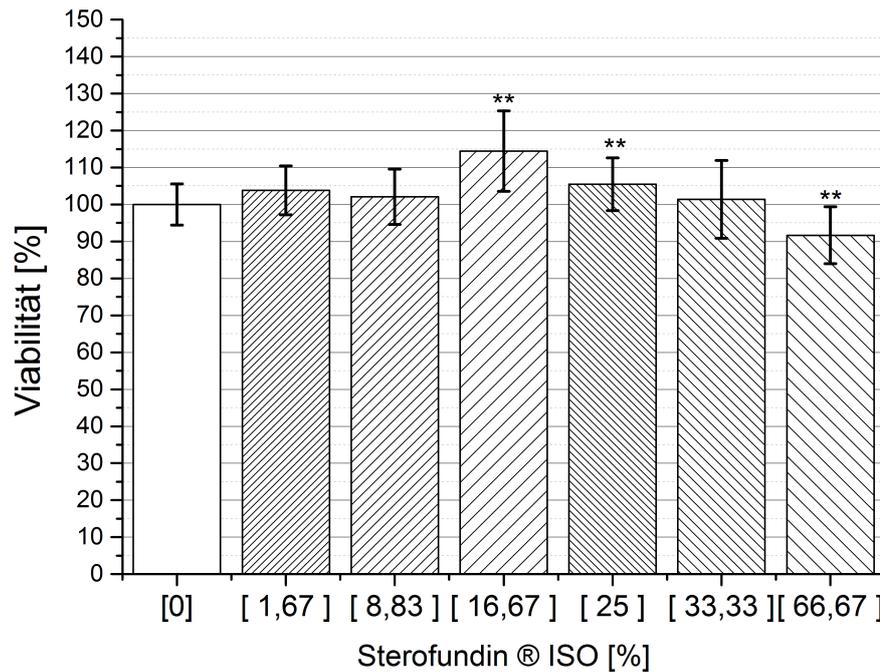
**Abb. 3.17:** EZ4U: Einfluss der pH – korrigierten Humanalbumin – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,01$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

In Abbildung 3.17 sind die nach 120 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für 0,08% bis 3,33% pH – korrigiertes Humanalbumin nach 21 Stunden Inkubation dargestellt. Humanalbumin unterscheidet sich – wie bereits im Vorversuch mit nicht pH – korrigierten Lösungen – von den anderen beiden gezeigten Kolloiden Voluven<sup>®</sup> und Gelafundin<sup>®</sup>. Die niedrigste applizierte Dosis Humanalbumin von 0,08% unterscheidet sich nicht von der 0% – Referenzgruppe mit einer Viabilität von  $99,57\% \pm 10,23\%$  SD. Die niedrigen Konzentrationen von 0,42% und 0,83% Humanalbumin zeigen protektive Wirkung. Im Vergleich zur NaCl – basierten Kontrollgruppe erhöht die 0,42% Humanalbumin – Lösung die Viabilität statistisch signifikant auf  $106,5\% \pm 13,75\%$  SD und die 0,83% Humanalbumin statistisch hochsignifikant auf  $116,08\% \pm 12,7\%$  SD. Auch 1,25% Humanalbumin verbessert statistisch signifikant die Zellviabilität auf  $107,85\% \pm 16,09\%$  SD. Die mit 1,67% Humanalbumin höher dosierte Lösung reduziert die Viabilität statistisch hoch signifikant um  $15,76\% \pm 16,33\%$  SD.

### 3 Ergebnisse

Die Maximaldosis von 3,33% Humanalbumin reduziert die Zellviabilität noch einmal statistisch hochsignifikante um 39,79% auf  $60,21\% \pm 8,97\%$  SD.

#### EZ4U von pH – korrigiertem Sterofundin<sup>®</sup> ISO nach 21 Stunden Inkubation



**Abb. 3.18:** EZ4U: Einfluss der pH – korrigierten Sterofundin<sup>®</sup> ISO – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \* =  $p < 0,01$  zu 0%, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

In Abbildung 3.18 zeigt die nach 120 Minuten im EZ4U gemessenen Viabilitätswerte für pH – korrigierte Sterofundin<sup>®</sup> ISO – Lösungen in einer Verdünnung von 1,67% bis 8,83% Sterofundin<sup>®</sup> ISO. Die geringsten Dosierungen von 1,67% und 8,83% Sterofundin<sup>®</sup> ISO zeigten dabei mit einer Viabilität von  $103,82\% \pm 6,64\%$  SD und  $102,09\% \pm 7,49\%$  SD keinen statistisch signifikanten Unterschied zur 0% – Kontrollgruppe. Die folgenden beiden Verdünnungen erhöhen die Viabilität statistisch hoch signifikant, 16,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO um  $14,45\% \pm 10,85\%$  SD und 25% Sterofundin<sup>®</sup> ISO um  $5,47\% \pm 7,12\%$  SD. Die zu einem Drittel (= 33,33%) aus Sterofundin<sup>®</sup> ISO

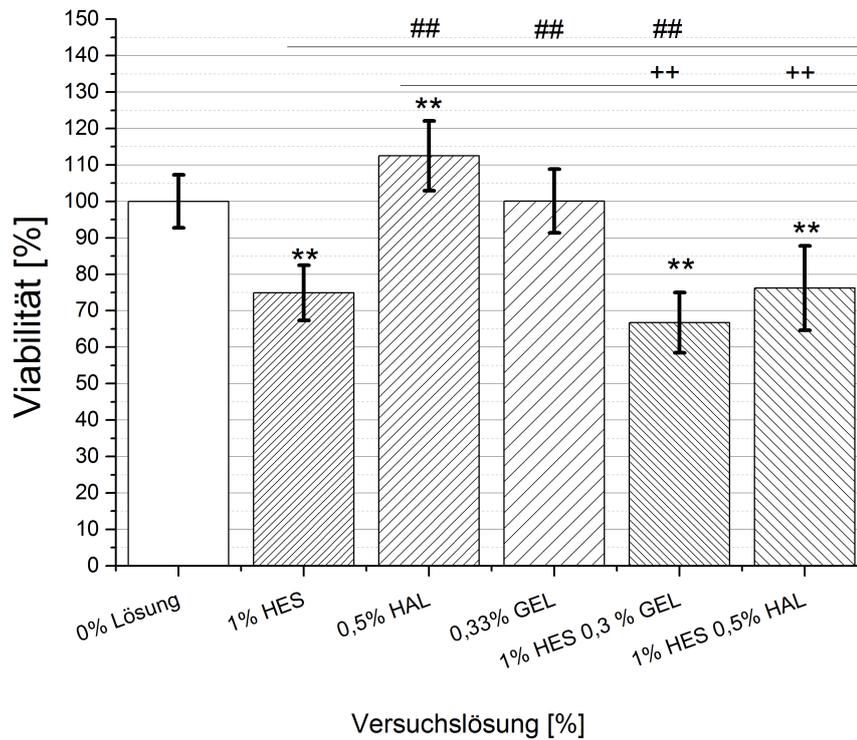
### 3 Ergebnisse

bestehende Lösung zeigt mit einer Viabilität von  $101,41\% \pm 10,54\%$  SD keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Erst die Maximaldosis von  $66,67\%$  Sterofundin<sup>®</sup> ISO senkt die Viabilität statistisch signifikant auf  $91,67\% \pm 7,67\%$  SD.

#### **Koinkubation der kolloidalen Lösungen im EZ4U**

Hinter dem in Abbildung 3.19 dargestellten Versuch steht die Frage, ob 1% Voluven<sup>®</sup> durch die Koinkubation mit im Vorversuch protektivem 0,5% Humanalbumin weniger reduzierend auf die Zellviabilität wirkt oder ob es durch Koinkubation mit – alleine in-ertem 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> – an beeinträchtigender Wirkung zunimmt. Für den Versuch wurden pH – korrigierte Lösungen verwendet. Die Messwerte ergaben eine bereits in den Vorversuchen demonstrierte, für niedrige Humanalbuminkonzentrationen typische statistisch hochsignifikante Verbesserung der Zellviabilität um  $12,49\% \pm 9,56\%$  SD, während das mit 0,33% niedrig dosierte Gelafundin<sup>®</sup> keinen Unterschied zur 0% – Kontrolle aufwies. Die 1% – Voluven<sup>®</sup> Lösung reduzierte die Zellviabilität statistisch hochsignifikant um  $25,11\% \pm 7,58\%$  SD. Die zusätzliche Gabe von 0,5% Humanalbumin zu 1% Voluven<sup>®</sup> hatte keinen Einfluss auf die Auswirkung von HES. Die Kombination von 1% Voluven<sup>®</sup> mit 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> hingegen vermochte die Viabilität nochmals statistisch hochsignifikant um  $8,16\%$  gegenüber der Inkubation mit 1% Voluven<sup>®</sup> zu senken.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.19:** EZ4U: Einfluss der pH – korrigierten Versuchslösungen – Lösungen mit 1% Voluven<sup>®</sup> 0,5% Humanalbumin, 0,33% Gelafundin<sup>®</sup>, 1% Voluven<sup>®</sup> mit 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> und 1% Voluven<sup>®</sup> mit 0,5% Humanalbumin auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen nach 21 Stunden (MW ± SD, \* = p < 0,01 zu 0%, \*\* = p < 0,001 zu 0%, ## = p < 0,001 zu 1% Voluven<sup>®</sup>, ++ = p < 0,001 zu 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> / 0,5% Humanalbumin, n = 48 – 32)

#### Zusammenfassung der EZ4U – Versuche der pH – korrigierten Versuchslösungen nach 21 Stunden Inkubation

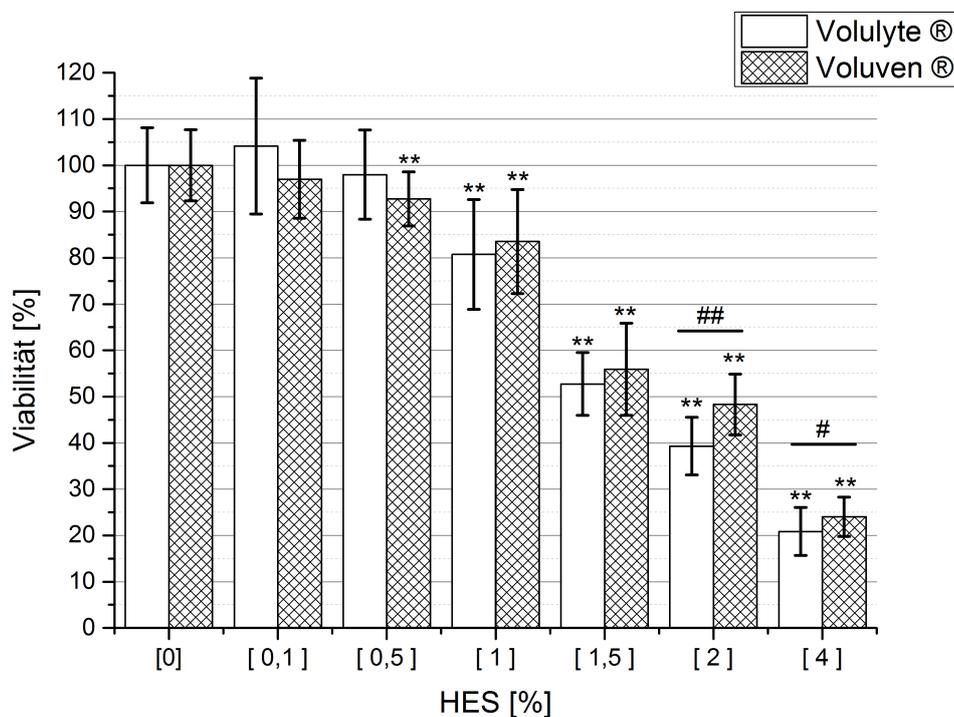
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass kolloidale Infusionslösungen auch pH – korrigiert im Zellkulturmodell eine dosisabhängige und deutliche Reduktion der Viabilität hervorrufen. Demgegenüber reduziert die kristalloide Vergleichslösung Sterofundin<sup>®</sup> ISO nur in ihrer Maximaldosis die Viabilität leicht um  $8,33\% \pm 7,67\%$  SD. Durch Kombination mit einer protektiven Dosis Humanalbumin war es nicht möglich, die Zellschädigung in relevantem Umfang abzumildern. Die zusätzliche Gabe von 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> hingegen kann in einer alleine nicht viabilitätsreduzierenden Dosis bei

zusätzlicher Applikation von 1% Voluven<sup>®</sup> dessen Wirkung signifikant verstärken.

### 3.4 Der Einfluss von Trägerlösung und Ursprung des HES-Moleküls auf dessen Wirkung auf die Zellviabilität

Die folgenden Ergebnisse zeigen Versuche, deren Ziel es war herauszufinden, inwiefern es sich bei der im vorhergehenden Abschnitt gezeigten funktionellen Einschränkung von Nierenzellen *in vitro* um einen allen HES-Präparaten gemeinsamen Effekt handelt, oder ob dies nur einige wenige betrifft.

#### 3.4.1 EZ4U von Volulyte<sup>®</sup> (Balanciertes HES 130 / 0,4) im Vergleich mit Voluven<sup>®</sup> (NaCl 0,9% – basiertes HES 130 / 0,4) nach 21 Stunden Inkubation

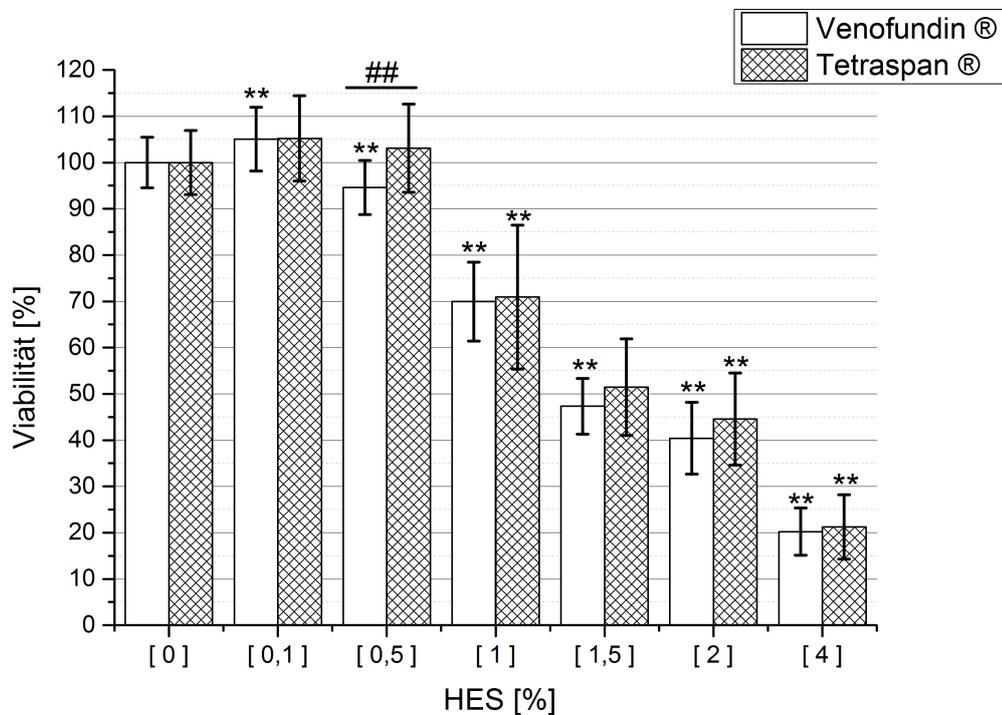


**Abb. 3.20:** EZ4U: Einfluss der Volulyte<sup>®</sup> – (HES 130 / 0,4 in balancierter Vollelektrolytlösung) und Voluven<sup>®</sup> (HES 130 / 0,4 auf 0,9% NaCl – Basis) – Lösungen nach 21 Stunden Inkubation auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, ## = p 0,001 gegeneinander, n = 48 – 32)

### 3 Ergebnisse

Abbildung 3.20 beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern die Trägerlösung von HES 130 / 0,4 einen Einfluss auf die Auswirkungen auf die Zellviabilität hat. Untersucht wurden dafür die Viabilitätswerte im EZ4U nach 21 Stunden Inkubation mit Voluven<sup>®</sup> und Volulyte<sup>®</sup>. Bei Voluven<sup>®</sup> handelt es sich um 0,9% NaCl basiertes HES 130 / 0,4, während Volulyte<sup>®</sup> auf einer balancierten Vollelektrolytlösung basiert (siehe Abschnitt 1.2.7 auf Seite 21). Die Viabilitätsmessung des pH – korrigierten Voluven<sup>®</sup> ist bereits für Abbildung 3.15 auf Seite 80 ausführlich besprochen worden. Weder die niedrigste Dosis von 0,1% Volulyte<sup>®</sup> ( $104,18\% \pm 14,67\%$  SD), noch die darauf folgende von 0,5% Volulyte<sup>®</sup> weicht auf statistisch relevante Weise von zur der 0% – Referenzgruppe ab. Die erste statistisch hoch signifikante Beeinträchtigung der Viabilität auf  $80,73\% \pm 11,84\%$  SD findet nach Inkubation mit 1% Volulyte statt. Unter 1,5% Volulyte<sup>®</sup> reduziert sich die Viabilität um  $47,28\% \pm 6,79\%$  SD. Bis zu dieser Dosis unterschieden sich Volulyte<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup> nicht statistisch von einander. Erst 2% Volulyte erweist sich mit einer Reduktion auf  $39,31\% \pm 6,22\%$  SD als hoch signifikant schädlicher als 2% Voluven<sup>®</sup> ( $48,3\% \pm 6,59\%$ ). Unter der Maximaldosis von 4% Volulyte schwächt sich dieser Trend ab. Trotzdem unterscheidet sich die Beeinträchtigung der Zellviabilität auf  $20,86\% \pm 5,20\%$  SD statistisch signifikant von 4% Voluven<sup>®</sup> ( $24,02\% \pm 4,27\%$  SD).

### 3.4.2 EZ4U von Tetraspan® (Balanciertes HES 130 / 0,42) im Vergleich mit Venofundin® (NaCl 0,9% – basiertes HES 130 / 0,42) nach 21 Stunden Inkubation



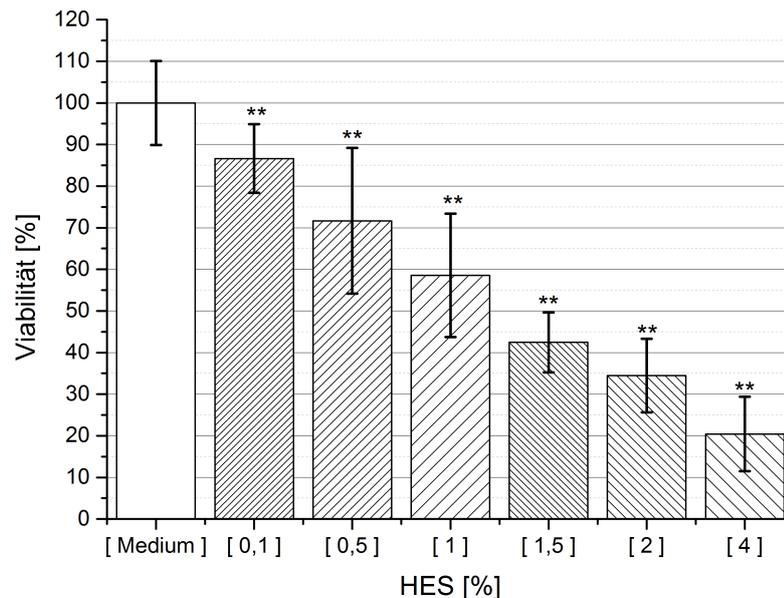
**Abb. 3.21:** EZ4U: Einfluss der Tetraspan® (HES 130 / 0,42 in balancierter Vollelektrolytlösung) und Venofundin® (HES 130 / 0,42 auf 0,9% NaCl – Basis) – Lösungen nach 21 Stunden Inkubation auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, ## = p 0,001 gegeneinander, n = 48 – 32)

In Abbildung 3.21 wird die Untersuchung des Einflusses der Trägerlösungen von HES 130 / 0,42 hinsichtlich deren Auswirkungen auf die Zellviabilität gezeigt. Untersucht wurden dafür die Viabilitätswerte im EZ4U nach 21 Stunden Inkubation mit Tetraspan® und Venofundin®. Für die ausführliche Wiedergabe der einzelnen Messwerte mit der entsprechenden Standardabweichung sei auf die Abschnitte 3.23 für Venofundin® und 3.24 für Tetraspan® verwiesen. Zusammenfassend unterscheiden sich beide Trägerlösungen im EZ4U nur für die Konzentration von 0,5% HES statistisch (hoch-) signifikant. Außerdem fällt im direkten Vergleich auf, dass erstens Venofundin® bereits ab einer Konzentration von 0,5% HES die Viabilität statistisch hochsignifikant reduziert, während dies für Tetraspan® erst ab 1% HES beginnt und zweitens, dass bereits in der

### 3 Ergebnisse

Maximalkonzentration von 4% – HES ein geringer Trend zur schädlicheren Wirkung der NaCl-basierten Lösung besteht.

#### 3.4.3 EZ4U mit in Medium gelöstem HES nach 21 Stunden Inkubation



**Abb. 3.22:** EZ4U: Einfluss des in Medium gelösten HES auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen nach 21 Stunden Inkubation (MW ± SD, \* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

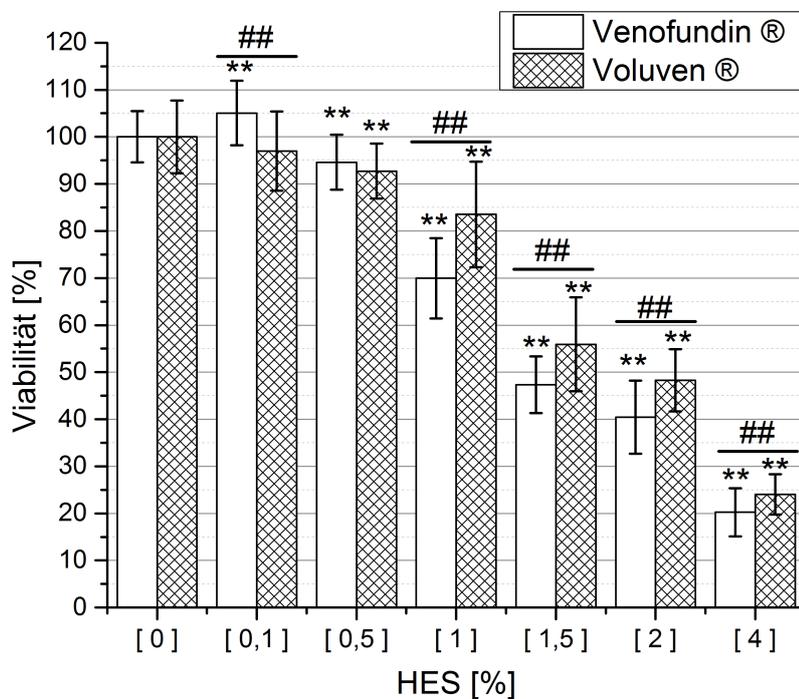
Um alle Einflussfaktoren durch unterschiedlich zusammengesetzte Trägerlösungen auf die Viabilitätsmessung zu reduzieren, wurde für den im folgenden dargestellten Versuch HES getrocknet und Zellmedium gelöst (siehe. Abschnitt 2.1.4 auf Seite 36). Aus der entstanden Lösung wurde – wie bei den Vorversuchen – eine Konzentrationsreihe hergestellt. Wichtig bei der Interpretation des Versuches ist, dass sich bei dieser Darstellung – abweichend vom Standardvorgehen – alle Werte auf eine Kontrollgruppe bezieht, die 100% Zellmedium erhalten haben. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 3.22 dargestellt. Bereits die Konzentration von 0,1% HES reduziert die Viabilität statistisch hoch signifikant auf  $89,32\% \pm 10,26\%$  SD im Vergleich zur Medium – Kontrollgruppe. Auch unter den darauf folgenden Verdünnungen von 0,5% ( $70,69\% \pm 13,51\%$  SD), 1% HES ( $63,77\% \pm 14,62\%$  SD), 1,5% HES

### 3 Ergebnisse

(50,96% ± 7,52% SD), 2% HES (42,00% ± 9,76% SD) und 4% HES (28,33% ± 10,46 SD) findet eine statistisch jeweils hoch signifikante Beeinträchtigung der Zellen statt.

#### 3.4.4 EZ4U von Venofundin® (HES 130 / 0,42) im Vergleich mit Voluven® (HES 130 / 0,4) nach 21 Stunden Inkubation

Ein anderer zu untersuchender Aspekt ist, inwiefern der Ursprung der Stärkemoleküle (siehe auch 1.2.7 auf Seite 21) von Relevanz ist. Die in der Abbildung gezeigten und im Folgenden präsentierten Daten wurden bereits oben gezeigt. In diesem Abschnitt erfolgt nur der statistische Vergleich der Effekte beider Lösungen auf die Zellviabilität.



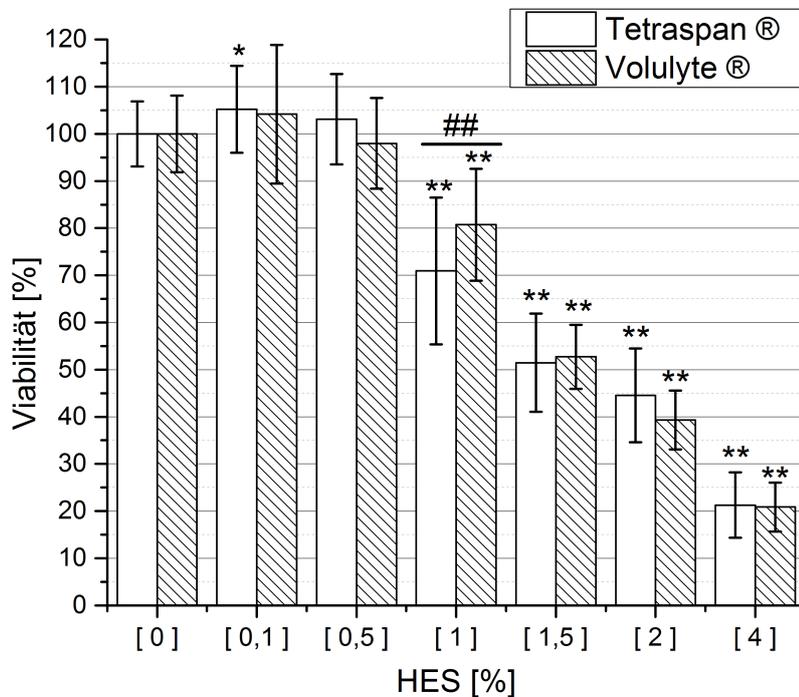
**Abb. 3.23:** EZ4U: Einfluss der HES 130 / 0,4 (Voluven®) und HES 130 / 0,42 (Venofundin®) – Lösungen, die beide auf 0,9% NaCl basieren, nach 21 Stunden Inkubation auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, ## = p < 0,001 gegeneinander, n = 48 – 32)

Abbildung 3.23 vergleicht das aus **Mais** gewonnene HES 130 / 0,4 (Voluven®) mit dem aus **Kartoffeln** hergestellten HES 130 / 0,42 (Venofundin®). Bei beiden Präparaten handelt es sich um auf 0,9% – NaCl basierende Lösungen. Beide Lösungen wurden vor dem Versuch pH – korrigiert. Bei der Applikation von Venofundin® zeigt sich eine den

### 3 Ergebnisse

Versuchen vergleichbare HES – typische dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität. Mit Ausnahme von 0,5% Venofundin<sup>®</sup> unterscheiden sich die gemessenen Viabilitätswerte statistisch hoch signifikant von den die gleiche Dosis HES enthaltenden Voluven<sup>®</sup> – Lösungen. Im niedrig konzentrierten Bereich wirkt 0,1% Venofundin<sup>®</sup> – anders als 0,1% Voluven<sup>®</sup> – zytoprotektiv im Vergleich zur Kontrolllösung, indem die Zellviabilität auf  $105,06\% \pm 5\% \text{ SD}$ , 45% angehoben wird. Die nächst höher konzentrierte Lösung – 0,5% Venofundin<sup>®</sup> – reduziert die Zellviabilität um  $5,39\% \pm 5,85\% \text{ SD}$ . Beginnend mit 1% Venofundin<sup>®</sup> beeinträchtigt Venofundin<sup>®</sup> die Viabilität hoch signifikant stärker als die gleich konzentrierte Voluven<sup>®</sup> – Lösung. So senkt 1% Venofundin<sup>®</sup> die Viabilität auf  $69,95\% \pm 8,51\% \text{ SD}$ . Auch 1,5% und 2% Venofundin<sup>®</sup> reduzieren die Viabilität auf  $47,34\% \pm 6,01\% \text{ SD}$  und  $40,52\% \pm 7,76\% \text{ SD}$ . Die applizierte Maximaldosis von 4% Venofundin<sup>®</sup> senkt die Viabilität auf  $20,23\% \pm 5,13\% \text{ SD}$ . Zusammenfassend erzielen 1%, 1,5%, 2% und 4% des aus Mais gewonnenen Voluven<sup>®</sup> im Direktvergleich statistisch größtenteils hochsignifikant höhere Viabilitätswerte als das aus Kartoffeln gewonnene Venofundin<sup>®</sup>. Inwiefern aus Kartoffel hergestelltes HES 130 / 0,42 allerdings mit einer grundsätzlich stärkeren Beeinträchtigung der Nierenzellen gleichzusetzen ist, zeigt der nächste Versuch.

### 3.4.5 EZ4U von Tetraspan® (Balanciertes HES 130 / 0,42) im Vergleich mit Volulyte® (Balanciertes HES 130 / 0,4) nach 21 Stunden Inkubation



**Abb. 3.24:** EZ4U: Einfluss der HES 130 / 0,4 (Volulyte®) und HES 130 / 0,42 (Tetraspan®) – Lösungen, die beide auf einer balancierten Vollelektrolytlösung (VEL) basieren, nach 21 Stunden Inkubation auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, ## = p < 0,001 gegeneinander, n = 48 – 32)

Ebenso wie HES 130 / 0,4 sowohl in 0,9% – NaCl Lösung, also auch in balancierter Vollelektrolytlösung (Volulyte®) vorliegt, gibt es HES 130 / 0,42 neben dem auf 0,9% – NaCl basierenden Venofundin® auch auf Vollelektrolytbasis in Form von Tetraspan®. Abbildung 3.24 vergleicht das aus Mais gewonnene HES 130 / 0,4 (Volulyte®) mit dem aus Kartoffeln hergestellten HES 130 / 0,42 (Tetraspan®). Beide Präparate verringern mit steigender Dosis HES zunehmend die Viabilität. Dabei zeigt Tetraspan® in der niedrigsten Dosierung statistisch signifikante protektive Effekte im Vergleich zur 0% – Kontrollgruppe, indem es die Viabilität auf 105,22% ± 9,24 % SD. Dabei ist zu beachten, dass 0,1% Volulyte® ebenfalls eine ähnliche Tendenz hat und die Viabilität – statistisch allerdings nicht signifikant – auf 104,18% erhöht. Dabei weist diese Gruppe auch eine mit 14,69% höheren SD auf. Im Vergleich zwischen beiden

0,1% – Lösungen zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Die nächst höher konzentrierte Lösung mit 0,5% Tetraspan<sup>®</sup> unterscheidet sich bei einer gemessenen Viabilität von  $103,10\% \pm 9,56\%$  statistisch nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Erst in der darauf folgenden Verdünnung von 1% HES unterscheiden sich Volulyte<sup>®</sup> und Tetraspan<sup>®</sup> statistisch hochsignifikant sowohl von einander als auch jeweils zur 0% – Referenzgruppe. Das maisbasierte 1% Volulyte<sup>®</sup> reduziert die Viabilität dabei um  $19,27\% \pm 11,84\%$ , das kartoffelbasierte Tetraspan<sup>®</sup> um  $29,07\% \pm 15,55\%$ . Die übrigen Dosierungen von Tetraspan<sup>®</sup> unterscheiden sich statistisch nicht von der Volulyte<sup>®</sup> – Reihe. Insgesamt unterscheiden sich die beiden Lösungen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Zellviabilität mit Ausnahme der 1% – Lösungen nicht. Zusammenfassend konnte durch diese Versuche gezeigt werden, dass die beobachtete funktionelle Schädigung der Nierenzellen sowohl bei balancierten und NaCl – basierten Lösungen, als auch bei HES 130 / 0,4 und HES 130 / 0,42 und somit unabhängig von der Ursprungssubstanz des Moleküls in vergleichbarer Weise auftritt. Auch in Medium gelöstes HES reduzierte die Viabilität dosisabhängig.

## 3.5 Der Einfluss der Molekülgröße des HES–Moleküls und der HES–Generation auf die Zellviabilität

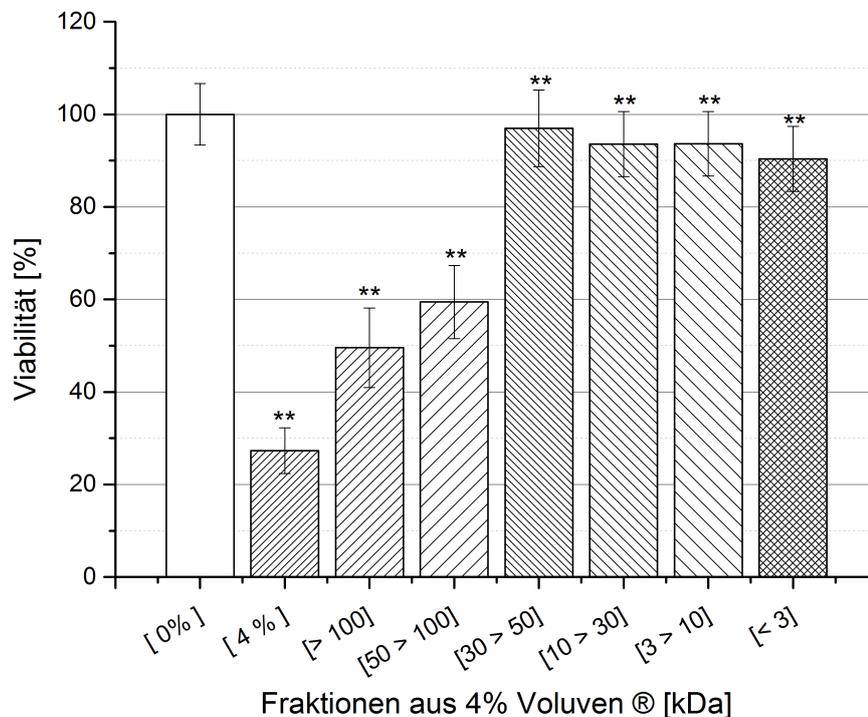
Die Weiterentwicklung von HES erfolgte durch Modifikation des Substitutionsmusters und der Molekülgröße (siehe auch Abschnitt 1.2.7 auf Seite 21). In den vorhergehenden Versuchen ist darauf eingegangen worden, auf welche Weise sich Trägerlösung und Ursprung des HES auf dessen Wirkung auf die Zellviabilität auswirken. In den nachfolgenden Versuchen soll zunächst gezeigt werden, inwiefern die Größe des HES – Moleküls einen Einfluss auf die Viabilität hat, um dann zwei Vertreter der 2. Generation (vgl. Tabelle 1.4), nämlich niedermolekulares (70 kDa) und hochmolekulares HES (200 kDa), mit dem 130 kDa großen HES der 3. Generation miteinander zu vergleichen.

### 3.5.1 Untersuchung der Viabilität der einzelnen Fraktionen einer 4% Voluven<sup>®</sup> – Lösung

Zunächst war von Interesse, ob es bestimmte Molekülgrößen gibt, die sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf humane proximale Nierentubulusepithelzellen von den anderen Fraktionen unterscheiden. Dafür wurde – wie in Abschnitt 2.1.2 auf Seite 35 beschrieben – 6% Voluven<sup>®</sup> in die Fraktionen  $>100$  kDa,  $100 - 50$  kDa,  $50 - 30$  kDa,  $30 - 10$  kDa,  $10 - 3$  kDa und  $< 3$  kDa aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden nach

### 3 Ergebnisse

dem Standardverdünnungsschema auf das Volumen der 4% Lösung angeglichen. Die Abbildung 3.25 zeigt das Ergebnis des EZ4U nach 21 Stunden Inkubation.



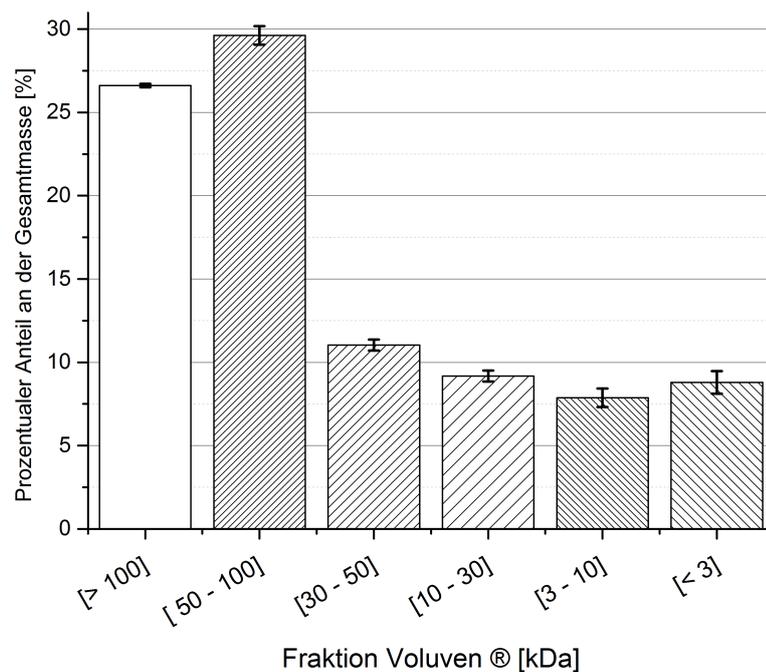
**Abb. 3.25:** EZ4U: Der Einfluss der HES – Fraktionen auf die Viabilität von HK-2 Zellen, EZ4U von 4% in seine einzelnen Fraktionen aufgeteiltes Voluven® nach 21 Stunden Inkubation (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 48 – 32)

Die stärkste Beeinträchtigung der Zellviabilität kann nach Inkubation mit unfiltriertem 4% Voluven® auf 27,33% ± 4,95% SD beobachtet werden. Innerhalb der nach Molekülgröße fraktionierten Lösungen reduzierten die hochmolekularen Fraktionen > 100 kDa (49,54% ± 8,62% SD) und im Bereich zwischen 50 kDa und 100 kDa (59,43% ± 7,90% SD) die Viabilität am stärksten im Vergleich zur Referenzlösung. Die kleineren Fraktionen haben deutlich geringeren Einfluss auf die Viabilität. So senkt die Fraktion zwischen 30 kDa und 50 kDa die Viabilität auf 96,97% ± 8,29% SD, zwischen 30 kDa und 10 kDa auf 93,55% ± 7,01% SD, zwischen 10 kDa und 3 kDa auf 93,64% ± 6,97% SD, sowie kleiner als 3 kDa auf 90,36% ± 7,00% SD. Trotzdem reduzierten auch diese HES – Lösungen die Viabilität statistisch hoch signifikant im Vergleich zur

0% – Referenzlösung. Zusammenfassend fällt beim Betrachten des Ergebnisses auf, dass die Fraktionen > 50 kDa im Vergleich zu denen < 50 kDa deutlich stärker die Viabilität reduzieren. Die niedermolekularen Fraktionen erscheinen dazu im Vergleich geradezu inert.

### 3.5.2 Untersuchung des prozentualen Anteils der einzelnen HES – Fraktionen

Um zu untersuchen, ob die niedermolekularen Fraktionen tatsächlich inert sind, wurde im nächsten Schritt die in den einzelnen Fraktionen enthaltene HES – Menge bestimmt. Wird nämlich der jeweilige prozentuale Anteil der einzelnen Fraktionen an der Gesamtmasse in die Interpretation miteinbezogen, dann relativiert sich diese Beobachtung. So zeigt Abbildung 3.26, dass die Fraktionen mit der stärksten funktionellen Einschränkung der Zellen genau die sind, die auch den größten Anteil am Gesamtgewicht haben.



**Abb. 3.26:** Der Anteil der einzelnen HES – Fraktionen von Voluven® in [%], ± SD

Abbildung 3.26 zeigt den relativen Anteil der einzelnen Fraktionen an der Gesamtmenge HES im Voluven®. Dabei stellen die Fraktionen > 100 kDa mit 26,62% und 50 bis 100 kDa mit 29,62% zusammen mehr als die Hälfte am Gesamtgewicht. Die kleineren

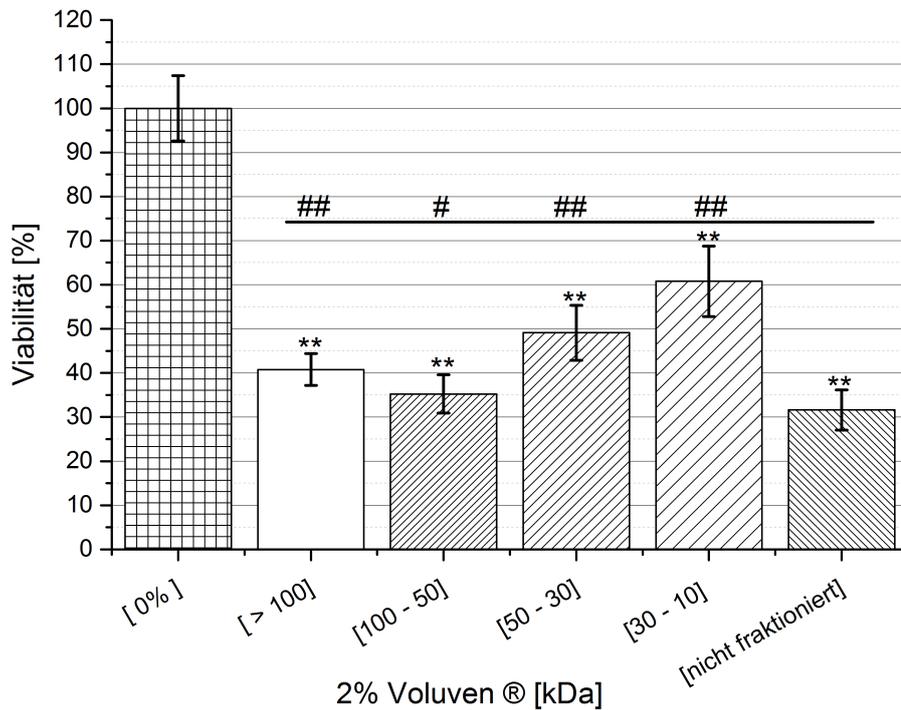
Fraktionen sind geringer vorhanden. Die HES – Moleküle in einer Größe zwischen 30 kDa und 50 kDa machen etwa 11,04%, die zwischen 10 kDa und 30 kDa etwa 9,17%, die zwischen 3 kDa und 10 kDa 7,88% und die kleiner als 3 kDa etwa 8,70% aus.

#### 3.5.3 Untersuchung der Viabilität der einzelnen Fraktionen, die jeweils 2% Voluven<sup>®</sup> enthalten

Um die Auswirkungen der Molekülgröße unabhängig von deren Anteil an der Gesamtmasse HES bestimmen zu können, wurde erneut Voluven<sup>®</sup> in seine Fraktionen aufgeteilt und getrocknet. Die so unterschiedlichen Anteile der Fraktionen am ursprünglichen Voluven<sup>®</sup> führten zu dem Problem, dass der mitgetrocknete NaCl – Gehalt der Trockenmasse stark schwankte. Die Trockenmasse wurde also mittels Aqua dest. gelöst und anschließend dialysiert (vgl. Abschnitt 2.1.5 auf Seite 37). Einschränkend muss erwähnt werden, dass der Anteil an HES 10 – 3 kDa zu gering war, um eine Zielkonzentration von 2% zu erzielen. Außerdem besaß der verwendete Dialysefilter eine Porengröße von 3,5 kDa, so dass die HES – Moleküle < 3 kDa ebenfalls nicht für den Versuch genutzt werden konnten.

Die Abbildung 3.27 zeigt die auf 2% HES konzentrierten einzelnen Fraktionen nach 21 Stunden Inkubation. Die Fraktion mit HES – Molekülen in einer Größe über 100 kDa bewirken eine statistisch hoch signifikante Reduktion der Zellviabilität auf 40,78% ± 3,60% SD. Die darauf folgende Fraktion von HES – Molekülen zwischen 50 kDa und 100 kDa senkt die Viabilität auf 35,22% ± 4,33% SD. Wie im Vorversuch gibt es einen leichten Trend zu geringerer Beeinträchtigung der Viabilität bei kleineren Molekülen. So senkt die Fraktion zwischen 30 kDa und 50 kDa die Viabilität statistisch hoch signifikant auf 49,11% ± 6,23% SD, zwischen 10 kDa und 30 kDa auf 60,79% ± 7,99% SD. Alle fraktionierten 2% – Lösungen – mit Ausnahme der Fraktion 50 – 100 kDa – unterscheiden sich statistisch hochsignifikant von der 2% Voluven<sup>®</sup> – Lösung, die nicht filtriert wurde. Die Viabilität der Zellen reduziert sich nach Inkubation mit Letzterer auf 31,61% ± 4,54% SD. Erneut erweisen sich die Moleküle, die größer als 50 kDa sind, als funktionell schädlicher als diejenigen, die kleiner als 50 kDa sind.

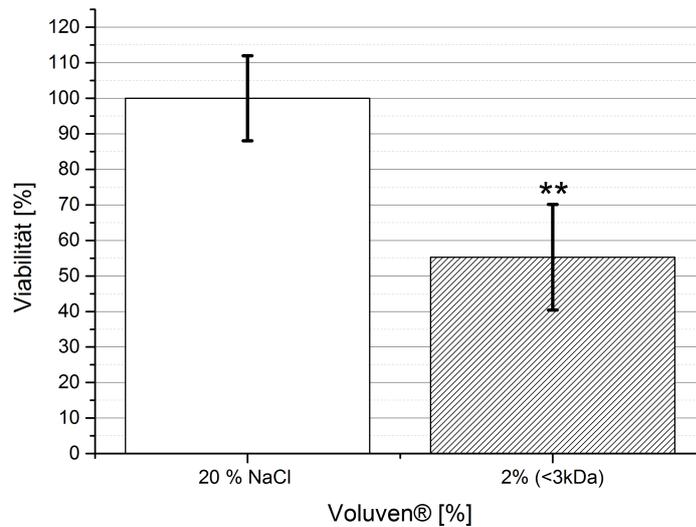
### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.27:** EZ4U: Der Einfluss der verschiedenen Fraktionen mit derselben Konzentration (2%) von Voluven® nach 21 Stunden Inkubation auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%, # =  $p < 0,01$  gegen unfraktioniertes 2% Voluven, ## =  $p < 0,001$  gegen unfraktioniertes 2% Voluven, n = 48 – 32)

Abbildung 3.28 zeigt die Fraktion HES < 3 kDa und relativiert diese Beobachtung. Zwar konnte, wie oben geschildert, die Fraktion < 3kDa nicht dialysiert und dafür nicht im selben Versuch mit den anderen 2% Fraktionen untersucht werden. Die NaCl – Konzentration wurde aber auf Grundlage der erhobenen Daten mit 20% berechnet und entsprechend im EZ4U eine 20% NaCl – Lösung als Referenz verwendet. Die durch die HES – Moleküle < 3 kDa verursachte Viabilitätsreduktion um 44,72 % ( $\pm$  14,85%) ist statistisch hoch signifikant im Vergleich mit den nur mit 20% NaCl inkubierten Zellen. Damit bewegen sich die auf 2% HES konzentrierte < 3 kDa große HES – Fraktion in einem vergleichbaren Rahmen zu den größeren Fraktionen (> 100 kDa bis > 30 kDa) 2% – Fraktionen.

### 3 Ergebnisse



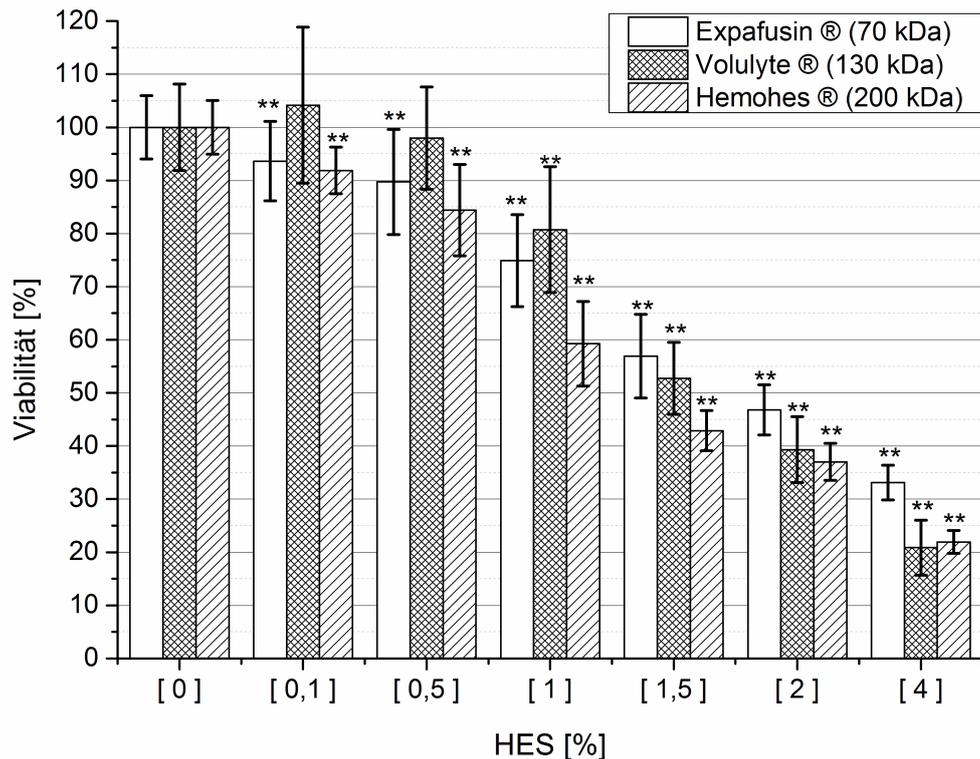
**Abb. 3.28:** EZ4U: Einfluss von 2% HES < 3 kDa und 20% NaCl (= Kontrolle) nach 21 Stunden Inkubation auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen, (MW  $\pm$  SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 32)

Zusammenfassend beeinträchtigen alle untersuchten HES – Fraktionen die Zellen statistisch hoch signifikant. Im Vergleich miteinander gibt es einen Trend zu einer stärkeren Schädigung durch hochmolekulare Fraktionen.

#### 3.5.4 Vergleich verschiedener HES – Generationen

Die verschiedenen HES – Generationen unterscheiden sich nicht nur in ihrer molekularen Größe, sondern auch vom molekularen Aufbau ihrer Glukoseketten (siehe Abschnitt 1.2.7 auf Seite 15). Der folgende Versuch geht deshalb auf die Frage ein, inwiefern sich Vertreter der verschiedenen Generationen im direkten Vergleich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zellviabilität unterscheiden.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.29:** EZ4U: Einfluss der Expafusin® (70 kDa), Voluven® (130 kDa) und Hemohe® (200 kDa) – Lösungen nach 21 Stunden auf die Zellviabilität, (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 32)

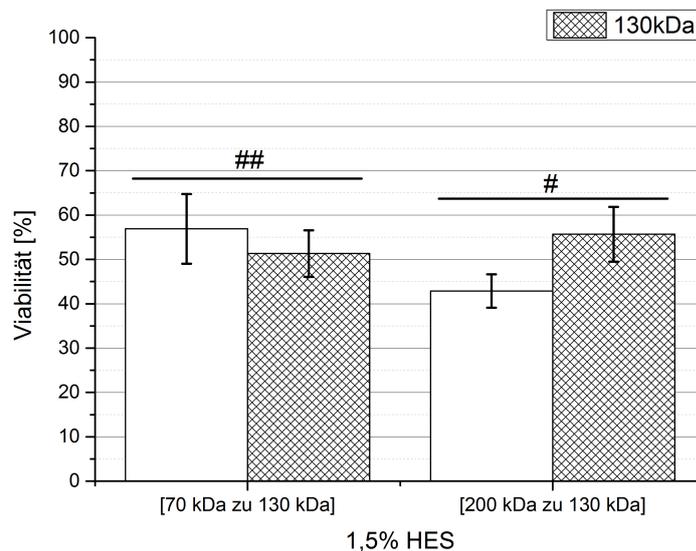
Für den folgenden Versuch wurden zwei Vertreter der 2. Generation verwendet, nämlich 70 kDa (Expafusin®) und 200 kDa (Hemohe®) Pentastarch. Abbildung 3.29 zeigt diese im Vergleich mit Volulyte®.

Beginnend mit dem 70 kDa großen HES findet sich bereits ab einer Konzentration von 0,1% Expafusin® eine statistisch hoch signifikante Reduktion der Viabilität auf  $93,64\% \pm 7,46\%$  SD im Vergleich zur 0% – Referenzgruppe. Unter den darauf folgenden Konzentrationen fällt die Viabilität zunehmend weiter ab. Unter 0,5% Expafusin® auf  $89,73\% \pm 9,91\%$  SD, unter 1% Expafusin® auf  $74,91\% \pm 8,67\%$  SD, unter 1,5% Expafusin® auf  $56,89\% \pm 7,88\%$  SD, unter 2% Expafusin® auf  $46,80\% \pm 4,71\%$  SD und unter 4% Expafusin® auf  $33,10\% \pm 3,25\%$  SD. Die Viabilitätswerte von Volulyte® wurden bereits in Abschnitt 3.4.1 auf Seite 87 besprochen. Die größten untersuchten HES – Moleküle hatten eine Größe von 200 kDa. Auch unter Hemohe® beginnt die statistisch hoch signifikante Senkung der Zellviabilität ab einer Konzentration von 0,1% HES auf  $91,88\% \pm 4,39\%$  SD. Dabei liegt die gemessene Viabilität mit Ausnahme der Konzentration von 4% HES stets niedriger als die gleiche Konzentration von

### 3 Ergebnisse

Expafusin<sup>®</sup> und Volulyte<sup>®</sup>. Für 0,5% Hemohe<sup>®</sup> wurde  $84,41\% \pm 8,61\%$  SD, für 1% Hemohe<sup>®</sup>  $59,25\% \pm 7,95\%$  SD, für 1,5% Hemohe<sup>®</sup>  $42,88\% \pm 3,79\%$  SD, für 2% Hemohe<sup>®</sup>  $37,00\% \pm 3,48\%$  SD und für 4% Hemohe<sup>®</sup> eine Viabilität von  $21,91\% \pm 2,15\%$  SD gemessen.

Zusammenfassend zeigen alle drei untersuchten Versuchslösungen eine sehr ähnliche dosisabhängige Reduktion der Viabilität. Dabei scheint das niedermolekulare HES im Bereich der höheren Dosierungen (ab 1,5% – HES) eine geringere negative Wirkung als die höher molekularen Lösungen zu haben. Bei näherer Betrachtung der Konzentrationen mit weniger als 1% – HES zeigt sich ein geringer Vorteil des mittelmolekularen HES. Nur das 200 kDa – HES zeigt in nahezu allen Fällen eine höhere funktionelle Beeinträchtigung der Zellviabilität als die nieder- und mittelmolekularen Präparate. Verglichen mit Expafusin<sup>®</sup> reduziert Hemohe<sup>®</sup> die Zellviabilität zusätzlich um durchschnittlich  $9,62\% \pm 5,26\%$  SD.



**Abb. 3.30:** EZ4U: Einfluss von Expafusin<sup>®</sup> (70 kDa) vs. Volulyte<sup>®</sup> (130 kDa) (in der Abbildung links) und Hemohe<sup>®</sup> (200 kDa) vs. Volulyte<sup>®</sup> (130 kDa) (in der Abbildung rechts) nach 21 Stunden Inkubation auf die Zellviabilität, (MW  $\pm$  SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%, # =  $p < 0,01$  gegeneinander, ## =  $p < 0,001$  gegeneinander,  $n = 48 - 32$ )

Zur besseren Übersichtlichkeit greift Abbildung 3.30 noch einmal die Frage hinsichtlich einer höheren Beeinträchtigung der Zellviabilität durch höhermolekulare HES – Moleküle auf. Gezeigt wird die Zellviabilität von 1,5% 70 kDa und 200 kDa HES, jeweils im Vergleich zu 1,5% Volulyte<sup>®</sup>. Augenscheinlich besteht ein Unterschied zwischen

beiden 1,5% Volulyte<sup>®</sup> Vergleichsgruppen. Diese Abweichung ( $4,35\% \pm \text{SD } 3,08\%$ ) erklärt sich dadurch, dass die zugrundeliegenden Messwerte aus verschiedenen Versuchen stammen, nämlich einmal aus dem Hemohes<sup>®</sup> – und einmal aus dem Expafusin<sup>®</sup> – Versuch. Bei Rückkehr zu den in Abbildung 3.30 gezeigten Daten wird ein statistisch hochsignifikanter Unterschied zwischen 200 kDa und 130 kDa HES auf der einen Seite und einen weniger statistisch signifikanter Unterschied zwischen 70 kDa und 130 kDa HES auf der anderen Seite sichtbar. Insgesamt bestätigt sich das Bild der Vorversuche, 200 kDa HES beeinträchtigt die Zellviabilität etwas stärker, 70 kDa HES hingegen etwas weniger. Limitierend muss erwähnt werden, dass Hemohes<sup>®</sup> in 0,9% NaCl gelöst ist, während Expafusin<sup>®</sup> und Volulyte<sup>®</sup> auf balancierten Vollelektrolytlösungen beruhen. Allerdings spielt die Trägerlösung, wie in Kapitel 3.4 auf Seite 87 dargelegt, nur eine sehr untergeordnete Rolle bei den Auswirkungen auf die Zellviabilität.

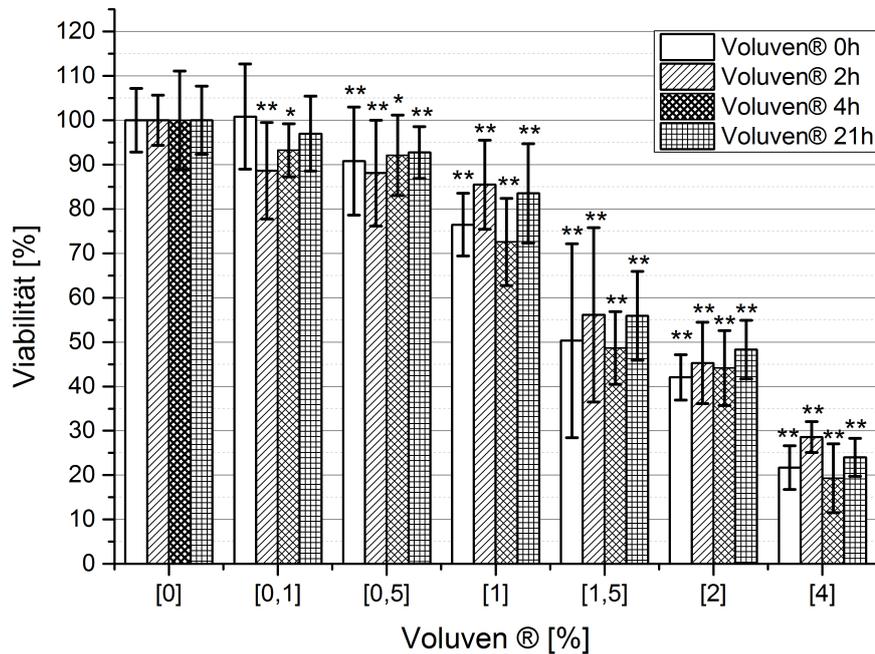
#### **3.5.5 Zusammenfassung über den Einfluss von Molekülgröße und HES – Generation auf die Zellviabilität**

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass alle Molekülgrößen dosisabhängig HK – 2 Zellen funktionell beeinträchtigen. Im *in – vitro* – Modell zeigen sich keine deutlichen Hinweise auf eine relevante Überlegenheit des nieder – und mittelmolekularen HES gegenüber des hochmolekularen HES. Viel entscheidender als die Molekülgröße ist die applizierte absolute Masse an HES. Dies stärkt die Einschätzung, dass es sich bei der *in vitro* beobachteten Einschränkung der Zellfunktion um einen ausschließlich von der Gesamtmenge HES abhängigen Effekt handelt.

### **3.6 Der Einfluss der Inkubationsdauer auf die Wirkung von HES**

Die Kapitel 3.3 und 3.5 beschäftigten sich vor allem damit, dass die Reduktion der Zellviabilität vor allem durch das HES – Molekül selbst verursacht wird. In den folgenden Versuchen soll näher auf die Art und Weise eingegangen werden. Dabei beleuchtet der folgende Abschnitt die Relevanz der Inkubationsdauer für die Viabilitätsreduktion. Zuerst wurde geprüft, ob die nach 21 Stunden Inkubation beobachtete Einschränkung der Viabilität auch nach kürzerer Applikationsdauer messbar ist.

### 3 Ergebnisse

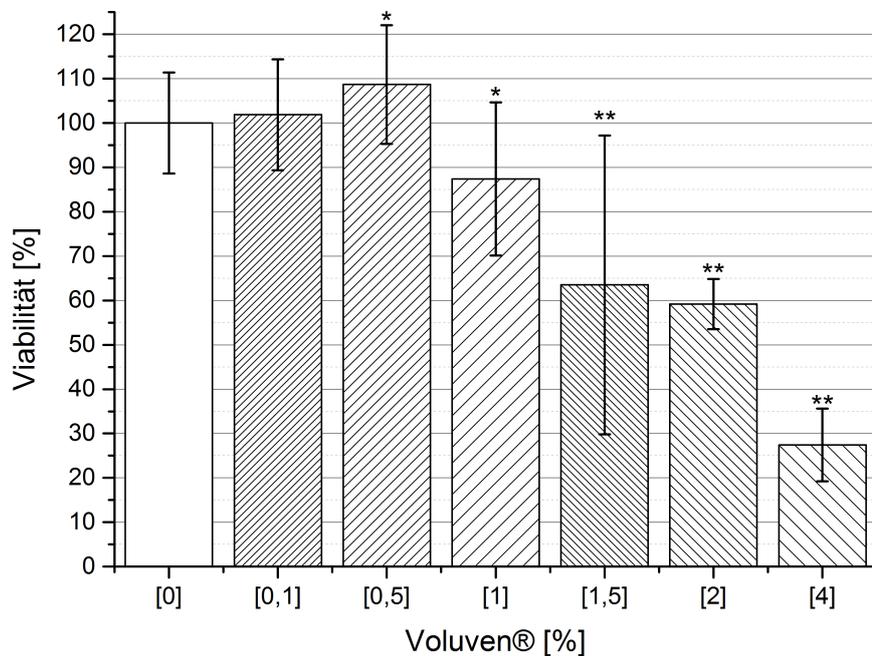


**Abb. 3.31:** EZ4U: Der Einfluss der Inkubationsdauer auf Viabilitätsreduktion von HK-2 Zellen durch HES, dargestellt ist Voluven® nach 0, 2, 4 und 21 Stunden Inkubation, (MW  $\pm$  SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

Abbildung 3.31 zeigt das Ergebnis nach 0, 2, 4 und 21 Stunden Inkubation. Dabei zeigt sich nach 0 Stunden Inkubation für 0,1% Voluven® mit einer Viabilität von  $100,83\% \pm 11,86\%$  SD kein statistisch relevanter Unterschied zur 0% – Referenzgruppe. Die nächsthöhere HES – Konzentration von 0,5% Voluven® reduziert die Viabilität hingegen statistisch hoch signifikant auf  $90,81\% \pm 12,17\%$  SD. Auch 1% Voluven® reduzierte die Viabilität statistisch hochsignifikant auf  $76,45\% \pm 7,07\%$  SD und 1,5% Voluven® auf  $50,31\% \pm 21,88\%$  SD. Die höchsten Konzentrationen von 2% Voluven® reduzierten die Viabilität ebenfalls statistisch hochsignifikant auf  $42,04\% \pm 5,12\%$  SD und für 4% Voluven auf  $21,69\% \pm 4,91\%$  SD. Nach 2 Stunden Inkubation lagen alle für Voluven® gemessenen Viabilitätswerte statistisch hoch signifikant unter der 0% – Referenzlösung. Dabei wurde für 0,1% Voluven®  $88,61\% \pm 10,89\%$  SD, für die nächst höher konzentrierte Versuchslösung von 0,5% Voluven®  $88,09\% \pm 11,92\%$  SD und für 1% Voluven®  $85,49\% \pm 10,04\%$  SD gemessen. Die Versuchslösung mit 1,5% Voluven® reduzierte die Viabilität auf  $56,14\% \pm 19,68\%$  SD, während für 2% Voluven®  $45,29\% \pm 9,18\%$  SD und für die applizierte Maximaldosis von 4% Voluven®

### 3 Ergebnisse

28,59% ± 3,48% SD gemessen wurde. Nach 4 Stunden Inkubation war die Viabilität ebenfalls bereits ab 0,1% Voluven<sup>®</sup> statistisch hoch signifikant niedriger als bei der 0% – Referenzlösung (93,23% ± 5,97% SD). Für die nächst höher konzentrierte Versuchslösung von 0,5% Voluven<sup>®</sup> wurde 92,10% ± 9,06% SD, für 1% Voluven<sup>®</sup> 72,57% ± 9,80% SD und für 1,5% Voluven<sup>®</sup> 48,66% ± 8,20% SD gemessen. Unter 2% Voluven<sup>®</sup> reduzierte sich die Zellviabilität auf 44,16% ± 8,45% SD und unter der applizierten Maximaldosis von 4% Voluven<sup>®</sup> auf 19,29% ± 7,74% SD. Die Messwerte für Voluven<sup>®</sup> nach 21 Stunden Inkubation wurden bereits in Abschnitt 3.4.1 auf Seite 87 wiedergegeben.



**Abb. 3.32:** EZ4U: Viabilitätsreduktion von HK-2 Zellen durch Voluven<sup>®</sup> nach 0 Stunden Inkubation zum Messzeitpunkt 30 Minuten (MW ± SD, \* = p < 0,005, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 48 – 32)

Wie Abbildung 3.32 demonstriert, ist bereits nach 0 Stunden Inkubation zum Messzeitpunkt 30 Minuten eine Reduktion der Viabilität messbar. Die niedrigst konzentrierte 0,1% Voluven<sup>®</sup> – Lösung unterschied sich mit den Messwerten 101,86% ± 12,51% SD kaum von der Referenzlösung (100% ± 11,39% SD). Die nächst höher konzentrierte

### 3 Ergebnisse

Lösung mit 0,5% Voluven<sup>®</sup> erhöhte die Viabilität leicht auf  $108,69\% \pm 13,38\%$  SD, während diese bereits unter 1% Voluven<sup>®</sup> auf  $87,39\% \pm 17,24\%$  SD, unter 1,5% Voluven<sup>®</sup> auf  $63,51\% \pm 33,67\%$  SD und unter 2% Voluven<sup>®</sup> weiter auf  $59,20\% \pm 5,66\%$  SD abfiel. Die höchst konzentrierte HES-Lösung 4% Voluven<sup>®</sup> senkte die Viabilität am stärksten ( $27,43\% \pm 8,21\%$  SD).

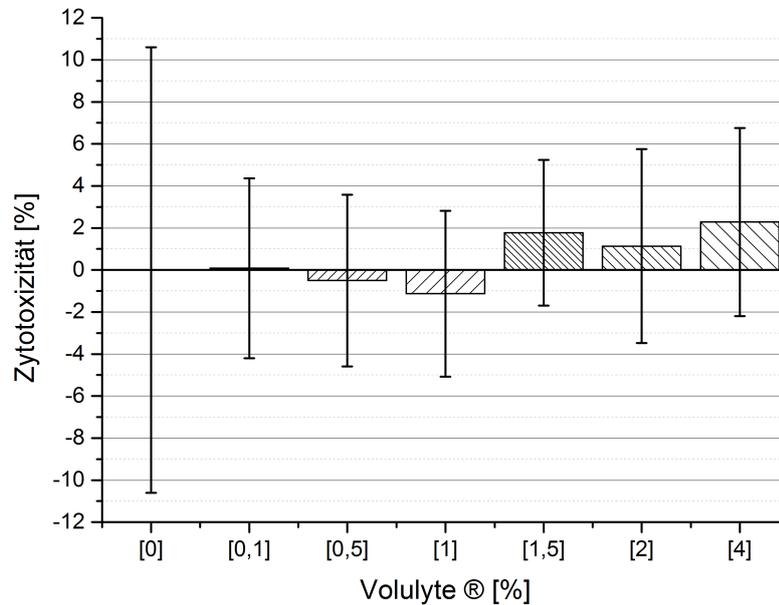
Zusammenfassend zeigt sich bereits sofort nach Beginn der Inkubation mit HES eine Reduktion der Zellviabilität. Dabei bewegt sich das prozentuale Ausmaß in einem vergleichbaren Rahmen, wobei die Einbuße nach 0 und 4 Stunden Inkubation am höchsten und nach 21 Stunden Inkubation geringer ausfällt.

#### **3.7 Der Anteil der direkten Zytotoxizität bei der HES – Wirkung**

Der nächste Schritt bestand darin einzuschätzen, ob die nach einer kurzen Inkubation mit HES gemessene Reduktion der Zellviabilität durch einen direkten Zellschaden verursacht wird. Dafür wurde ein Zytotoxizitätsassay etabliert. Dabei handelt es sich, wie in Kapitel 2.5 auf Seite 48 beschrieben, um eine Methode, die den Zellschaden anhand des durch eine beschädigte Zellmembran austretenden LDHs quantifiziert. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein normalerweise intrazellulär vorkommendes Enzym. Je höher das gemessene LDH, desto stärker ist die Schädigung einer Zellpopulation. Als Referenzgruppe dienen in diesem Fall nicht mit 0% – Referenzlösung behandelte Zellen, sondern lysierte Zellen. Das bedeutet, dass der als 100% definierte Messwert dem durchschnittlichen Gesamtgehalt an LDH entspricht.

### 3.7.1 LDH – Test von Volulyte®

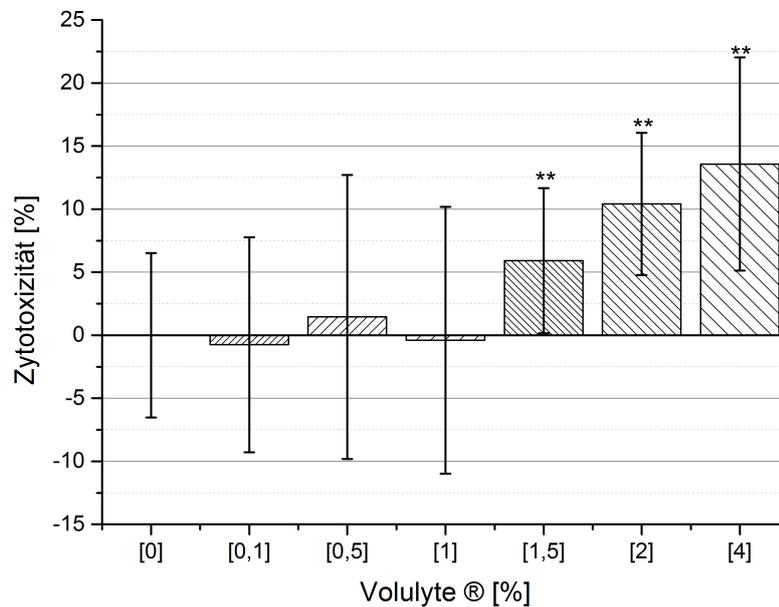
#### LDH – Test von Volulyte® nach 4 Stunden



**Abb. 3.33:** LDH: Die Toxizität von pH – korrigiertem Volulyte® nach 4 Stunden Inkubation auf HK-2 Zellen (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 48 – 32)

Abbildung 3.33 zeigt die nach 4 Stunden Inkubation mit Volulyte® gemessene Zytotoxizität. Nach Inkubation mit 0,1% Volulyte® wurde eine Zytotoxizität von 0,08% ± 4,28% SD, mit 0,5% Volulyte® von -0,5% ± 4,09% SD, mit 1% Volulyte® von -1,13% ± 3,95% SD, mit 1,5% Volulyte® von 1,77% ± 3,46% SD, mit 2% Volulyte® von 1,13% ± 4,61% SD und mit 4% Volulyte® von 2,28% ± 4,47% SD gemessen. Zwar gibt es einen Trend zu höherer Toxizität durch höhere HES – Konzentrationen, eine statistische Signifikanz konnte allerdings bei keiner Messung ermittelt werden.

## LDH – Test von Volulyte® nach 24 Stunden



**Abb. 3.34:** LDH: Die Toxizität von pH – korrigiertem Volulyte® nach 24 Stunden Inkubation auf HK-2 Zellen (MW ± SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

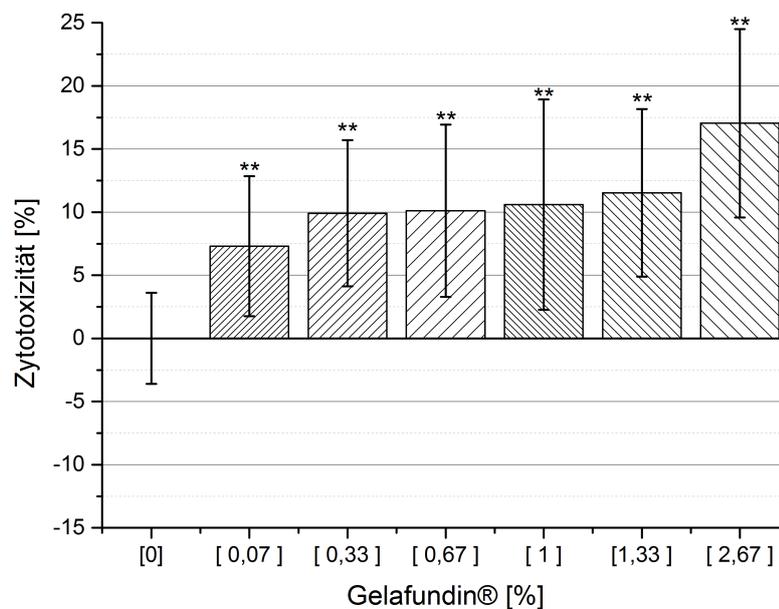
Abbildung 3.34 zeigt hingegen die nach 24 Stunden Inkubation mit Volulyte® gemessene Zytotoxizität. Diese unterscheidet sich für 0,1% Volulyte® mit  $0,76\% \pm 8,53\%$  SD, für 0,5% Volulyte® mit  $1,45\% \pm 11,26\%$  SD und für 1% Volulyte® mit  $-0,4\% \pm 10,75\%$  SD nicht von der 0% – Referenzlösung. Beginnend mit 1,5% Volulyte® ist die gemessene Zytotoxizität statistisch hoch signifikant im Vergleich zur 0% – Referenzgruppe. Diese liegt für 1,5% Volulyte® bei  $5,92\% \pm 5,76\%$  SD, für 2% Volulyte® bei  $10,42\% \pm 5,64\%$  SD und für 4% Volulyte® bei  $13,57\% \pm 8,46\%$  SD.

Zusammenfassend fällt die durch HES verursachte Zytotoxizität im Vergleich zur Einschränkung der Zellviabilität gering aus, da die Höchstdosis Volulyte® nur einen vergleichsweise geringen Schaden von 13,57% ( $\pm 8,46\%$  SD) bei einer Viabilitätsreduktion um 79,14 % ( $\pm 5,2\%$  SD). HES ist also nach 24 Stunden Inkubation zytotoxisch, nach 4 Stunden Inkubation zeigt sich allerdings keine statistisch signifikante Wirkung.

### 3.7.2 Die direkte Zytotoxizität von Gelafundin<sup>®</sup>, Humanalbumin und Sterofundin<sup>®</sup> ISO

In den in Kapitel 3.3 auf Seite 67 dargestellten Versuchen zur Zellviabilität waren zur besseren Einordnung der HES – Ergebnisse auch die Kolloide Gelafundin<sup>®</sup> und Humanalbumin, sowie das Kristalloid Sterofundin<sup>®</sup> ISO untersucht worden. Dabei reduzierte Gelafundin<sup>®</sup> die Zellviabilität in einer dem HES vergleichbaren Art und Weise, während Sterofundin<sup>®</sup> ISO keine bis protektive Wirkung entfaltete. Humanalbumin wirkte in geringer Dosierung protektiv, in höchster (1,67%) reduzierend auf die Zellviabilität. In den folgenden Abbildungen (Abbildungen 3.35, 3.36 und 3.37) sind deren zytotoxische Korrelate angeführt.

#### LDH – Test von Gelatine<sup>®</sup> nach 24 Stunden



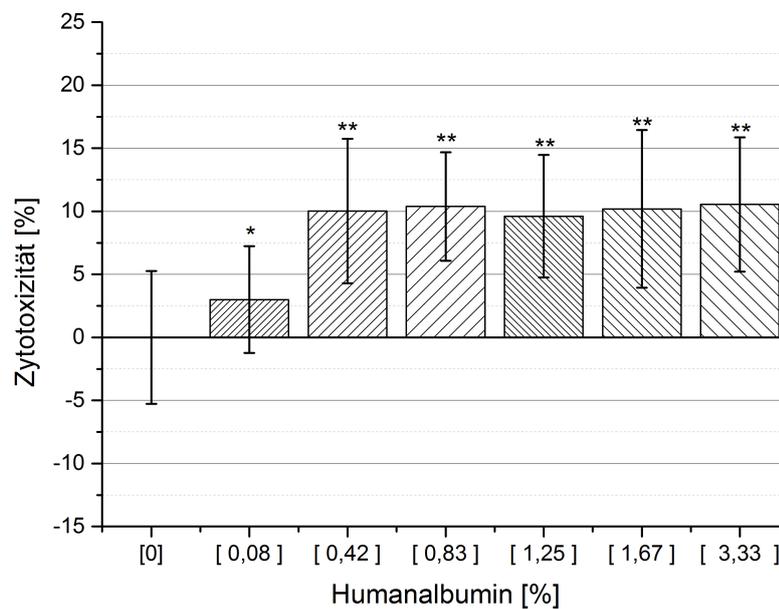
**Abb. 3.35:** LDH: Die Toxizität von pH – korrigiertem Gelafundin<sup>®</sup> auf HK-2 Zellen nach 24 Stunden Inkubation (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 48 – 32)

Abbildung 3.35 zeigt die nach 24 Stunden Inkubation mit Gelatine<sup>®</sup> gemessene Zytotoxizität. Zu sehen ist, dass bereits die geringste applizierte Dosis von 0,07% Gelatine<sup>®</sup> eine statistisch hochsignifikante Zytotoxizität von 7,3% ± 5,54% SD aufweist. Die darauf folgenden Konzentrationen zeigen eine etwas höhere, untereinander vergleichbare

### 3 Ergebnisse

statistisch hoch signifikante Zytotoxizität, für 0,33% Gelatine<sup>®</sup> mit  $9,91\% \pm 5,79\%$  SD, für 0,67% Gelatine<sup>®</sup> mit  $10,1\% \pm 6,82\%$  SD, für 1% Gelatine<sup>®</sup> mit  $10,59\% \pm 8,34\%$  SD und für 1,33% Gelatine<sup>®</sup> mit  $11,52\% \pm 6,64\%$  SD. Erst die höchste Dosis von 2,67% Gelatine<sup>®</sup> befindet sich nicht mehr in diesem zytotoxischen Plateau, sondern steigert die Zytotoxizität erneut deutlich auf  $17,04\% \pm 7,47\%$  SD.

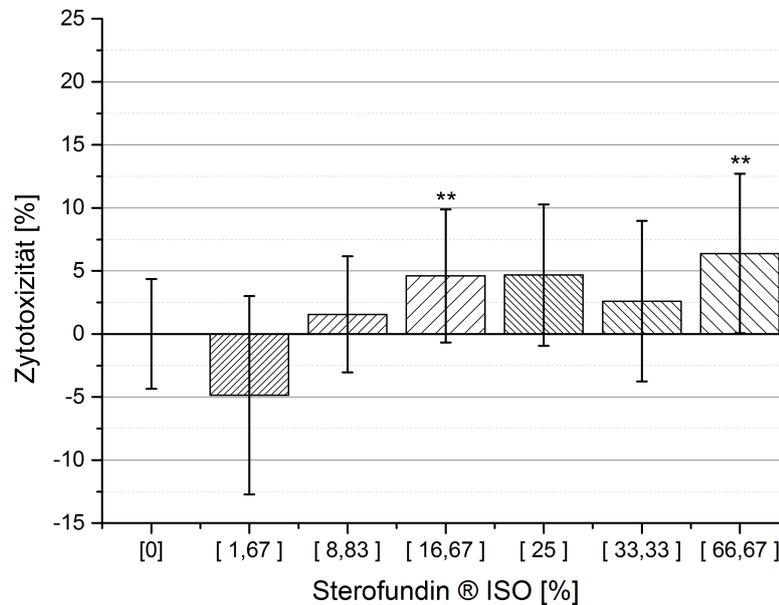
#### LDH – Test von Humanalbumin nach 24 Stunden



**Abb. 3.36:** LDH: Die Toxizität von pH – korrigiertem Humanalbumin nach 24 Stunden Inkubation auf HK-2 Zellen (MW  $\pm$  SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

Abbildung 3.36 zeigt die nach 24 Stunden Inkubation mit Humanalbumin gemessene Zytotoxizität. Dabei fällt auf, dass die im Viabilitätsassay protektive Dosis von 0,08% Humanalbumin eine statistisch signifikante Zytotoxizität von  $3,00\% \pm 5,54$  SD besitzt. Alle weiteren höher dosierten Versuchslösungen zeigen vergleichbare statistisch hoch signifikante Zytotoxizität. Diese liegt für 0,42% Humanalbumin bei  $10,02\% \pm 5,74\%$  SD, für 0,83% Humanalbumin bei  $10,38\% \pm 4,30\%$  SD, für 1,25% Humanalbumin bei  $9,61\% \pm 4,85\%$  SD, für 1,67% Humanalbumin bei  $10,19\% \pm 6,26\%$  SD und für 3,33% Humanalbumin bei  $10,55\% \pm 5,33\%$  SD.

LDH – Test von Sterofundin® ISO nach 24 Stunden



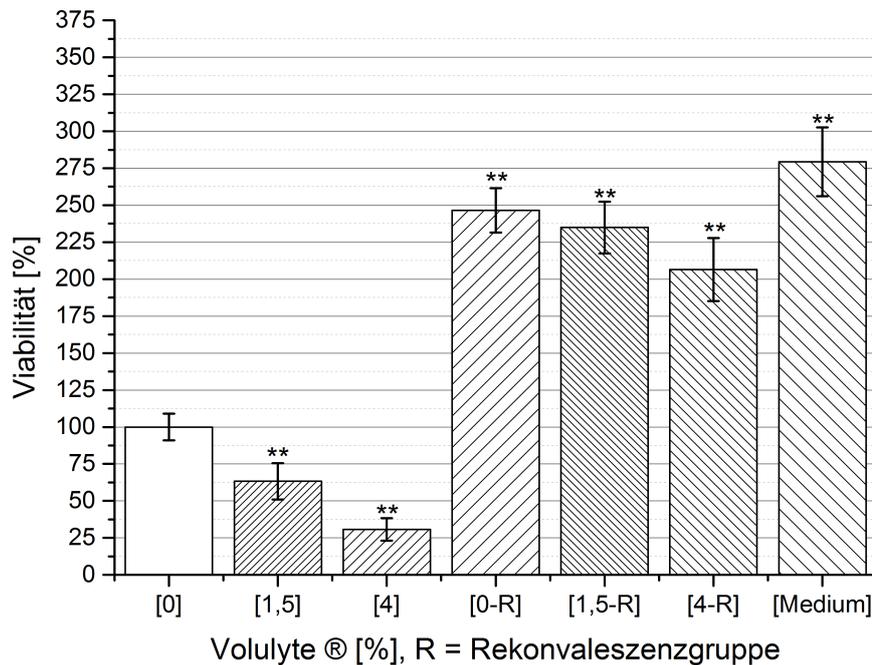
**Abb. 3.37:** LDH: Die Toxizität von pH – korrigiertem Sterofundin® ISO nach 24 Stunden Inkubation auf HK-2 Zellen (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu 0%, n = 48 – 32)

Abbildung 3.37 zeigt die nach 24 Stunden Inkubation mit Sterofundin® ISO gemessene Zytotoxizität. Dieses unterscheidet sich größtenteils nicht von der 0% – Referenzlösung. Die Zytotoxizität von 1,67% Sterofundin® ISO war im negativen Bereich von  $-4,86 \pm 7,86$  SD, während sich 8,83% Sterofundin® ISO bei  $1,56 \pm 4,61$  SD befand. Auch die Versuchslösungen mit 25% Sterofundin® ISO ( $4,67 \pm 5,60$  SD) und 33,33% Sterofundin® ISO ( $2,60 \pm 6,37$  SD) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Referenzlösung. Die Versuchslösung 16,67% Sterofundin® ISO zeigte eine statistisch hoch signifikante Zytotoxizität von  $4,60 \pm 5,27$  SD, ebenso wie 66,67% Sterofundin® ISO mit  $6,38 \pm 6,33$  SD.

### 3.8 Untersuchung der potentiellen Reversibilität der HES – Wirkung auf die Zellviabilität

In Anbetracht des nur geringen zytotoxischen Effekts von HES auf die HK – 2 Zellen bei gleichzeitig ausgeprägter funktioneller Beeinträchtigung, trat die Frage in den Vordergrund, inwiefern die Zellen sich vom HES – Effekt erholen können. Deshalb wurde – wie in Abschnitt 2.4.4 auf Seite 46 beschrieben – geprüft, ob sich Zellen von einer Inkubation mit HES funktionell regenerieren können. Dafür wurde eine Gruppe nach dem fünften Tag des Wachstums mit 0% – Kontrollösung, 1,5% Volulyte<sup>®</sup> oder 4% Volulyte<sup>®</sup> behandelt, während alle anderen Zellen weiterhin reines Zellmedium erhielten. Am 7. Tag nach der Aussaat erhielten wiederum die zuvor mit HES behandelten Zellen für 21 Stunden reines Zellmedium. Dieser Schritt sollte den Zellen die Möglichkeit geben, sich vom Einfluss des applizierten HES zu erholen. Zeitgleich erhielten andere Zellgruppen, die wie üblich für 7 Tage Medium erhalten hatten, nun 0%, 1,5% Volulyte oder 4% Volulyte<sup>®</sup>.

### 3 Ergebnisse

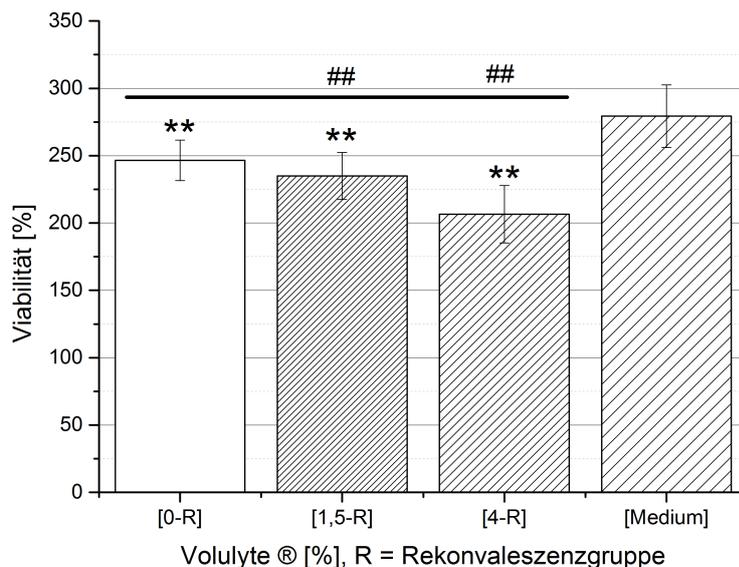


**Abb. 3.38:** EZ4U: Wirkung verschiedener HES-Lösungen auf die Zellviabilität von HK-2 Zellen. Volulyte® mit und ohne Präinkubation nach 21 Stunden, R = Tag 5 – 7 vor Versuchsstart Inkubation mit 0%, 1,5% und 4% Volulyte® mit anschließender 21 stündiger Inkubation mit Medium. 0%, 1,5% und 4% erhielten bis zum 7.Tag Medium, dann für 21 Stunden die angegebenen Versuchslösungen. Die Gruppe „Medium“ erhielt über den gesamten Zeitraum Zellmedium (MW ± SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu 0%,  $n = 48 - 32$ )

Abbildung 3.38 zeigt die Viabilität der Zellen der Rekonvaleszenz – Gruppe (= nach dem 5.Tag HES, am 7.Tag für 21 Stunden Medium zur Regeneration) im Vergleich zur wie im Vorversuch behandelten Gruppe (7 Tage Wachstum, 21 Stunden Inkubation). Dabei zeigt sich, dass die als 0 – R, 1,5 – R und 4 – R bezeichneten Rekonvaleszenz – Gruppen die Viabilität im Vergleich zur 0% – Referenzgruppe erhöhen. Dabei steigt die gemessene Viabilität statistisch hoch signifikant von 0 – R auf  $246,45\% \pm 15,01\%$  SD, von 1,5 – R  $234,90\% \pm 17,48\%$  SD und von 4 – R  $206,53\% \pm 21,35\%$  SD („%“ – Angaben richten sich nach der Viabilität der 0% – Referenzgruppe ohne Rekonvaleszenz). Beim Vergleich der Werte miteinander (0 – R = 100%) fällt der Unterschied geringer aus mit einer um 4,69% geringen Viabilität durch 1,5 – R und um 12,08% geringeren durch 4 – R. Demgegenüber sinkt die Zellviabilität statistisch hoch signifikant unter 1,5% Volulyte® auf  $63,28\% \pm 12,35\%$  SD und unter 4% Volulyte® auf

### 3 Ergebnisse

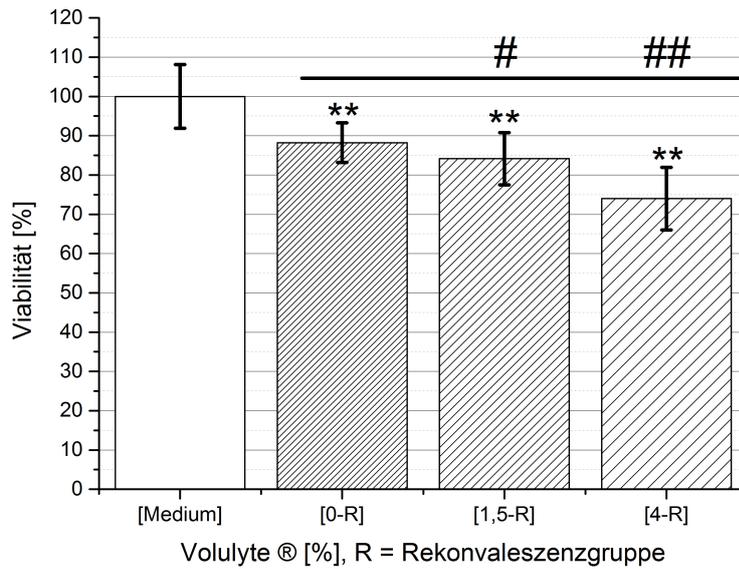
30,75% ± 7,62% SD. Die höchste Viabilität findet sich bei den Zellen, die über den gesamten Zeitraum mit Zellmedium inkubiert wurden (279,30% ± 23,26% SD). Da aus dieser Darstellung der Versuchsergebnisse nicht unmittelbar ersichtlich wurde, ob ein statistisch fassbarer Effekt der vorhergehenden Inkubation mit Volulyte® vorliegt, wurden die Rekonvaleszenz – Gruppen in Abbildung 3.39 herausgegriffen und statistisch mit einander verglichen.



**Abb. 3.39:** EZ4U: Volulyte® mit Präinkubation nach 21 Stunden, R = Tag 5 – 7 vor Versuchsstart Inkubation mit 0%, 1,5% und 4% Volulyte® mit anschließender 21 stündiger Inkubation mit Medium. Die Gruppe „Medium“ erhielt über den gesamten Zeitraum Medium (MW ± SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu Medium, ## =  $p < 0,001$  zu 0% – R,  $n = 48 - 32$ )

In Abbildung 3.39 ist zu sehen, dass alle drei Rekonvaleszenzgruppen im Vergleich zu den Zellen, die über den gesamten Versuchszeitraum reines Zellmedium erhalten hatten, eine statistisch hochsignifikant geringere Viabilität aufweisen. So ist die gemessene Viabilität nach Inkubation mit 1,5% Volulyte® um 11,55% und nach 4% Volulyte® um 39,95% statistisch hochsignifikant niedriger als die der 0% – Rekonvaleszenzgruppe. Im Vergleich zur Gruppe, die ausschließlich reines Zellmedium erhalten hatte, reduziert sich die Viabilität ebenfalls statistisch hochsignifikant (1,5% Volulyte® um 44,41%, 4% Volulyte® um 72,77%). Die Vorinkubation mit dem HES – Präparat Volulyte® beeinträchtigt somit auch nach einer Rekonvaleszenzphase die Zellviabilität.

### 3 Ergebnisse



**Abb. 3.40:** EZ4U: Volulyte<sup>®</sup> mit Präinkubation nach 21 Stunden mit Medium als Kontrolle / (=100% Viabilität), R = Tag 5 – 7 vor Versuchsstart Inkubation mit 0%, 1,5% und 4% Volulyte<sup>®</sup> mit anschließender 21 stündiger Inkubation mit Medium. Die Gruppe „Medium“ erhielt über den gesamten Zeitraum Medium (MW ± SD, \*\* = p < 0,001 zu Medium, ## = p < 0,001 zu 0% – R, n = 48 – 32)

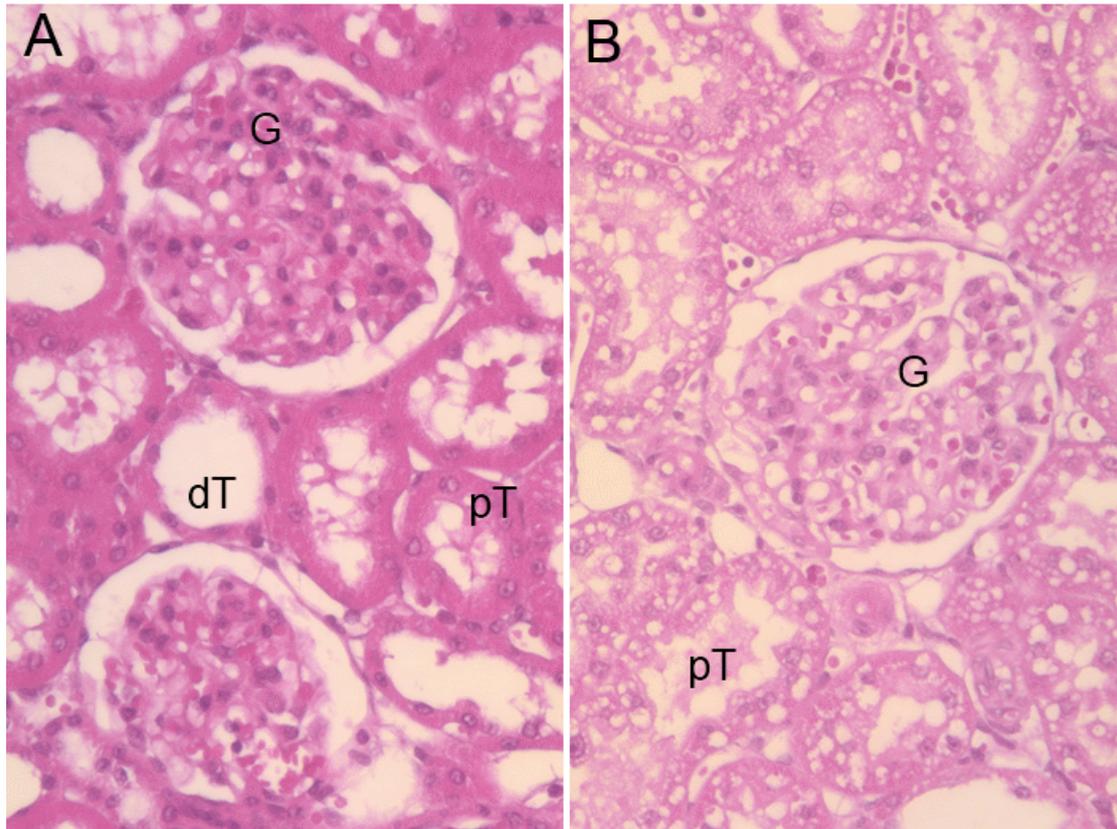
In Abbildung 3.40 fällt auf, dass alle drei Rekonvaleszenzgruppen im Vergleich zu den Zellen, die über den gesamten Versuchszeitraum reines Zellmedium erhalten hatten, eine statistisch hochsignifikant geringere Viabilität aufweisen. So ist die gemessene Viabilität nach Inkubation mit 1,5% Volulyte<sup>®</sup> um 4,09% statistisch signifikant und nach 4% Volulyte<sup>®</sup> um 14,24% statistisch hochsignifikant niedriger als die der 0% – Rekonvaleszenzgruppe. Im Vergleich zur Gruppe, die ausschließlich reines Zellmedium erhalten hatte, reduziert sich die Viabilität ebenfalls statistisch hochsignifikant (1,5% Volulyte<sup>®</sup> um 15,86%, 4% Volulyte<sup>®</sup> um 26,01%). Die Vorinkubation mit dem HES – Präparat Volulyte<sup>®</sup> beeinträchtigt somit auch nach einer Rekonvaleszenzphase die Zellviabilität.

## 4 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Dissertation waren die Beobachtungen von Schick et. al., dass bei der CLP – induzierten Sepsis der Ratte vesikuläre Einschlüsse in proximalen Tubuluszellen sichtbar wurden. Diese gingen bei Gelatine und HES mit deutlich ansteigenden Nierenschädigungsparametern einher [Schick et al., 2010]. Der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit liegt dabei bei der Hydroxyethylstärke, weil diese das in Deutschland zu Beginn der Dissertation am meisten eingesetzte Kolloid war. In den aktuellen großen klinischen Studien spielen die potentiellen nephrotoxischen Nebenwirkungen von HES eine herausragende Rolle [Perner et al., 2012] [Myburgh et al., 2012]. Aus diesem Grund wurde das in dieser Arbeit gezeigte *in – vitro* – Modell etabliert. In diesem Modell wurden grundsätzliche Aspekte zur Interaktion zwischen HES und anderen Kolloiden mit proximalen Tubuluszellen untersucht.

### 4.1 Inkorporation von HES in die proximale Tubulusepithelzelle

Die erste wichtige Frage war, inwiefern die von Schick et al. nach HES – Gabe beobachteten intrazellulären Vesikel im proximalen Tubulus der Ratte [Schick et al., 2010] einer intrazellulären Aufnahme von HES durch proximale Tubulusepithelzellen entsprechen und inwiefern diese im *in – vitro* – Modell reproduzierbar sind. Das Verteilungsmuster des mit APTS markierten HES in die HK – 2 Zellen, dargestellt in Abbildung 3.1 auf Seite 57, zeigt ein vergleichbares Bild wie die histopathologischen Bilder von Schick et al [Schick et al., 2010] [Neuhaus et al., 2012]. Die Abbildung 4.1 B zeigt das histopathologische Bild der septischen Rattenniere, die mit 6 % HES 130 / 0,4 behandelt wurde. Die mit 0,9% NaCl behandelte Niere ist in Abbildung 4.1 A dargestellt.



**Abb. 4.1:** Histopathologische Bilder der septischen Rattenniere in der HE – Färbung . (A) mit 0,9% NaCl behandelte Ratte, (B) mit 6% HES 130 / 0,4 behandelte Ratte (G = Glomerulus, pT = proximaler Tubulus, dT = distaler Tubulus), aus [Schick et al., 2010] <sup>1</sup>

Da die Verteilung der Vesikel im histopathologischen Bild dem Fluoreszenzbild des APTS – markierten HES stark ähnelt, liegt die Vermutung nahe, dass HES in proximale renale Tubulusepithelzellen *in vitro* gelangt. Inwiefern dabei aktive Aufnahmeformen des proximalen Tubulus eine Rolle spielen, ist unklar. Da außerdem diesem *in vitro* – Modell der HK – 2 Zellen keine Differenzierung zwischen luminaler (zum Primärharn gerichteter Seite) und basolateraler (zum Blut gerichteter Seite) Membran konstruiert wurde, bleibt die Frage offen, von welcher Seite HES vorrangig in die Zelle gelangt. Dies ist insbesondere für den Umstand relevant, dass für gewöhnlich angenommen wird, dass HES > 70 kDa nicht glomerulär filtriert werde [Jungheinrich and Neff, 2005]. Unklar blieb zu diesem Zeitpunkt auch, ob die gesehenen Vesikel eine harmlose Begleiterscheinung im Sinne der „osmotischen Nephrose“ darstellten (= histologische Veränderungen der proximalen Tubuli nach Gabe von Kolloiden, siehe Abschnitt 4.3.1)

<sup>1</sup>Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Schick

oder negative Auswirkungen auf die diese aufnehmenden proximalen Tubulusepithelzellen bewirkten.

## 4.2 HES schädigt die Zellen nicht durch Induktion von Inflammation

Durch die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (siehe oben) und durch die großen klinischen Studien (z.B. VISEP-Studie, [Brunkhorst et al., 2008]) wurde zunächst vermutet, dass die inflammatorische Stimulation ursächlich für die durch HES ausgelöste Einschränkung der Nierenfunktion sei.

Bevor auf die Interaktion zwischen HES, Inflammation und HK-2 Zellen eingegangen werden kann, soll in diesem Abschnitt zunächst diskutiert werden, ob die in dieser Arbeit ausgewählten Methoden grundsätzlich geeignet sind, um eine inflammatorische Reaktion der Zelle hervorzurufen.

### 4.2.1 Die verwendeten Marker sind geeignet für die Erfassung einer inflammatorischen Stimulation

In dieser Arbeit wurden zwei Marker für die Untersuchung einer möglichen proinflammatorischen Induktion der proximalen Tubulusepithelzellen durch HES untersucht. Im Folgenden wird kurz dargelegt, aus welchem Grund ICAM – 1 und CCL – 2 verwendet worden sind. ICAM – 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, auch bekannt als CD54, Cluster of Differentiation 54) und CCL – 2 (Chemokine (C – C motif) ligand 2, auch bekannt als MCP – 1, monocyte chemoattractant protein – 1) spielen eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen Zellmigration und –aktivierung. Aus diesem Grund werden beide häufig für HK – 2 Zellen als Biomarker für Inflammation genutzt [Lee et al., 2006]. So konnten zum Beispiel Hsieh et al. 2012 demonstrieren, dass CCL – 2 eine entscheidende Rolle bei renalen Entzündungsprozessen spielt, indem es Monozyten anzieht und aktiviert [Hsieh et al., 2012].

**ICAM-1:** ICAM – 1 gehört zur Superfamilie der Immunoglobuline. Es handelt sich um ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche, das bestimmte Integrine bindet und so die Diapedese von Leukozyten in inflammatorisches Milieu ermöglicht. Dieses Protein ist auch an nephrotoxischen Vorgängen beteiligt und in HK – 2 Zellen vorhanden [Morishita et al., 2011]. Bei Koninkubation von HK – 2 Zellen mit Monozyten wird ICAM –

1 hochreguliert und führt über den NFκB – Pathway zum fibrotischen Umbau der Nierenzellen [Li et al., 2011]. Auch die Inkubation mit dem nephrotoxischen Gentamycin folgt diesem Schädigungsweg [Park et al., 2010]. ICAM – 1 stellt somit ein Schlüsselprotein bei Prozessen dar, die die HK – 2 Zellen schädigen. Im Tiermodell zeigte sich, dass ICAM – 1 bei mit LPS stimulierten Ratten hochreguliert wurde. Es handelt sich außerdem um ein Schlüsselprotein beim LPS – induzierten akuten Nierenversagen [Wu et al., 2007].

**CCL – 2:** CCL–2 ist ebenfalls ein Protein, das bei Inflammation verstärkt exprimiert wird. Im Maus – Modell reagiert die Niere mit massiv gesteigerter Expression von CCL – 2 bei Glomerulonephritis [Lloyd et al., 1997]. Entsprechend reagieren HK – 2 Zellen nach Inkubation mit Lipopolysacchariden [Wang et al., 2011]. CCL – 2 wird als ein wichtiges Schlüsselchemokin bei der Schädigung der HK – 2 Zellen angesehen [Wang and Sanders, 2007]. Besonders gut erforscht ist die Interaktion zwischen HK – 2 Zellen und der CCL – 2 Expression für Leichtketten – Erkrankungen. So ist beschrieben, dass HK – 2 diese über den Megalin bzw. Cubilin – Rezeptor endozytiert und diese dort zunächst einen Anstieg von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verursachen. Dies führt zu einer verstärkten Oxidation und Aktivierung einer Redox – sensitiven Tyrosinkinase (cSRC), die ihrerseits die Expression von CCL – 2 induziert [Basnayake et al., 2010].

Aus diesen Gründen sind ICAM – 1 und CCL – 2 als Parameter zur Beurteilung einer proinflammatorischen Reaktion der Zelle geeignet.

#### 4.2.2 Die verwendeten Zytokine sind geeignet für die Induktion einer inflammatorischen Reaktion einer HK – 2 Zelle

Zur Induktion einer Inflammation der HK – 2 Zellen im EZ4U wurden der Mediator TNFα und das Endotoxin LPS verwendet.

**LPS:** LPS selbst ist ein Oberflächenantigen auf gramnegativen Bakterien. Es reguliert über verschiedene Kaskaden (z.B. NFκB11) in humanen Zellen die TNFα – Expression. LPS stellt bei der gramnegativen Sepsis ein Schlüsselantigen dar. Die in dieser Arbeit verwendeten HK – 2 Zellen gelten als LPS – sensibel [Li et al., 2005]. Dabei ruft LPS über verschiedene Mechanismen eine starke Immunreaktion hervor, die wiederum zu Organschäden wie dem akuten Nierenversagen führen kann. Zager et al. konnten

zeigen, dass Nieren nach Konfrontation mit LPS damit beginnen, massiv gesteigert TNF $\alpha$  zu produzieren [Zager et al., 2006].

**TNF $\alpha$ :** TNF $\alpha$  gilt als ein Schlüsselzytokin sowohl der akuten als auch der chronischen Niereninflammation. Damit spielt es eine zentrale Rolle im akuten Nierenversagen [Lieberthal et al., 1998] [Ramesh and Reeves, 2002]. Dabei sollte nochmals darauf hingewiesen werden, dass TNF $\alpha$  nicht nur eine Reaktion der Nierenzellen, sondern auch selbstständig ein starker Induktor renaler Inflammation ist (vgl. [Ramseyer and Garvin, 2013] und [Eddy, 2005]).

Aus diesen Gründen sind LPS und TNF $\alpha$  für die EZ4U – Versuche verwendet worden. Für die Expressionsanalyse in der qRT – RT – PCR wurde nur TNF $\alpha$  verwendet.

#### 4.2.3 Im EZ4U ist der Einfluss der Inflammation nicht messbar

Weder die Inkubation mit TNF $\alpha$  (dargestellt in Abbildung 3.2) noch die mit LPS (dargestellt in Abbildung 3.3) konnte eine dem HES vergleichbare Reduktion der Zellviabilität erreichen. Zusammenfassend waren die Folgen einer Inkubation mit TNF $\alpha$  und LPS äußerst inhomogen. Während beispielsweise 100 ng / ml LPS die Zellviabilität statistisch hochsignifikant um 5,42% ( $\pm$  5,98% SD) reduzieren, erhöhen 1000 ng / ml LPS diese um 4,28% ( $\pm$  4,84 % SD). Obwohl beide Gruppen sich statistisch hochsignifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, fällt auch die nahezu gleich hohen Standardabweichung auf. Das kann bedeuten, dass – vor allem bei Vergleich mit den aussagekräftigen Ergebnisse von HES – kein relevanter Einfluss auf die Zellviabilität vorliegt. Zusätzlich fällt auf, dass die Wirkung von 1,5% Voluven<sup>®</sup> weder durch 10 ng / ml TNF $\alpha$  noch in einem deutlichen Ausmaß durch 100 ng / ml LPS verstärkt wird. So finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen 1,5% Voluven<sup>®</sup> alleine und 1,5% Voluven<sup>®</sup> mit 10 ng / ml TNF $\alpha$ , während 1,5% Voluven<sup>®</sup> mit 100 ng / ml LPS im Vergleich sogar eine leichte statistisch signifikante abmildernde Wirkung zeigt.

Diese Ergebnisse über den Einfluss proinflammatorischer Substanzen auf die Zellviabilität lassen wenigstens zwei Schlussfolgerungen zu. Einerseits scheint die durch HES hervorgerufene Viabilitätsreduktion nicht durch einen primär inflammatorischen Mechanismus verursacht. Andererseits könnten HK – 2 Zellen durch ihre Modifizierung und Immortalisierung unsensibel für proinflammatorische Zytokine geworden sein. Dem

widerspricht, dass HK – 2 Zellen in der Forschung häufig für Inflammationsmodelle verwendet (z.B. [Bae et al., 2013]) werden und in unserem Modell die Inflammationsmarker ICAM – 1 und CCL – 2 durch TNF $\alpha$  verstärkt exprimiert werden.

#### **4.2.4 HK – 2 Zellen können in der qRT – RT – PCR erfolgreich inflammatorisch induziert werden**

Nachdem im EZ4U – Versuch keine aussagekräftige Viabilitätsreduktion der HK – 2 Zellen auf eine proinflammatorische Stimulation hervorgerufen werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Zelle auf mRNA – Ebene mit der verstärkten oder verminderten Expression inflammatorischer Marker reagiert. Wie in Abschnitt 3.2.2 auf Seite 61 durch die Abbildung 3.5 gezeigt wird, reagieren die HK – 2 Zellen nach Gabe von 100 ng / ml TNF $\alpha$  deutlich. So wird sowohl ICAM – 1 statistisch hoch signifikant auf das 2,27 –fache, als sogar noch deutlicher CCL – 2 auf das 8,9 –fache gesteigert exprimiert.

HK – 2 Zellen reagieren auf das applizierte TNF $\alpha$  und sind damit nicht unsensibel gegenüber inflammatorischer Stimulation.

#### **4.2.5 HK – 2 Zellen reagieren in der qRT – RT – PCR auf die Inkubation mit HES nicht mit Hochregulation inflammatorischer Marker**

HES gilt als in der Sepsis besonders gefährlich für die Nierenfunktion [Brunkhorst et al., 2008]. Es läge also nahe, dass HES auf die Zelle einwirkt und selbst eine proinflammatorische Stimulation hervorruft. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die Inkubation der HK –2 Zellen mit 4% Voluven<sup>®</sup> zu einer verstärkten Expression der inflammatorischen mRNA für ICAM – 1 und CCL – 2 führt. Das in Abbildung 3.5 auf Seite 63 dargestellte Ergebnis für ICAM – 1 zeigt gegenüber der Referenzlösung keine statistisch signifikante Abweichung. Ebenso wenig findet sich eine statistisch relevante Veränderung für CCL – 2. Wie Abbildung 3.6 auf Seite 64 zeigt, gibt es nach 21 Stunden Inkubation sogar einen leichten antiinflammatorischen Effekt. Letzteres bestätigt die Ergebnisse von Wittlinger et al., die ebenfalls an HK – 2 Zellen nach Voluven<sup>®</sup> – Gabe einen antiinflammatorischen Effekt des HES im Sinne einer Minderung der CCL – 2 Expression auf Proteinebene beobachteten [Wittlinger et al., 2010].

Die Gabe von HES führt nicht zu einer Hochregulation inflammatorischer Marker. Hinweise auf in der Literatur berichtete antiinflammatorische Effekte finden sich nur für CCL – 2 nach 21 Stunden. Diese sind nicht statistisch signifikant.

#### 4.2.6 Die negativen Auswirkungen von HES auf proximale Tubulusepithelzellen *in vitro* sind nicht durch Inflammation zu erklären

Aus diesen Gründen erscheint ein auf Induktion von Inflammation beruhender Mechanismus als Erklärung für die durch HES beobachteten Auswirkungen unwahrscheinlich. Aus der Zusammenschau dieser Ergebnisse ergibt sich, dass der Abfall der Viabilität nicht durch eine inflammatorische Wirkung durch HES erklärt werden kann. Bis zu diesem Punkt war wegen klinischer Daten aus der Sepsis – Forschung davon ausgegangen worden, dass die Inflammation eine wesentliche Rolle bei der durch die HES–Gabe ausgelösten Nierenschädigung führe [Brunkhorst et al., 2008]. In den hier demonstrierten Versuchen wurden die negativen Auswirkungen der HES – Applikation aber durch die zusätzliche Gabe der proinflammatorischen Substanzen nicht verstärkt.

Aus diesen Gründen wurden die weiteren Versuche ohne zusätzliche Gabe inflammatorischer Substanzen durchgeführt.

### 4.3 HES schädigt die proximale Tubulusepithelzelle *in vitro*

Im folgenden Abschnitt wird in einem Exkurs der Begriff der „osmotischen Nephrose“ näher erläutert. Anschließend wird die aktuelle Studienlage und Lehrbuchmeinung zur Pathogenität dargelegt.

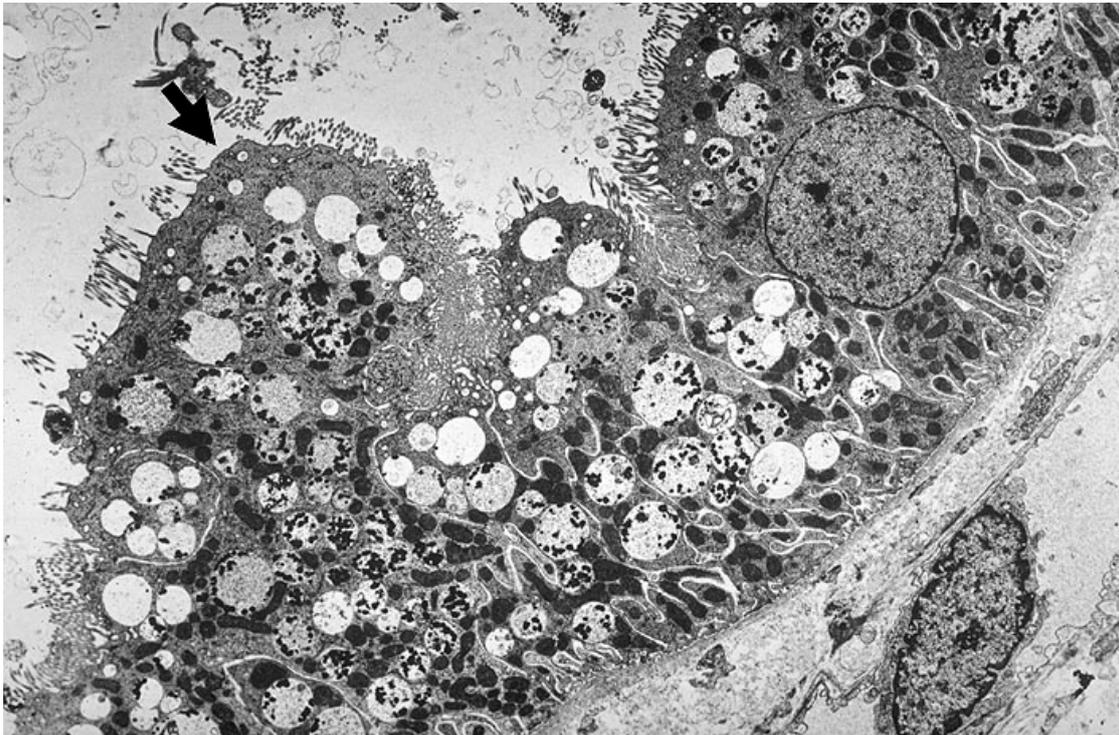
#### 4.3.1 Exkurs: Osmotische Nephrose

In diesem Zusammenhang sollte zunächst der Begriff der „osmotischen Nephrose“ erläutert werden. Dieser wurde 1951 durch A. C. Allen eingeführt und beschreibt die histologischen Veränderungen in den proximalen Tubuli der mit Kolloiden behandelten Patienten [Allen, 1951]. Parallel dazu prägte H. U. Zollinger seit 1948 den Begriff der „Zuckerspeicherniere“ [Zollinger and Rohr, 1966]. Über die praktische Relevanz dieses Phänomen wurde vor allem in den 60er Jahren lebhaft diskutiert. So schrieb Zollinger 1966:

„Die (...) Strukturveränderung der Nierenhauptstücke scheint in der Regel funktionell keine vitale Bedeutung zu haben.“  
aus [Zollinger and Rohr, 1966]

#### 4 Diskussion

Eine zeitgenössische Arbeit von Sarre et al. von 1963 kam zu dem Ergebnis, dass die beobachtete osmotische Nephrose eine Nierenveränderung sei, die keine Niereninsuffizienz per se zur Folge habe. Es sei unklar, ob diese überhaupt *in vivo* stattfände oder nur ein postmortales Phänomen darstelle [Sarre, 1963].



**Abb. 4.2:** Elektronenmikroskopisches Bild einer Schockniere mit osmotischer Nephrose<sup>2</sup>.

Abbildung 4.2 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Schockniere mit osmotischer Nephrose. Deutlich erkennbar ist proximales Tubulusepithel mit fein vakuolärer Umwandlung. Die Vakuolen enthalten z.T. ein stark osmiophiles Material, wie es nach Infusion verschiedener Infusionslösungen gefunden wird. Der Pfeil zeigt die Rarefizierung des Mikrovilli – Saums.

Die osmotische Nephrose wurde international in den 90er Jahren wieder thematisiert als Legendre et al. 1992 im Lancet publizierten, dass vermehrt osmotische Nephrosen bei transplantierten Nieren auftraten. Legendre war aufgefallen, dass mit der Einführung von Hydroxyethylstärke in Frankreich seit Mitte des Jahres 1991 diese plötzlich

<sup>2</sup>Mit freundlicher Genehmigung von Frau Professor Glatz, Pathologisches Institut des Universitätsspitals Bern

#### 4 Diskussion

gesteigert auftraten. Die retrospektive Analyse ergab, dass die transplantierten Nieren vor der Einführung von HES in 14% der Fälle osmotische Nephrosen aufwiesen, während die Prävalenz nach der Einführung von HES bei 80% lag. Interessanterweise war das Auftreten dieser Auffälligkeiten unabhängig von Faktoren wie der kalten Ischämiezeit des Transplantats oder dem Einsatz von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A. In den biopsischen Kontrollen der Transplantatnieren der HES – Gruppe konnte auch nach drei Monaten die osmotische Nephrose („osmotic – like lesions“) nachgewiesen werden. Außerdem beobachtete Legendre eine deutlich schlechtere Funktion der Nieren in HES – Gruppe, da 7 von 31 Nieren ihre Funktion einstellten, während dies in der Vergleichsgruppe nur für 1 von 32 Nieren zutraf [Legendre et al., 1993]. Vier Jahre später publizierten Bernard et al. ebenfalls im Lancet eine ähnliche Untersuchung, die die Beobachtungen von Legendre aber nicht bestätigen konnten [Bernard et al., 1996]. Eine weitere französische Arbeitsgruppe um Cittanova publizierte ebenfalls 1996 im Lancet eine prospektive Studie zu diesem Thema. Cittanova et al. randomisierten dabei das Behandlungsregime von hirntoten Spendern in zwei Gruppen. Eine Gruppe erhielt eine Gelatine – HES Mischung, während die andere ausschließlich Gelatine als Plasmaexpander erhielt. Als HES wurde Elohes<sup>®</sup> (6% HES 200 / 0,62) eingesetzt. Nach erfolgreicher Transplantation wurde die Funktion der Transplantatnieren bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die HES – Gelatine Gruppe eine signifikant schlechtere Nierenfunktion (Kreatinin im Serum und Notwendigkeit einer Hämodialyse) aufwies als die reine Gelatine – Gruppe [Cittanova et al., 1996]. 2008 untersuchte eine weitere französische Arbeitsgruppe in diesem Kontext den Unterschied zwischen der Applikation von 6% HES 130 / 0,4 und 6% HES 200 / 0,6 auf die Funktion von Spendernieren. Blasco et al. beobachteten dabei, dass das HES der 3. Generation, nämlich 6% HES 130 / 0,4 im Vergleich günstigere Auswirkungen auf die Nierenfunktion hatte [Blasco et al., 2008].

Im Tiermodell verglichen Hüter et al. die Auswirkungen von 6% HES 130 / 0,42 und 10% HES 200 / 0,5 mit der von Ringer – Laktat anhand eines isolierten Schweinenieren – Perfusionsmodells. Dabei zeigten sich bei allen drei Gruppen – inklusive der Ringer – Laktat Gruppe – Vakuolen im renalen tubulären Epithel. Daneben trat eine histologisch sichtbare renale interstitielle Proliferation mit Infiltration von Makrophagen und tubuläre Schädigungen in den HES – Gruppen auf. Im Vergleich zwischen 6% HES 130 traten diese aber unter 10% HES 200 vermehrt auf. Insgesamt zeigte HES einen deutlichen proinflammatorischen Effekt. Interessant dabei war, dass auch die Ringer – Laktat Gruppe so genannte „osmotic like lesions“ zeigte, die aber kein Korrelat bei

den gemessenen Nierenschädigungsparametern hatte [Hüter et al., 2009].

In dieser Dissertation wurde nicht untersucht, was eine Koinkubation von Makrophagen und proximalen Tubuluszellen unter Zugabe von HES bewirkt. Entsprechend konnte nicht untersucht werden, ob die intrazelluläre Aufnahme von HES durch HK – 2 Zellen zu einer Aktivierung von Makrophagen führt oder umgekehrt.

#### 4.3.2 Die aktuelle Lehrmeinung

Aktuelle Lehrbücher beurteilen die osmotische Nephrose, die „früher als renale Toxizität fehlinterpretiert worden“ sei, mehr als eine „passagere [sic] Zellschwellung, die als harmloses Epiphänomen auftritt und ohne pathologische Bedeutung ist“ (nach [Thiel and Roewer, 2009]). Die unter HES 450 / 0,7 und HES 200 / 0,62 aufgetretenen Nierenschäden seien auf ein anderes Phänomen zurückzuführen. Dabei seien diese HES – Präparate im Gegensatz zu den neueren HES – Präparaten (e.g. HES 130 / 0,4) schwerer abbaubar. Bei Dehydratation des Patienten könne HES 450 / 0,7 und HES 200 / 0,62 die Urinviskosität erhöhen. Bei unzureichender Volumengabe könne ein Hyperviskositätssyndrom folgen, das die Nierenperfusion einschränke [Karow, 2013]. Dass HES eine direkte Wirkung auf die Funktionalität der Nierenzellen im Allgemeinen und des proximalen Tubulus im Besonderen haben könnte, findet keine Beachtung.

Zusammenfassend betrachtet wirkt die Studienlage zur Pathogenität der osmotischen Nephrose widersprüchlich.

#### 4.3.3 Der EZ4U – Test ist geeignet für die Viabilitätsbestimmung von HK – 2 Zellen nach Inkubation mit HES

Zur Klärung der Frage, ob der in dieser Arbeit verwendete EZ4U – Test zur Untersuchung der Viabilität von HK – 2 Zellen nach Inkubation mit HES geeignet ist, mussten zwei Aspekte untersucht werden.

**Erstens**, ob HES selbst mit dem Substrat des EZ4U – Tests, dem Tetrazoliumsalz (siehe Abbildung 2.4 auf Seite 43), interagiert. Wäre dies der Fall, könnte ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Zellviabilität nur daher rühren, dass bei höherem HES – Anteil in der Folge mehr Farbstoff umgesetzt werden kann, obwohl die Viabilität der Zellen vergleichbar ist. Wie in Abbildung 3.7 auf Seite 68 demonstriert, unterscheidet sich die gemessene Extinktion im Photometer nicht zwischen 1% HES und 4% HES. Insgesamt bewegt sich die in zellosern Wells gemessene Extinktion im Bereich der sonst vom Messwert subtrahierten „Blank“ – Reihe. Auch die reine Applikation von 0,9% NaCl und unverdünntem 6% Voluven zeigte keinen Unterschied in der Extinktion.

Appliziertes HES reagiert also nicht mit dem Reaktant des EZ4U – Versuches.

**Zweitens** sollte umgekehrt das Produkt, das umgesetzte Formazan, nicht durch HES auf irgendeine Art gebunden und damit vermindert messbar sein. Denn wäre dies der Fall, so könnte eine konzentrationsabhängigen Abnahme der Extinktion resultieren, ohne dass eine funktionelle Beeinträchtigung der Zellen vorläge. Je mehr HES in der Versuchslösung vorhanden wäre, desto mehr XTT – Farbstoff wäre gebunden und könnte nicht mehr enzymatisch umgesetzt werden. Das würde in der Folge bedeuten, dass es sich bei der gemessenen und vermeintlich niedrigen Viabilität bei Applikation höher konzentrierter HES – Lösungen um einen Artefakt handeln würde. Wie Abbildung 3.8 auf Seite 70 darlegt, ist ein solches Phänomen nicht nachweisbar. Die gemessene Extinktion höher dosierter HES – Lösungen ist nicht höher als die niedrig- oder HES – freier Lösungen. Die im Versuch untersuchten Zellen waren selbst nie mit HES in Kontakt gekommen (siehe 2.4.4 auf Seite 44). Entsprechend unterschied sich die Viabilität nicht. Das nachträglich zugefügte HES interagiert nicht mit dem Produkt der EZ4U – Reaktion.

Zusammenfassend bestätigen diese Versuche, dass der EZ4U – Test geeignet ist, um die Auswirkungen von HES – Lösungen auf die Viabilität von HK – 2 Zellen zu beurteilen.

#### **4.3.4 HES beeinträchtigt die Zellviabilität proximaler Tubulusepithelzellen *in vitro***

Nachdem untersucht worden war, dass der EZ4U geeignet für die Viabilitätsprüfung ist und die Inflammation keine entscheidende Rolle spielt, konnte damit begonnen werden, verschiedene Infusionslösungen an isolierten proximalen Tubuluszellen *in vitro* zu überprüfen. Der erste Versuch dazu ist in Abbildung 3.10 auf Seite 73 dargestellt worden. In diesem zeigte sich, dass das HES – Präparat Voluven<sup>®</sup> ab einer Konzentration von 0,5 % die Zellviabilität im Vergleich zur 0,9% NaCl – Lösung hochsignifikant reduzierte. Dabei korrelierte Viabilitätsverlust der Zellen direkt mit steigender HES – Dosis. Die Dosisabhängigkeit könnte durch eine gesteigerte HES – Aufnahme durch die Zellen bedingt sein, da diese ebenfalls abhängig von der applizierten HES – Dosis ist (vgl. [Sirtl et al., 1999]). Unter 2% Voluven<sup>®</sup> halbierte sich die Viabilität und unter 4% Voluven<sup>®</sup> fiel diese auf ein Viertel der Referenzlösung. Dabei ist zu beachten, dass auch die NaCl – Lösung mitnichten inert war. Im Vergleich zum reinen Zellmedium sank die Zellviabilität unter NaCl bereits auf etwa ein Drittel ab. Hier spielte möglicherweise aber auch das reduzierte Nährstoffangebot der Zelle eine Rolle.

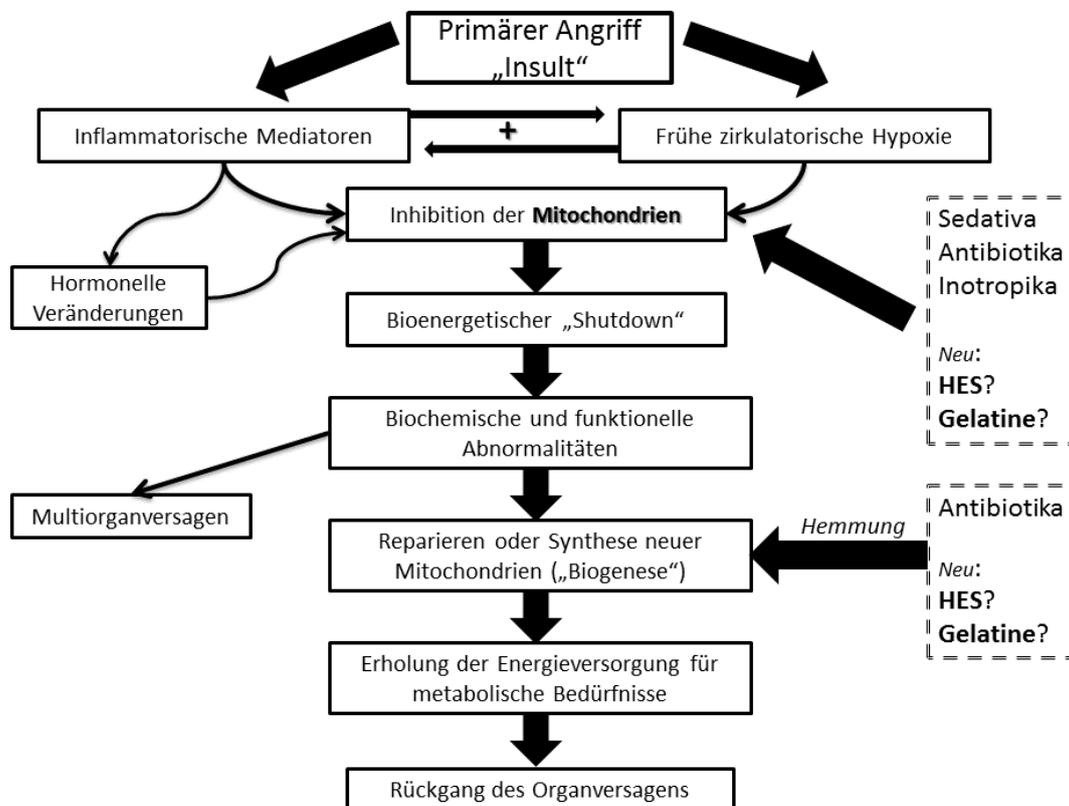
Es folgte die Analyse der anderen Infusionslösungen, Gelafundin<sup>®</sup>, Humanalbumin (beide werden in den Abschnitten 4.8.1 auf Seite 154 und 4.8.2 auf Seite 158 näher diskutiert) und Sterofundin<sup>®</sup> ISO. Dabei fiel auf, dass auch die im Tierversuch von Schick et al. als deutlich weniger nierenschädigende kristalloide Lösung die Viabilität in einem ähnlichen Maß wie unter Voluven<sup>®</sup> reduzierte (siehe 3.13 auf Seite 76) [Schick et al., 2010]. Dadurch entstand die Frage, ob der Versuchsaufbau trotz der Eignung des EZ4U – Tests einen grundsätzlichen methodischen Fehler enthielt. Infolgedessen wurden die pH – Werte der Versuchslösungen überprüft. Dabei zeigte sich, dass Sterofundin<sup>®</sup> ISO mit steigendem Anteil an der Versuchslösung immer azidotischer wurde (siehe Tabelle 3.1 auf Seite 78). Am ehesten im physiologischen Bereich lag 4% Voluven<sup>®</sup> mit einem pH – Wert von 7,49. Demgegenüber wies die äquivalente Dosis von 66,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO einen pH – Wert von 5,31 auf. Die Ergebnisse dieser pH – Messung wiesen zwar darauf hin, dass die Viabilitätsreduktion unter Sterofundin<sup>®</sup> ISO ein Artefakt durch den pH – Wert war, während dieser beim Voluven<sup>®</sup> vermutlich keine Rolle spielte. Beweisend für diese Annahme aber waren die darauf folgenden Versuche. In diesen wurde der pH – Wert der Versuchslösungen vor Kontakt mit der HK – 2 Zelle auf einen für humane Zellen physiologischen Bereich von  $7,4 \pm 0,5$  eingestellt (siehe 2.1.1 auf Seite 34).

Die Versuche mit pH – korrigiertem Voluven<sup>®</sup> dargestellt in Abbildung 3.15 auf Seite 80, entsprachen dem ohne pH – Korrektur. Wieder reduzierte Voluven<sup>®</sup> mit steigender Dosis die Viabilität, so dass diese unter 2% Voluven<sup>®</sup> halbiert und unter 4% Voluven<sup>®</sup> auf etwa ein Viertel abgesunken war. Ganz anders stellte sich demgegenüber der Versuch mit pH – korrigiertem Sterofundin<sup>®</sup> ISO dar. Wie Abbildung 3.18 auf Seite 84 zeigt, findet sich nur unter 66,67% eine statistisch von der Referenzlösung in negativem Sinne abweichende Viabilitätsmessung. Dabei weicht diese allerdings nur um  $8,33\% \pm 7,67\%$  SD ab. Die niedrigeren Konzentrationen von 16,67% und 25% Sterofundin<sup>®</sup> ISO zeigen hingegen eine protektive Wirkung.

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass HES – Lösungen *in vitro* die Viabilität dosisabhängig reduzieren, während die kristalloide Lösung größtenteils kaum negative Auswirkungen hat. Dabei sollte nicht vergessen werden, dass es sich bei den verwendeten HK – 2 Zellen um immortalisierte und damit sehr robuste Zellen handelt.

### 4.3.5 Die mitochondriale Funktion nimmt beim kritisch Kranken eine Schlüsselrolle ein

An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass der EZ4U die mitochondriale Leistungsfähigkeit der Zellen bestimmt. Dies ist deshalb beim Einsatz von HES von herausragender Bedeutung, weil die mitochondriale Funktion beim kritisch Kranken eine Schlüsselrolle einnimmt [Brealey et al., 2002] [Brealey et al., 2004] [Huebinger et al., 2010] [Boulos et al., 2003]. Exzellent dargestellt ist dieser Mechanismus in der Abbildung „Hypothesis Explaining the Pathophysiology of Multiple Organ Failure Following Infection and Other Inflammatory Insults“ in [Singer and Glynne, 2005]. Diese ist in Abbildung 4.3 in einer durch den Autoren dieser Arbeit modifizierten Form wiedergegeben.



**Abb. 4.3:** Schema über die Rolle der Mitochondrien beim Multiorganversagen. Neu hinzugefügt die Hypothese über die mögliche Rolle der Gabe von HES und Gelatine beim kritisch kranken Patienten. Modifiziertes und ergänztes Modell nach [Singer and Glynne, 2005].

Bei Singer und Glynne finden sich dazu folgende Ausführung:

„Over a billion years ago, a bacterium containing the oxygen-consuming respiratory chain is likely to have invaded the early eukaryotic cell. Most of the bacterial genetic information was subsequently transferred to the nucleus, transforming these bacterial symbionts into “slave” mitochondrial organelles. This provided a far more efficient system for using available energy sources and also protected the cell against the potentially toxic effects of oxygen. More than 90% of total body oxygen consumption is used to generate adenosine triphosphate (ATP) by the mitochondrial electron transport chain, and this, in turn, provides more than 90% of the body’s power, the remainder coming from glycolysis. An attractive hypothesis to explain the pathophysiology of multiple organ failure following infection and other inflammatory insults is a mitochondrial shutdown leading to “energy failure” and a consequent inability to drive the various metabolic processes that maintain normal cellular functioning.“ aus [Singer and Glynn, 2005].

Das Ziel bei der Behandlung eines Patient mit „kritischer Krankheit“ als gemeinsamer Endstrecke vieler Ursachen sollte sein, die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien so wenig wie möglich zusätzlich zu gefährden („second hit“, „primun non nocere“, siehe unten). Folge der Schädigung und Blockade der mitochondrialen Funktion ist das Multiorganversagen. Der EZ4U reflektiert die mitochondriale Leistungsfähigkeit. HES senkt diese – wie demonstriert – *in vitro* ab.

#### **4.3.6 Die Koinkubation von HES mit Humanalbumin oder Gelafundin® hat keinen Einfluss auf die HES – Wirkung**

Geprüft wurde auch die Frage, ob der bei Inkubation mit HES beobachtete Effekt auf die Viabilität bei Koinkubation mit den anderen untersuchten Kolloiden Humanalbumin und Gelafundin® verändert wird. Dieser Versuch ist dargestellt in Abbildung 3.19 auf Seite 86. Dafür wurde eine Konzentration von 1% Voluven® ausgewählt, die alleine wie im Vorversuch die Viabilität um  $25,11\% \pm 7,58\%$  SD senkte. Außerdem wurde für Humanalbumin eine Konzentration von 0,5% herausgegriffen, die die Viabilität hoch signifikant auf  $112,49\% \pm 9,57\%$  SD steigerte. Für 0,33 % Gelafundin® wurde eine mit  $100,09\% \pm 8,72\%$  SD im Vergleich zur 0% – Referenzlösung inerte Konzentration gewählt. Wurde 1% Voluven® mit dem protektiven 0,5% Humanalbumin kombiniert, so lag die Zellviabilität um 1,34% höher als nach alleiniger Inkubation mit 1% Voluven®. Wurde 1% Voluven® hingegen 0,33% Gelafundin® hinzugefügt, so reduzierte sich die Zellviabilität statisch hoch signifikant um weitere 8,16%.

Zusammengefasst kann die Zugabe einer alleine nicht schädlichen Dosis Gelafundin® die durch HES verursachte Beeinträchtigung der Zellviabilität weiter senken, auch wenn dieser Effekt gering ausgeprägt ist. Diese *in — vitro* – Ergebnisse passen zu den von Cittanova et al. beobachteten verschlechterten Nierentransplantatfunktionen nach kombinierter HES – Gelatine – Gabe im Vergleich zur reinen Gelatine – Gabe [Cittanova et al., 1996]. Möglicherweise handelt es sich dabei nicht nur um additive, sondern synergistische Phänomene. Die Zugabe von Humanalbumin kann die HES – Wirkung zwar nicht abmildern, aggraviert diese aber auch nicht.

### **4.4 Die funktionelle Beeinträchtigung der Nierenzellen *in vitro* ist ein gemeinsamer Effekt aller HES – Präparate**

Im Folgenden soll zunächst diskutiert werden, ob es sich bei den beobachteten Beeinträchtigungen der Zellviabilität um eine direkte HES – Wirkung handelt oder ob andere in der Versuchslösung enthaltene Elemente entscheidend sind.

#### **4.4.1 Die verwendeten HES–Konzentrationen sind klinisch relevant**

Wie bereits in der Methodik dargelegt, liegt die Konzentration von Hydroxyethylstärke im Plasma bei gesunden Probanden nach Infusion von 500 ml 6% HES 130 / 0,4 bei bis zu 0,37% [Jungheinrich and Neff, 2005]. Dokumentierte Fälle, bei denen zum Beispiel im Rahmen einer atonischen Nachblutung<sup>3</sup> 120 ml / kg Körpergewicht appliziert wurden, weisen darauf hin, dass bei der täglichen Praxis in schweren Fällen perioperativ häufig deutlich höhere Mengen an Kolloiden infundiert werden können [Suzuki et al., 2010]. Es ist außerdem zu erwarten, dass sich die Plasmakonzentration von HES beim kritisch Kranken zusätzlich dadurch erhöhen könnte, dass durch Blutung oder eine andersartige Verteilungsstörung das zirkulierende effektive intravasale Volumen im Vergleich zum Gesunden erniedrigt ist. Die von Jungheinrich et al. publizierten Daten beziehen sich damit auf Patienten mit normalen Blutvolumen [Jungheinrich and Neff, 2005]. Dies bedeutet, dass kritisch Kranke bei der gleichen Menge an infundiertem HES in vielen Fällen eine höhere Plasmakonzentration aufweisen könnten. Einschränkend muss erwähnt werden, dass es nach wie vor unklar ist, ob die HES–Moleküle und deren Pathogenität von basolateraler Seite oder luminaler Seite an die proximalen

---

<sup>3</sup>Die Uterusatonie (= atonische Nachblutung) tritt auf, wenn sich postpartal der Uterus nicht kontrahiert, d.h. keinen adäquaten Tonus aufweist. Dies kann zu starken Blutungen aus dem Uterus führen. Die Uterusatonie zählt zu den häufigsten Ursachen mütterlicher Mortalität.

Tubulusepithelzellen gelangen.

#### 4.4.2 Auswirkungen des pH – Werts und der Osmolalität auf den HES – Effekt

Bei der Untersuchung, ob das HES – Molekül ausschlaggebend für den beobachteten Viabilitätsabfall ist, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass es sich nicht um durch den pH – Wert oder durch die Osmolalität bedingte Phänomene handelte.

#### Der pH – Wert ist nicht ausschlaggebend für die Beeinträchtigung der Zellviabilität unter HES

In der Einleitung wurde in Abschnitt 1.2.6 auf Seite 8 ausführlich darauf eingegangen, dass kristalloide Infusionslösungen aus galenischen Gründen im azidotischen pH – Bereich liegen. *In vivo* wird dieses Problem durch die Zugabe metabolisierbarer Anionen (e.g. Malat, Azetat oder Laktat) ausgeglichen. Im in dieser Arbeit genutzten *in – vitro* – Modell entfällt dieser Schritt. Das applizierte Sterofundin® ISO enthält Malat und Azetat und ist azidotisch. Der pH – Wert sinkt in den Versuchen ab einer Konzentration von 16,67% Sterofundin® ISO auf 7,21 und 5,31 unter 66,67% Sterofundin® ISO ab (siehe Tabelle 3.1 auf Seite 78). Wie der Versuch mit nicht pH – korrigiertem Sterofundin® ISO auf Seite 76 im Vergleich mit pH – korrigiertem auf Seite 84 zeigt, reagiert die Zellviabilität der HK – 2 sehr empfindlich auf Schwankungen des pH – Wertes. Die Vermutung, dass auch die bei nicht pH – korrigiertem Voluven® beobachtete Beeinträchtigung der Zellen auf eine solche Ursache zurückzuführen ist, erscheint aus mehreren Gründen als unwahrscheinlich. Erstens hat die im EZ4U mit Abstand schädlichste Konzentration von 4% Voluven® einen pH – Wert von 7,49. Darunter erfolgt eine Reduktion der Viabilität um 76,1% auf  $23,91\% \pm 6,38\% \text{ SD}$ . Eine Sterofundin® ISO – Lösung von 8,83% hat denselben pH und senkt die Viabilität nur um  $13,87\% \pm 9,64\%$ . Zweitens verliert pH – korrigiertes Sterofundin® ISO seine schädliche Wirkung, während pH – korrigiertes Voluven® seine dosisabhängige Beeinträchtigung beibehält.

Zusammenfassend zeigen die Versuche dieser Arbeit, dass der pH – Wert zwar sehr wichtig für die Zellviabilität ist, beim HES – Effekt allerdings keine Rolle spielt.

### **Die Osmolalität ist nicht ausschlaggebend für die Beeinträchtigung der Zellviabilität unter HES**

Wie bereits im Exkurs zur „Osmotischen Nephrose“ in Abschnitt 4.3.1 auf Seite 121 angesprochen, halten einige Autoren die Hyperosmolalität der HES – Lösung gegenüber den Zellen als ursächlich für den durch HES bedingten Zellschaden. Dieser These nach handle es sich bei den Versuchslösungen um hyperosmolare Lösungen, deren Makromoleküle – in diesem Fall also HES – zur osmotischen Verschiebung von Flüssigkeit zwischen intra- und extrazellulärem Raum führen. Über diesen Mechanismus käme es bei Aufnahme von HES in die Zelle entweder zur Zellschwellung durch Osmose („osmotische Nephrose“) mit konsekutivem Zellschaden, oder aber – bei Unpassierbarkeit von HES durch die Zellmembran – zur „Austrocknung“ der Zellen. Wie im APTS – Versuch (siehe 3.1 auf Seite 56) gezeigt werden konnte, gelangt HES in die Zelle hinein. Tabelle 3.2 auf Seite 79 zeigt, dass eine Maximaldosis von 4% Voluven<sup>®</sup> mit einer Osmolalität von 303 mosmol / kg nur sehr knapp über der als physiologisch angesehenen Osmolalität des Plasmas von 280 – 300 mosmol / kg liegt. Zwar liegen die anderen untersuchten Versuchslösungen etwas niedriger, die ausschließlich Medium enthaltende Lösung mit der höchsten Viabilität liegt mit einer Osmolalität von 314 mosmol / l aber deutlich höher.

Zusammenfassend zeigen die Osmolalitätsmessungen, dass die erhöhte Osmolalität nicht ursächlich für den HES – Effekt ist.

### **4.4.3 Die Trägerlösung hat keine relevante Auswirkung auf den HES – Effekt**

Es wird oft darauf hingewiesen, dass HES – Präparate in der Vergangenheit einer kontinuierlichen Entwicklung und Verbesserung unterlegen sind. Die letzte relevante Modifikation bestand darin, HES nicht in 0,9% – NaCl zu lösen, sondern vielmehr eine balancierte Vollelektrolytlösung zu nutzen. Diese Neuerung erhöhe die Sicherheit des Präparates noch einmal deutlich [Base et al., 2011]. In dieser Arbeit wurden sowohl Voluven<sup>®</sup> und Volulyte<sup>®</sup> als auch Venofundin<sup>®</sup> und Tetraspan<sup>®</sup> im EZ4U eingesetzt. Der Versuch 3.4.1 auf Seite 87 zeigt in Abbildung 3.20 die Viabilitätswerte nach 21 Stunden Inkubation mit Volulyte<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup> im Vergleich. Beide zeigen eine dosisabhängige Beeinträchtigung der Viabilität. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich nur für 2% und 4% HES. Beide zeigten aber einen minimal weniger schädlichen Einfluss des Voluven<sup>®</sup> gegenüber des leicht stärker beeinträchtigenden Volulyte. Dabei ist zu beachten, dass die Differenz der 2% – Lösungen nur 8,99% und die der 4% –

Lösungen nur 3,16% betrug. Der Versuch 3.4.2 auf Seite 89 zeigt in Abbildung 3.21 die Viabilitätswerte nach 21 Stunden Inkubation mit Tetraspan® (Balanciertes HES 130 / 0,42) im Vergleich mit Venofundin® (NaCl 0,9% – basiertes HES 130 / 0,42). Ein statistisch signifikanter Unterschied findet sich nur für 0,5% HES. Sonst zeigen beide dieselbe dosisabhängige Reduktion der Viabilität. Dabei beginnt Venofundin® bereits bei 0,5% HES mit der statistisch hochsignifikanten Viabilitätsreduktion, während Tetraspan® diese erst ab 1% HES aufweist.

*In vitro* besteht also kein Unterschied zwischen den beiden Trägerlösungen. In den beiden höchsten Konzentrationen findet sich eher ein schwacher Trend zu Ungunsten des „neueren“ balancierten Volulyte®. Wie bereits in Abschnitt 4.4.2 auf Seite 130 erwähnt, fehlt diesem *in vitro* – Modell allerdings wieder die Metabolisierung der in der balancierten Lösung enthaltenen Anionen. Dies hat zur Folge, dass der *in vivo* postulierte Hauptvorteil einer balancierten Lösung, nämlich die Pufferung des pH – Werts des Blutes, *in vitro* nicht reproduziert werden konnte.

#### 4.4.4 Die *in vivo* wichtige Rolle des Chloridanteils kann *in vitro* nicht untersucht werden

Ein anderer *in vivo* für die Niere sehr wichtiger Aspekt ist der Chlorid–Anteil im HES. Dieser ist in den 0,9% NaCl basierten Lösungen höher als in den vollbalancierten Lösungen. Yunos et al. verglichen in ihrer Fall–Kontroll–Studie bei Intensivpatienten die Auswirkungen eines hohen Chlorid–Anteils verschiedener Infusionslösungen (0,9% NaCl, 4% Gelatine oder 4% Humanalbumin) an 760 Patienten im Vergleich zum Einsatz „physiologischerer“ Infusionslösungen (Ringer Laktat nach Hartmann, eine balancierte Vollelektrolytlösung (Plasma–Lyte 148) und chlorid–reduziertes 20% Humanalbumin.) bei 773 Patienten. Dabei zeigte sich, dass sich bei Reduktion des Chlorid–Anteils die Inzidenz von akuter Nierenschädigung und die Notwendigkeit für den Einsatz von Nierenersatzverfahren signifikant sank [Yunos et al., 2012]. Ein möglicher Mechanismus für die Nierenschädigung durch den hohen Chloridanteil kann dabei die durch dieses ausgelöste Vasokonstriktion sein [Wilcox, 1983]. Beide hier zitierten Arbeiten untersuchen zwar keinen Unterschied bei HES – Lösungen, da der Effekt aber unabhängig vom zugesetzten Kolloid war, ist zu vermuten, dass der z.B. in Voluven® enthaltene Chloridanteil *in vivo* die Niere zusätzlich schädigt. *In vivo* mag Volulyte® also einen Vorteil gegenüber Voluven® haben, der im Zellmodell nicht abgebildet werden kann. Beide Versuchslösungen wurden vor Applikation pH – korrigiert. Die Fragestellung hinsichtlich einer möglichen Überlegenheit einer der beiden Trägerlösungen kann in diesem *in* –

*vitro* – Modell nicht beantwortet werden. Die Ausgangsfrage dieses Versuches lautete allerdings vielmehr, ob es sich bei den bisher beobachteten negativen Auswirkungen bei der Inkubation mit HES – Lösungen um einen HES – Effekt handelt oder um einen Begleiteffekt durch eine potentiell zellschädliche NaCl – Trägerlösung. Diese Frage kann eindeutig dahingehend beantwortet werden, dass im EZ4U zumindest kein relevanter Unterschied zwischen beiden Trägerlösungen besteht. Um den Einfluss der Trägerlösung gänzlich zu reduzieren, war außerdem HES getrocknet und in reinem Zellmedium gelöst worden. Der mit dieser HES – Lösung durchgeführte Versuch ist dargestellt in Abbildung 3.22 auf Seite 90. Dieser zeigt dieselbe dosisabhängige Beeinträchtigung der Viabilität der Zellen wie die Versuche mit 0,9% NaCl oder balancierter Trägerlösung. Aus diesem Grund bleibt zur Erklärung des beobachteten Viabilitätsabfalls unter HES im EZ4U die Vermutung, dass die HES – Moleküle selbst ursächlich sind.

#### **4.4.5 Der Ursprung des HES – Präparates hat keine relevante Auswirkung auf den HES – Effekt**

Durch die Schlussfolgerung des vorangehenden Abschnitts gerät das HES – Molekül selbst in den Vordergrund. Dabei ist wichtig zu beachten, dass es sich bei HES nicht um ein immer gleich aufgebautes Molekül handelt, sondern um eine heterogene Gruppe von Stärkederivaten. Eine der Kernfragen dieser Arbeit lautet, inwiefern die Ergebnisse eines bestimmten HES – Präparates auf andere anders aufgebaute HES – Moleküle übertragen werden kann.

Begonnen wurde mit der Frage, ob der Ursprung der Stärkemoleküle selbst (siehe auch die Übersicht 1.2.7 auf Seite 21) von Relevanz ist. Inwiefern Untersuchungsergebnisse von aus Mais hergestelltem HES auf das aus Kartoffeln gewonnene HES übertragen werden kann, ist auch in der Literatur umstritten. In der Tat finden sich zahlreiche pharmazeutische Unterschiede zwischen beiden Präparaten. Eine Übersicht darüber findet sich in Tabelle 4.1 auf Seite 134

**Tabelle 4.1:** Physiochemikalische Unterschiede zwischen Voluven<sup>®</sup> und Venofundin<sup>®</sup>

	<b>Voluven<sup>®</sup></b>	<b>Venofundin<sup>®</sup></b>
<i>Ursprung:</i>	Maisstärke	Kartoffelstärke
<i>Molekulargewicht:</i>	130 kDa	130 kDa
<i>Substitutionsgrad:</i>	0,4 (0,41)	0,42 (0,45 – 0,46)
<i>C2 / C6 – Ratio:</i>	9 : 1	6,4 : 1
<i>Amylopektin – Anteil:</i>	90%	75%
<i>Amylose–Anteil:</i>	2%	25%
<i>Freies Phosphat:</i>	0	34 – 84 ppm
<i>Gesamt Phosphat:</i>	15 ppm	205 – 290 ppm

(nach [Westphal et al., 2009])

Entsprechend haben Sommermeyer et al. darauf hingewiesen, dass beide Präparate in ihrer chemischen Struktur durchaus unterschiedlich und nicht zwingend gleichwertig sind [Sommermeyer et al., 2007]. Dass diese Fragestellung nicht von rein akademischer Natur ist, zeigt die Reaktion von FreseniusKabi auf die Publikation der 6 – S Studie von Perner et al. [Perner et al., 2012]. FreseniusKabi drohte damit, die Autoren der Studie juristisch zu belangen, weil diese im Titel ihrer Studie zunächst HES 130 / 0,4 (z.B. Voluven<sup>®</sup>, Mais) angegeben hatten. Tatsächlich war in der Studie aber das von BBraun Melsungen hergestellte HES 130 / 0,42 (Tetraspan<sup>®</sup>, Kartoffel) verwendet worden. Die tatsächliche praktische Relevanz dieser physiochemikalischen Unterschiede ist unklar. Beispielsweise zeigten Jamnicki et al. *in vitro* eine unterschiedlich ausgeprägte Beeinträchtigung der Blutgerinnung [Jamnicki et al., 1998], während Matsota et al. bei der Untersuchung derselben Lösungen keine Unterschiede feststellen konnten [Matsota et al., 2010]. Auch im Hinblick auf die Pharmakokinetik ergeben sich Unterschiede. So zeigen Untersuchungen an gesunden Freiwilligen von Lehmann et al., dass „die AUC (24) (area under the concentration – Zeitkurve, vom Start der Infusion über 24 Stunden),  $t(1/2)$  (= Eliminationshalbwertzeit) und CL (= total apparent clearance) zwischen Voluven<sup>®</sup> – also 6% HES 130 / 0,4 mit 9 : 1 – und Venofundin<sup>®</sup> – 6% HES 130 / 0,42 mit 6 : 1 – sich unterschieden“. Dabei zeigte Venofundin<sup>®</sup> die schnellste Clearance aus dem Organismus [Lehmann et al., 2007a]. Hinsichtlich der Beeinträchtigung der Viabilität der proximalen Tubulusepithelzellen *in vitro* hat diese Arbeit auf vergleichbarer Trägerlösung basierende HES – Lösungen verglichen, mit je einem aus Mais und je einem aus Kartoffeln gewonnenen Präparat.

Dabei unterschied sich die im EZ4U gemessene Viabilität zwischen Venofundin® (Kartoffel) und Voluven® (Mais) statistisch hoch signifikant (siehe 3.23 auf Seite 91) in der Form, dass sich Venofundin® ab einer Konzentration von 1% HES als schädlicher erwies. Betrachtet man aber das Ergebnis des in Abbildung 3.24 auf Seite 93 Vergleiches der beiden balancierten Lösungen Volulyte® (Mais) und Tetraspan® (Kartoffel), verschwindet die Bedeutung dieses statistisch signifikanten Unterschieds.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Trägerlösung selbst kein entscheidendes Element für die Beeinträchtigung der Zellviabilität darstellt, zeigt dieser Versuch, dass beide HES – Präparate hinsichtlich ihrer Wirkung auf die proximale Tubulusepithelzelle vergleichbar sind.

#### **4.4.6 Die Größe des HES – Moleküls hat keine relevante Auswirkung auf den HES – Effekt**

Nachdem untersucht worden war, dass der Ursprung des HES – Moleküls keinen Einfluss auf dessen Wirkung auf die Zellviabilität hat, rückte die Größe des HES – Moleküls in den Fokus der Arbeit.

Wie in der Einleitung angesprochen (siehe Abschnitt 1.2.7 auf Seite 21), gibt es verschiedene HES – Generationen, die sich in ihrer molekularen Größe unterscheiden. Die pharmazeutische Industrie versucht seit der Einführung von HES in den 70er Jahren stetig, das Ausmaß der Nebenwirkungen zu reduzieren und die Plasmahalbwertszeit zu erhöhen. HES 130 / 0,4 gilt dabei als deutlich nebenwirkungsärmer als sein Vorgänger, das HES 200 / 0,5 [Lehmann et al., 2007b] und sicherer [Blasco et al., 2008]. Außerdem soll die 3. Generation im direkten Vergleich zur 2. Generation zu signifikant weniger Blutverlust bei größeren Operationen führen [Kozek-Langenecker et al., 2008]. Insgesamt sei die 3. Generation deutlich sicherer und nebenwirkungsärmer als ihre Vorgänger [Van Der Linden et al., 2013]. So schrieben Langeron et al. bei der Markteinführung von Voluven®, dieses sei der Vorgängergeneration von 200 kDa großem Pentastarch in der Wirkung gleichwertig und hinsichtlich der Nebenwirkungen überlegen [Langeron et al., 2001]. Die Gleichwertigkeit als „Plasmaersatz“ bestätigten auch andere Autoren (z.B. [Kasper et al., 2003]). Hinsichtlich der renalen Komplikationen, die im Fokus dieser Arbeit stehen, gaben beispielsweise Mizzi et al. an, dass Voluven® im Gegensatz zu frühen HES – Generationen bedenkenlos bei nierengeschädigten Patienten eingesetzt werden könne [Mizzi et al., 2011]. Westphal et al. kritisieren, dass ältere Studien über nierenschädigende Nebenwirkungen älterer HES – Generationen nicht auf neuere HES – Produkte übertragen werden sollte [Westphal et al., 2009]. Trotzdem finden

sich genauso Publikationen, die keinen Unterschied in der Sicherheit zwischen HES – Produkten erkennen können [Groeneveld et al., 2011].

#### **Zusammenhang zwischen Masse und Pathogenität der Fraktionen**

**Im EZ4U mit fraktioniertem Voluven<sup>®</sup> haben die schädlichsten Fraktionen zugleich die größte Masse:** Im zuerst durchgeführten EZ4U, dargestellt in Abbildung 3.25 auf Seite 95, zu dieser Fragestellung war 4% Voluven<sup>®</sup> in seine verschiedenen Fraktionen aufgeteilt worden. Dabei zeigten sich die HES – Moleküle  $> 100$  kDa und  $> 50$  kDa als deutlich schädlicher als die Fraktionen  $< 50$  kDa. Dass aus diesem Versuch allerdings nicht zwangsläufig darauf geschlossen werden kann, dass proximale Tubuluszellen *in vitro* stärker auf hoch- als niedermolekulare HES – Moleküle reagieren, zeigt die Bestimmung des relativen Anteils der einzelnen HES – Fraktionen (siehe Abbildung 3.26 auf Seite 96). Darin erweisen sich die im vorhergehenden EZ4U als am schädlichsten identifizierten Fraktionen als die anteilig zahlreichste. Anders formuliert lag die Vermutung nahe, dass die HES – Moleküle  $> 50$  kDa vor allem deshalb die Viabilität deutlich stärker senkten, weil genau diese Moleküle auch am zahlreichsten vertreten waren.

**Im EZ4U mit auf die gleiche HES – Menge konzentrierte Fraktionen gibt es einen Trend zu höherem Schaden durch hochmolekulare HES – Moleküle:** Im Folgeversuch wurden HES – Fraktionen hergestellt, die alle dieselbe Masse HES (2% Voluven<sup>®</sup>) enthielten. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.27 auf Seite 98 und 3.28 auf Seite 99 dargestellt. Darin zeigte sich erneut, dass die kleinen Fraktionen die Viabilität erheblich reduzieren. Das bedeutet, dass die niedermolekularen Fraktionen aber mitnichten inert auf die Viabilität der proximalen Tubulusepithelzellen sind. Die Differenz zwischen dem arithmetischen Mittel der HES – Fraktionen über und unter 50 kDa beträgt 16,95%. Basierend auf diesen Ergebnissen entsteht der Eindruck, dass niedermolekulares HES im Vergleich zu hochmolekularem HES die Viabilität der Zellen weniger stark beeinträchtigt. Wird aber Abbildung 3.28 in die Betrachtung miteinbezogen, die die Fraktion HES  $< 3$  kDa zeigt, relativiert sich diese Beobachtung. Zwar konnte, wie in Abschnitt 2.1.6 auf Seite 38 geschildert, die Fraktion  $< 3$  kDa nicht dialysiert und dafür nicht im selben Versuch mit den anderen 2% Fraktionen untersucht werden. Es zeigt sich aber dennoch, dass auch die kleinsten HES – Moleküle in einer Konzentration von 2% HES statisch hoch signifikant die Viabilität senken.

**Drei Einschränkungen bei der Interpretation dieser Daten:** Drei zusätzliche Einschränkungen hinsichtlich der potentiell geringen Zellviabilitätsreduktion durch niedermolekulares HES müssen an dieser Stelle erwähnt werden. **Erstens** konnte trotz sorgsamster Durchführung der aufwendigen Trocknung und Lösung des HES nicht ausgeschlossen werden, dass die fraktionierten Gruppen in Summe etwas weniger Masse gehabt haben könnten als die nicht – fraktionierte Gruppe. Ursächlich dafür könnten Verluste durch den Fraktionierungsprozess sein. **Zweitens** bildet der Versuch nur die mittel– (um 130 kDa) und niedermolekularen HES – Moleküle (< 130 kDa) ab. Die deutlich größeren HES–Moleküle der älteren HES – Generationen (450 kDa) konnten wegen der fehlenden Marktverfügbarkeit nicht untersucht werden (Ausnahme: HES 200 kDa, siehe unten). **Drittens** unterscheiden sich die HES – Generationen (70, 130 und 200 kDa, siehe unten), wie oben bereits verdeutlicht, nicht nur hinsichtlich der Molekülgröße, sondern auch in anderen Eigenschaften, wie zum Beispiel dem Substitutionsgrad. Das bedeutet, dass ein Viabilitätsunterschied nicht zwangsläufig in der Molekülgröße des Präparates, sondern auch in der Art der Substitution begründet sein könnte. Gegen einen relevanten Einfluss des Substitutionsart sprechen allerdings die in Abschnitt 4.4.5 diskutierten Versuche. Diese Einschränkung der Interpretation führten direkt zum nächsten Versuch.

**Hemohes<sup>®</sup> (200 kDa), Expafusin<sup>®</sup> (70 kDa) und Volulyte<sup>®</sup> (130 kDa) sind in ihrer Wirkung im EZ4U vergleichbar**

Dabei reduziert Hemohes<sup>®</sup> die Viabilität am stärksten und Expafusin<sup>®</sup> am geringsten. Verschiedene Autoren sehen im HES 130 / 0,4 eine durch die molekulare Modifikation derart optimierte Lösung, dass im Vergleich mit den Vorgängern deutlich weniger bis keine Einschränkung der Nierenfunktion zu befürchten sei [Blasco et al., 2008] [Westphal et al., 2009]. Wie im Abschnitt 1.2.7 auf Seite 15 dargelegt, unterscheiden sich Volulyte<sup>®</sup>, Hemohes<sup>®</sup> (200 kDa) und Expafusin<sup>®</sup> (70 kDa) in Substitutionsgrad und Molekulargewicht von einander. Im EZ4U, dessen Ergebnis in Abbildung 3.30 auf Seite 101 dargestellt ist, zeigt sich keine Überlegenheit des Volulyte<sup>®</sup>. Tatsächlich weist das niedermolekulare Expafusin<sup>®</sup>, ein Vertreter der „2. Generation“ im direkten Vergleich etwas höhere Viabilitätswerte auf. Nur Hemohes<sup>®</sup> erweist sich dabei als etwas schädlicher, in dem es verglichen mit Expafusin<sup>®</sup> die Zellviabilität zusätzlich um durchschnittlich  $9,62\% \pm 5,26\%$  SD reduziert. Die von vielen Autoren postulierte Überlegenheit des HES 130 / 0,4 kann in diesem Modell nicht nachvollzogen werden.

**Das HES der 3. Generation (HES 130 / 0,4) unterscheidet sich hinsichtlich seiner Auswirkungen auf die Zellviabilität proximaler Tubulusepithelzellen kaum von seinen Vorgängern**

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass alle Molekülgrößen dosisabhängig HK – 2 Zellen funktionell beeinträchtigen. Im *in – vitro* – Modell zeigen sich keine deutlichen Hinweise auf eine relevante Überlegenheit des nieder – und mittelmolekularen HES gegenüber des hochmolekularen HES. Viel entscheidender als die Molekülgröße ist die applizierte absolute Masse an HES. Insbesondere die Behauptung (e.g. [Mizzi et al., 2011]), durch molekulare Modifikation des HES der 3. Generation sei dieses inert hinsichtlich seiner renalen Nebenwirkung, kann nach Betrachtung der *in – vitro* – Ergebnisse nicht nachvollzogen werden. Dies stärkt die Einschätzung, dass es sich bei der *in vitro* beobachteten Einschränkung der Zellfunktion um einen von der Gesamtmenge HES abhängigen gemeinsamen Effekt aller HES–Präparate handelt.

**4.5 Der HES – Effekt ist auch über die Inkubation hinaus messbar**

Anschließend stellte sich die Frage, ob dieser unter HES beobachtete Effekt eine dauerhafte Beeinträchtigung der Nierenzellen darstellt oder ausschließlich temporärer Natur ist. In Abschnitt 3.8 auf Seite 111 konnte gezeigt werden, dass HK – 2 Zellen, die mit dem HES – Präparat Volulyte<sup>®</sup> inkubiert worden waren, auch nach 21 Stunden „Rekonvaleszenz“ eine sowohl im Vergleich zur reinen Zellmedium – Gruppe als auch zur 0% – Präinkubationsgruppe eine statistisch hoch signifikant niedrigere Viabilität aufweisen. Einschränkend sollte erwähnt werden, dass alle drei Versuchsgruppen (0% – R, 1,5% – R, 4% – R) während ihrer Wachstumsphase – also von Tag fünf bis sieben – 72,5% weniger Medium zur Verfügung hatten als die anderen Gruppen dieses Versuches. Es könnte sich somit bei dieser Differenz um eine Folge des temporären Nährstoffmangels handeln. Keine Folge dieses Nährstoffmangels hingegen kann die statistisch hochsignifikant geringere Viabilität der beiden HES – Gruppen (1,5 – R und 4 – R) sein, weil auch die 0% – R Gruppe von Tag fünf bis sieben auf 72,5% Medium verzichten musste.

Bei der nach HES – Inkubation beobachteten Reduktion der Zellviabilität *in vitro* handelt es sich also um einen auch nach Entfernung des HES nachweisbaren Effekt.

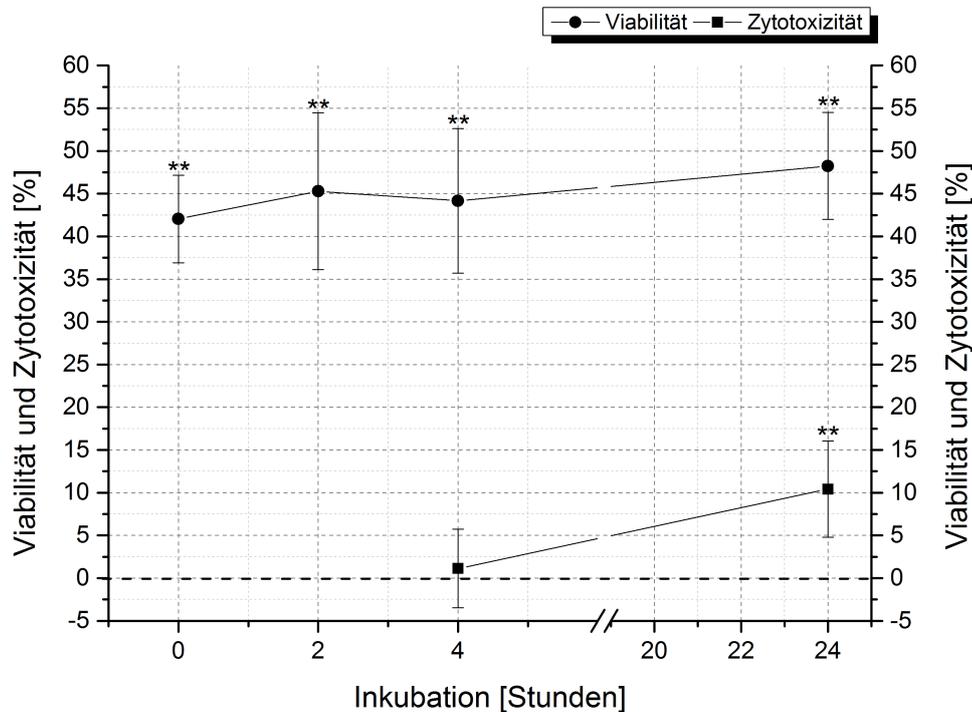
## 4.6 Der Reduktion der Zellviabilität durch HES steht vermutlich nur eine verzögerte Zytotoxizität gegenüber

In Abschnitt 3.6 auf Seite 102 zeigt Abbildung 3.31 die nach 0, 2, 4 und 21 Stunden gemessenen Viabilitätswerte für Voluven<sup>®</sup>. Überraschenderweise findet sich bei der Betrachtung der Versuchsergebnisse kein großer Unterschied hinsichtlich der Viabilitätsreduktion zwischen den verschiedenen Inkubationsdauern. Sogar bei sofortigem Beginn des EZ4U – Versuches nach Applikation des HES (entspricht der 0 Stunden Inkubation) resultiert ein dem 21 Stunden dauerndem EZ4U – Versuch ähnliches Bild. Diese dosisabhängige nahezu lineare Abnahme der Viabilität mit steigender HES – Dosis ist für alle untersuchten Inkubationsdauern vergleichbar. Bei der Interpretation sollte aber beachtet werden, dass sich die absolut gemessenen Absorptionswerte stark unterscheiden. Das heißt, dass sich jeder Versuch auf die eigene 0% – Referenzgruppe bezieht. Wiedergegeben ist die Einschränkung im Vergleich zur Behandlung mit der nicht HES – haltigen Referenzlösung. Bei der Viabilitätseinbuße der HK – 2 Zellen durch HES handelt es sich also um einen Effekt, der unmittelbar nach HES – Kontakt eintritt.

Fraglich ist die zugrunde liegende Ursache für diesen Prozess. Im darauf folgenden Versuch wurde durch einen LDH – Test untersucht, ob mit dem beobachteten Viabilitätsabfall auch ein entsprechender Zelluntergang einher geht. Die Ergebnisse des LDH – Versuches mit Volulyte<sup>®</sup> sind in Abschnitt 3.7 auf Seite 105 dargestellt. Auffällig ist, dass es nach vier Stunden Inkubation mit Volulyte<sup>®</sup> (Abbildung 3.33) durch keine Dosis zu einem statistisch signifikanten Zellschaden kommt. Nach 24 Stunden (Abbildung 3.34) hingegen zeigt sich beginnend mit 1,5% Volulyte<sup>®</sup> ein dosisabhängiger statistisch signifikanter Zellschaden. Dabei liegt der maximale Zellschaden unter der Maximaldosis von 4% Volulyte<sup>®</sup> bei  $13,57\% \pm 8,46\%$  SD. Auf der anderen Seite war die Zellviabilität unter 4% Volulyte<sup>®</sup> nach 21 Stunden auf  $20,86\% \pm 5,20\%$  SD abgefallen (siehe Abbildung 3.20 auf Seite 87). Dies bedeutet, dass der nach 21 Stunden Inkubation mit HES gemessene Reduktion der Zellviabilität im EZ4U ein geringer, aber dennoch fassbarer Zellschaden im LDH – Assay entspricht. Demgegenüber besitzt die nach 0, 2 oder vier Stunden gemessene Zellviabilitätseinschränkung im EZ4U kein messbares zytotoxisches Korrelat. Diese Beobachtung der „verzögert einsetzenden Zytotoxizität“ wird in Abbildung 4.4 veranschaulicht. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass die Ursache des Viabilitätsabfalls nicht in einer sofortigen Zerstörung der Zellmembran (im Sinne einer direkten Zytotoxizität) zu suchen ist. Letztere kann zwar nach

#### 4 Diskussion

24 Stunden Inkubation beobachtet werden, findet aber nur in vergleichsweise geringem Umfang statt. Dabei ist zu beachten, dass die im EZ4U bestimmte Viabilität Zellen widerspiegelt, die zwar in ihrer mitochondrialen Funktionsfähigkeit eingeschränkt, potentiell aber noch intakt sind, während demgegenüber im LDH – Test nur die wirklich zerstörten Zellen reflektiert werden.



**Abb. 4.4:** Übersicht über die Viabilitätswerte von 2% Voluven<sup>®</sup> und Zytotoxizitätswerte von 2% Volulyte<sup>®</sup> über die Zeit. Auf der Y-Achse sind sowohl die Viabilitätswerte also auch die Zytotoxizitätswerte in der gleichen Skalierung in [%] angegeben ( $\pm$  SD, \*\* =  $p < 0,001$  zu jeweiliger 0% – Referenzgruppe,  $n = 48 - 32$ )

Zusammenfassend zeigen die Versuche, dass HES die Viabilität sofort nach Zellkontakt reduziert. Der Zusammenhang zwischen der – auch langfristig messbaren (siehe Abschnitt 4.5 auf Seite 138) – Viabilitätseinbuße und der direkten Zytotoxizität von HES ist schwierig zu bestimmen. So ist bekannt, dass die Niere beispielsweise im Rahmen einer Hypoxie ihren Metabolismus massiv reduziert („shut-down“), um sich zu schützen [Yang et al., 2014] [Jacobs et al., 2011] [Heyman et al., 2009] [Bellomo et al., 2008]. Möglicherweise schützt dieser Mechanismus die Niere für ein gewisses Zeitfenster, in welchem die untersuchten 4 Stunden Inkubation liegen, nicht aber darüber hinaus, wie die 24 Stunden Inkubation gezeigt haben. In jedem Fall ist eine 24

Stunden andauernde Inkubation mit HES *in vitro* zytotoxisch. Ob es sich dabei um einen Nebeneffekt handelt oder um eine direkte Konsequenz, ist unklar.

## **4.7 Einordnung der Ergebnisse dieser Dissertation in den aktuellen wissenschaftlichen Diskurs**

In diesem Kapitel sollen die zuvor diskutierten Konsequenzen der Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen wissenschaftlichen Diskurs eingeordnet und mit diesem verglichen werden.

### **4.7.1 Die osmotische Nephrose durch HES geht mit einer deutlichen Einschränkung der Zellviabilität einher und ist ein Effekt, den alle HES-Präparate gemeinsam haben**

Diese Arbeit konnte zeigen, dass das synthetische Kolloid Hydroxyethylstärke *in vitro* dosisabhängig die Viabilität reduziert. Die Osmolalität der Lösung ist dabei nicht ausschlaggebend, da sich alle Lösungen im Normbereich des Plasmas bewegten. Auch der pH – Wert der Versuchslösung spielt keine Rolle, da der Effekt auch nach pH – Korrektur persistiert. Dieser Effekt ist unabhängig von der Trägerlösung und dem Ursprung des HES – Moleküls. Es zeigte sich ein marginaler, aber vorhandener Trend zur positiven Korrelation von steigender absoluter Molekülgröße und Viabilitätsreduktion. Im Ganzen betrachtet, ist die absolut applizierte Masse an HES der möglicherweise wichtigste Faktor für das Ausmaß des Zellschadens. Diese Arbeit konnte keinen relevanten Unterschied zwischen dem neuesten balancierten HES 130 / 0,4 (0,42) gegenüber den Vorgänger – Präparaten finden. Die Auswirkungen der Hydroxyethylstärke sind ein gemeinsamer Effekt aller HES – Moleküle enthaltenden Präparate. Damit konnte gezeigt werden, dass die „osmotische Nephrose“ kein rein optisches Phänomen ohne zellulärpathologisches Korrelat ist, sondern mit einer deutlich messbaren Funktionseinschränkung der mitochondrialen Kapazität der Zellen einhergeht.

### **4.7.2 Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen experimentellen Daten zu HES**

Im experimentellen Bereich gibt es sehr widersprüchliche Daten zum Vorkommen und der Relevanz nephrotoxischer Phänomene durch HES. So zeigten Ertmer et al. an septischen Schafen keinen Unterschied in der Nierenschädigung im Hinblick auf den

applizierten Typ Infusionsmittel [Ertmer et al., 2011]. Demgegenüber konnten – wie bereits erwähnt – Schick et al. zeigen, dass 6% HES 130 / 0,4 die Niere der septischen Ratten funktionell und morphologisch schädigen [Schick et al., 2010]. *In vitro* kamen Wittlinger et al. nach Viabilitätsversuchen mit HES an HK – 2 Zellen zu dem Ergebnis, dass HES 130 / 0,42 und HES 200 / 0,5 nicht zu einer verminderten Zellviabilität führten [Wittlinger et al., 2010]. Ursächlich für diesen Widerspruch kann der Umstand sein, dass Wittlinger ihre HES – Lösungen nach einem anderen Schema verdünnten, indem sie 6% HES als 100% HES – Lösung definierten. Diese 100% wurden auf 2% und 4% verdünnt. Die draus resultierende HES – Konzentration lag damit für die 2% Lösung bei 1,2 mg / ml HES und entsprechend für die 4% Lösung bei 2,4 mg / ml HES. Das in dieser Dissertation verwendete Verdünnungsschema, das in Abschnitt 2.1 auf Seite 32 ausführlich erläutert wird, definiert die „theoretische“ 100% Ausgangslösung als 1000 mg HES / ml. Dies führt dazu, dass die von Wittlinger verwendete 4% HES – Lösung einer Verdünnung von 0,24% in dieser Dissertation entspricht. In diesem Größenbereich konnte für HES 130 / 0,42 auch in dieser Arbeit eine erhöhte Viabilität gegenüber der 0% – Referenzlösung gezeigt werden (siehe Abbildung 3.23 auf Seite 91). Die von Wittlinger nicht publizierte Untersuchung einer höheren HES – Konzentration von 0,5% HES (Verdünnungsschema dieser Dissertation) bzw. 8,3% HES (Verdünnungsschema Wittlinger) hingegen wirkt bereits statistisch hoch signifikant negativ auf die Zellviabilität [Wittlinger et al., 2010].

#### 4.7.3 Vergleich dieser Ergebnisse mit klinischen Studien und Reviews

Die Menge der zu HES publizierten Studien und Reviews ist groß und undurchsichtig. Im Folgenden werden kurz die wichtigsten aktuellen Studien und Reviews präsentiert und im Anschluss das grundsätzliche Problem bei der Interpretation von HES – Studien diskutiert. Danach wird nachvollzogen, wie die Nephrotoxizität von HES in den Vordergrund der Debatte rückte und inwiefern die Ergebnisse dieser Dissertation mit denen klinischer Erfahrung übereinstimmen.

#### Qualität und Vergleichbarkeit der Studien

Die Vielzahl an publizierten Studien zu HES unterscheiden sich sowohl vom Ergebnis als auch von der methodischen Qualität. Hartog et al. warnen davor, dass HES – positive Studien, die von der pharmazeutischen Industrie maßgeblich beeinflusst wurden, zum Teil erhebliche Mängel aufweisen. Problematisch sei insbesondere, dass sich deren Schlussfolgerungen aber durch aggressive Marketingstrategien im klinischen Alltag

etablieren können [Hartog et al., 2012]. Diese Vorwürfe erfuhren auch in der populärwissenschaftlichen Presse Aufmerksamkeit durch den Umstand, dass einige Studien nicht nur methodische Mängel aufwiesen, sondern sogar gefälscht waren. So stellte sich 2010 heraus, dass einer der „Haupt-Pro-HES-Akteure“ der Diskussion, Joachim Boldt, mehrere Studien zurückziehen musste. Unter anderem im SPIEGEL erschienen umfangreiche Artikel [Hackenbroch, 2011]. Dass es sich bei J. Boldt um einen der größten Kritiker von Hartog et. al. handelte, scheint damit indirekt die gegen ihn gerichteten Vorwürfe nachträglich zu bestätigen.

Eine hervorragende Beleuchtung dieses Problemkomplexes findet sich bei Wiedermann [Wiedermann, 2014]. Dieser demonstriert an drei verschiedenen „HES“-Studien (CRYSTMAS [Guidet et al., 2012], FIRST [James et al., 2011] und einen großen Review von Boussekey et al. [Boussekey et al., 2010]) deren Limitationen durch selektive im Ergebnis verfälschende Darstellungen zugunsten von HES (selective outcome reporting bias). Wiedermann kommt, wie Hartog et al., zu dem Schluss:

„Industry sponsorship or industry affiliation of authors is associated with positive research outcomes and conclusions.“  
aus [Wiedermann, 2014]

#### **Große klinische Studien**

Nach der bereits in der Einleitung angesprochenen VISEP – Studie (= Volume Substitution and Insulin Therapy in Severe Sepsis) [Brunkhorst et al., 2008], siehe Abschnitt 1.3.1 auf Seite 26) wurden weitere internationale randomisierte klinische Studien durchgeführt. Insgesamt ist die Lage unübersichtlich und zum Teil widersprüchlich. Eine exzellente Übersicht findet sich im Review von Zarychanski et al. (siehe unten) [Zarychanski et al., 2013]. Dieser Review dient auch als Grundlage der Übersichtstabellen zu den hier aufgeführten Studien (siehe 6.4 (Seite 189), 6.5 (Seite 190) und 6.6 (Seite 191)). Dabei bestätigten sich sowohl in der 6S – Studie von Perner et al. [Perner et al., 2012] als auch in der CHEST – Studie von Myburgh [Myburgh et al., 2012] die in der VISEP – Studie gesehenen Effekte der HES-Gabe auf die Nierenfunktion.

**6S-Studie:** Dabei verglich die skandinavische Arbeitsgruppe in der 6S – Studie (= Scandinavian Starch for Severe Sepsis/Septic Shock) 6% HES 130 / 0,42 mit Ringer – Acetate. Perner et al. konnten dabei in einer randomisierten verblindeten Studie an 800 Patienten zeigen, dass unter HES eine signifikant höhere Mortalität (relatives Risiko 1,17, 95% CI, 1,01 – 1,30;  $p = 0,03$ ) nach 90 Tagen und eine um 35% höhere Inzidenz

von Nierenersatzverfahren auftrat als unter Ringer – Acetate. Die von Wittbrodt 2013 durchgeführte Analyse der HES–Überlebenden zeigte, dass der Einsatz von HES im Vergleich zur kristalloiden Kontrolllösung mit einer signifikant schlechteren „health-related quality of life“ verbunden ist [Wittbrodt et al., 2013]. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die von Perner et al. 2014 veröffentlichten Ergebnisse des „long-term outcome“ nach einem Jahr zeigen, dass sich HES und Ringer–Acetate im Hinblick auf das Langzeitüberleben (siehe 4.2) nicht signifikant unterschieden [Perner et al., 2014]. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die „harmful effects of HES occurred within the first months after randomisation“ [Perner et al., 2014].

**Tabelle 4.2:** Langzeitmortalität [%] der 6S–Studie nach [Perner et al., 2014]

Gruppe	6 Monate	12 Monate	„Longest follow-up“
HES	53,3	56,0	59,8
Ringer–Azetat	47,5	51,5	56,3

**CRYSTMAS–Studie:** Die mit deutlich geringeren Patientenzahlen durchgeführte Studie aus dem Jahr 2012 von Guidet et al. untersuchte die hämodynamische Effektivität und das Sicherheitsprofil von HES 130 / 0,4 und 0,9% NaCl in der schweren Sepsis. Die Arbeitsgruppe untersuchte dafür 196 Patienten, von denen 88 HES und 86 0,9% NaCl erhielten. Dabei zeigte sich in der Frühphase der Sepsis, dass die HES–Gruppe signifikant weniger Volumen benötigte. Negative Effekte durch die HES–Gabe wurden nicht beobachtet. Bereits im Schlusswort der Publikation wird allerdings für eine solide Aussage zum Sicherheitsprofil von HES auf die CHEST–Studie verwiesen [Guidet et al., 2012]. Die Aussagekraft der CRYSTMAS – Gruppe relativiert sich – wie oben in Abschnitt 4.7.3 angesprochen – zusätzlich durch die Beobachtungen von Wiedermann [Wiedermann, 2014]. Dieser berichtet in seinem kurzen Review „Reporting bias in trials of volume resuscitation with hydroxyethyl starch“, dass vor allem HES–nahe Forscher selektiv Daten veröffentlichen, um das Sicherheitsprofil zu beeinflussen. Er bezeichnet dies als „selective outcome reporting bias“ und demonstriert, dass sehr wohl trotz der geringen Patientenzahl eine deutlich höhere Beeinträchtigung der Nierenfunktion aus der HES–Gabe resultierte („After 90 days, 21 patients in the HES group required RRT, almost twice as many as in the saline group (n = 11), [Wiedermann, 2014]“).

**CHEST–Studie:** Die australische ebenfalls randomisierte und verblindete CHEST – Studie (= Crystalloid versus Hydroxyethyl Starch Trial) aus dem Jahr 2012 von Myburgh et al. hingegen verglich an 7000 Intensivpatienten 6% HES 130 / 0,4 mit 0,9% NaCl – Lösung [Myburgh et al., 2012]. Bei diesem Vergleich zeigte sich nach 90 Tagen zwar keine erhöhte Mortalität in der HES – Gruppe (relatives Risiko 1,06, 95% CI, 0,96 – 1,18;  $p = 0,26$ ), die höhere Notwendigkeit für Nierenersatzverfahren in der HES – Gruppe (signifikanter relativer Anstieg für die Notwendigkeit von Nierenersatzverfahren um 21%) bestätigte sich jedoch auch hier. Bei der Interpretation der CHEST – Studie sollte beachtet werden, dass die Flüssigkeitssubstitution mit 0,9% NaCl aus den bereits erläuterten Gründen nicht mehr das „Kristalloid der 1. Wahl“ darstellt (siehe auch Abschnitt 4.8.3 auf Seite 163). Erwähnenswert ist, dass die Studie – anders als viele europäische — staatlich finanziert wurde [Phillips et al., 2013].

**CRISTAL–Studie:** Die wenig später publizierten Ergebnisse der CRISTAL–Studie (= Colloids Versus Crystalloids for the Resuscitation of the Critically Ill) durch Annane et al. widersetzten sich dem Trend der oben genannten Studien. Dabei untersuchten die Autoren die Konsequenzen des Einsatzes entweder von Kolloiden ( $n=1414$ ; Gelatine, Dextrane, HES, 4% oder 20% Humanalbumin) oder von Kristalloiden ( $n=1443$ ; isotonische oder hypertone NaCl– Lösung oder Ringer–Laktat) auf der Intensivstation. Dabei wurde nicht weiter zwischen Sepsis, Trauma oder hypovolämischen Schock mit oder ohne Sepsis oder Trauma differenziert. Dabei zeigte sich nach 28 Tagen kein signifikanter Mortalitätsunterschied. Nach 90 Tagen war die Mortalität in der Kolloid–Gruppe niedriger [Annane et al., 2013]. Betrachtet man den Unterschied zwischen HES und Ringer–Laktat alleine ergeben sich folgende Werte:

**Tabelle 4.3:** Ergebnisse der CRISTAL – Studie zum Einsatz von HES und Ringer–Laktat.  
Aus [Annane et al., 2013]

Gruppe	HES–Patienten (Mortalität)	Ringer–Laktat–Patienten (Mortalität)	Hazard–Ratio (range)
Patienten <sup>4</sup>			
28 Tage Mortalität	645 (149)	72 (22)	0,71 (0,45–1,11)
90 Tage Mortalität	645 (181)	72 (26)	0,72 (0,48 – 1,09)
Patienten mit Sepsis			
28 Tage Mortalität	375 (105)	37 (12)	0,84 (0,46 – 1,53)
90 Tage Mortalität	375 (120)	37 (16)	0,71 (0,42 – 1,20)

Es zeigte sich also ein Mortalitätsvorteil in beiden Gruppen zu beiden Zeitpunkten zugunsten der HES-Gruppe. Das Ergebnis dieser Studie ist vermutlich mitentscheidend dafür gewesen, dass HES nicht vom Markt genommen, sondern nur in seinen Indikationen eingeschränkt wurde (siehe Abschnitt 4.7.5).

#### Kleinere klinische Studien

**Skhirtladze 2014:** Die 2014 erschienene Studie von Skhirtladze et al. untersucht die Unterschiede zwischen Kolloiden (5% Humanalbumin und 6% HES 130/0,4) und Ringer-Laktat in der Herzchirurgie. Die Grundhypothese der Arbeitsgruppe war, dass der Einsatz der Kolloide „expand circulating volume to a greater extent than crystalloids and would be suitable for a restrictive fluid therapy regimen“. Nach Randomisierung erhielten 240 Patienten im Rahmen einer koronaren Bypass-OP entweder eines der Kolloide oder das Kristalloid. Zwar musste tatsächlich signifikant mehr Ringer-Laktat infundiert werden (8,3 Liter vs. 7,4 Liter HES und 6,2 Liter Humanalbumin), dafür war beim Einsatz der Kolloide signifikant mehr Bluttransfusionen notwendig (35% der Ringer-Gruppe, 62% aus der Humanalbumin- und 64% aus der HES-Gruppe,  $P=0,0003$ ) [Skhirtladze et al., 2014]. Dies ist insofern interessant, als dass erneut demonstriert wurde, dass das notwendige Verhältnis bei der Volumensubstitution von Kristalloid zu Kolloid eben nicht 1 : 4 (siehe Einleitung), sondern deutlich niedriger ist. Außerdem sollte an dieser Stelle angemerkt werden, dass die Mortalität mit steigender Menge transfundierter Erythrozytenkonzentrate ansteigt und somit negativ auf die Prognose wirkt (siehe z.B. [Salpeter et al., 2014]). Damit wäre ein zentrales Argument, HES zur Einsparung von Blutprodukten („künstlicher Blutersatz“) einzusetzen, nicht nur nicht gegeben, sondern sogar in sein Gegenteil verkehrt.

**Chowdhury 2014:** Eine ebenfalls 2014 publizierte Studie an 12 freiwilligen Probanden von Chowdhury et al. beschäftigt sich mit der in dieser Dissertation untersuchten Frage, inwiefern sich 0,9% NaCl basierendes und aus Mais gewonnenes 6% HES 130 / 0,4 (Voluven®) mit balanciertem und aus Kartoffeln synthetisiertem HES (Plasma Volume Redibag (PVR) von Baxter Healthcare, Thetford, United Kingdom) in seiner Wirkung auf die Nierenfunktion unterscheidet. Untersucht wurde dafür, die „renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in humans using magnetic resonance imaging“. Das Ergebnis war weniger deutlich, als die Autoren erwartet hatten:

---

<sup>4</sup> Patienten, die nur 1 Art Volumenersatz erhalten haben.

„There was no difference in the blood volume-expanding properties of the 2 preparations of 6% hydroxyethyl starch. The balanced starch produced an increase in renal cortical tissue perfusion, a phenomenon not seen with starch in 0.9% saline“ aus [Chowdhury et al., 2014].

#### Reviews

Die Datenlage galt lange als nicht ausreichend, um die Sicherheit von HES hinreichend zu beurteilen, obwohl Cochrane – Analysen von Dart et al. seit langem darauf hinwiesen, dass bei unbewiesener Überlegenheit gegenüber Kristalloiden und unklarer Beurteilung der Nebenwirkungen der Einsatz von HES fraglich sei [Dart et al., 2010]. Auch wurde der oft angenommene Vorteil von Kolloiden gegenüber Kristalloiden bei der schnellen und langfristigen Stabilisierung von septischen Patienten durch Autoren wie Trof et al. zunehmend in Frage gestellt [Trof and Groeneveld, 2011]. DeSaint und Aurin weisen darauf hin, dass die deutlich teureren Kolloide keinen klaren Vorteil bei der Mortalität (in einigen Studien sogar eine erhöhte Mortalität) hätten, aber mehr Nebenwirkungen aufweisen [de Saint-Aurin et al., 2007].

Wiedermann et al. kommen schon 2012 nach der Auswertung von 13 klinischen Studien mit 1131 Teilnehmern zu dem Ergebnis, dass die mit HES 130 / 0,4 behandelten Patienten eine höhere Mortalität aufweisen. Das gepoolte relative Mortalitätsrisiko unter HES war um 1,14 (95% Konfidenzintervall 0,89 bis 1,46) erhöht. Zusätzlich berichten die Autoren, dass eine signifikante „Publication bias favoring HES 130/0.4“ gefunden wurde ( $p = 0,038$ ). Nachdem diese dann in die Interpretation der Daten miteinbezogen worden war, erhöhte sich das Mortalitätsrisiko unter HES auf 1,25 (95% Konfidenzintervall 0,98 bis 1,58,  $p = 0,069$ ) [Wiedermann and Joannidis, 2012].

Eine Metanalyse aus dem Jahr 2012 von Bellmann et al. beschäftigte sich mit der Frage, inwiefern die Gewebeaufnahme von HES durch dessen molekulares Gewicht und Substitutionsgrad beeinflusst wird. Die Autoren wollten überprüfen, ob niedermolekulares HES eine bessere renale Elimination und geringere Plasmapersistenz aufweist als hochmolekulare Präparate. Bellmann et al. untersuchten dafür 25 klinische Studien mit 287 Patienten und kamen zu dem Ergebnis, dass niedermolekulares HES nicht mit einer geringeren Gewebeaufnahme von HES assoziiert sei [Bellmann et al., 2012]. Diese Beobachtung entspricht mit den in dieser Arbeit durchgeführten Viabilitätsversuchen, die keinen relevanten Vorteil der neueren niedermolekularen HES-Produkte.

Ein systematischer Review mit Metaanalyse von Zarychanski et al. von 2013 werteten

38 klinischen Studien aus. Dabei mussten sie 7 Studien wegen des „scientific misconduct“ der Autoren ausschließen. Nach dem Ausschluss der Studien kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass der Einsatz von HES mit einem signifikant erhöhten Mortalitätsrisiko und Risiko für eine akute Nierenschädigung verbunden war. Zarychanski et al. raten deshalb aus Sicherheitsgründen davor, HES zur akuten Volumensubstitution einzusetzen [Zarychanski et al., 2013].

Antonelli et al. weisen im in derselben JAMA–Ausgabe wie dem Zarychanski–Review erscheinenden Editorial auf die Bedeutung der „Enttarnung des Betrügers Boldt“ hin:

„The report by Zarychanski et al highlights the potentially important and adverse effect of scientific misconduct. With the inclusion of studies by Boldt et al, the medical community might reasonably have concluded that use of hydroxyethyl starch was not inappropriate. Yet the analyses in which these studies were excluded shifts the balance of evidence toward harm.“  
aus [Antonelli and Sandroni, 2013]

Die Interpretation dieser Ereignisse spiegelt sich auch in den von Perel et al. publizierten Cochrane – Analysen wider. Im Jahr 2012 lautete das Fazit dort nach Aussortierung der zweifelhaften Boldt–Studien das Ergebnis:

„There is no evidence from RCTs that resuscitation with colloids reduces the risk of death, compared to resuscitation with crystalloids, in patients with trauma, burns or following surgery. As colloids are not associated with an improvement in survival, and as they are more expensive than crystalloids, it is hard to see how their continued use in these patients can be justified outside the context of RCTs.“  
aus [Perel and Roberts, 2012]

Im Jahr darauf publizierten Perel et al. 2013 eine aktualisierte Fassung ihres Cochrane – Reviews, die die oben zitierte Aussage um einen Satz ergänzte:

„Furthermore, the use of hydroxyethyl starch might increase mortality.“  
aus [Perel et al., 2013]

Der ebenfalls 2013 von Haase et al. publizierte Review beschäftigte sich mit dem Einsatz von HES in Sepsis und kommt nach Analyse von 9 klinischen Studien mit 3456 septischen Patienten zu dem Ergebnis, dass es sehr „unwahrscheinlich“ sei, dass der Einsatz von 6% HES 130 / 0,38 – 0,45 einen klinischen Vorteil für diese Patienten habe. Begründet wurde die mit dem Umstand, dass in der HES–Gruppe vermehrt die

Notwendigkeit zur Nierenersatztherapie und Bluttransfusion bestand. Außerdem sei der Einsatz von HES mit deutlich schwerwiegenderen Nebenwirkungen verbunden [Haase et al., 2013].

Gattas et al. kommen dabei nach Analyse von 35 Studien mit 10391 Patienten zu zwei Ergebnissen. Erstens habe die Qualität der Studien seit 2012 zugenommen und zweitens sei das Risiko der Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens nach HES 130 / 0,4 – Gabe signifikant erhöht (Relatives Risiko: 1,25 (95% Konfidenzintervall 1,08 – 1,44). Auch die Mortalität war erhöht (Relatives Risiko: 1,08 (95% Konfidenzintervall 1,00 – 1,17) [Gattas et al., 2013].

Patel et al. kommen in ihrer Metaanalyse von 2013 nach Auswertung von sechs randomisierten klinischen Studien zum Einsatz von 6% HES 130 / 0,4 und 130 / 0,42 in der schweren Sepsis zum Ergebnis, dass sowohl die Häufigkeit der Nierenersatztherapie als auch die Mortalität in der HES-Gruppe größer war als in der kristalloiden Kontrollgruppe [Patel et al., 2013].

Auch ein Review von Serpa Neto et al. aus dem Jahr 2014 kommt nach Analyse von zehn Studien mit 4624 Patienten mit Sepsis zum Ergebnis, dass HES die Wahrscheinlichkeit für eine akute Nierenschädigung, die Notwendigkeit von Nierenersatzverfahren, Bluttransfusionen und die 90-Tages-Mortalität im Vergleich zu Kristalloiden erhöht [Serpa Neto et al., 2014].

Lameire und Hoste weisen in ihrem 2014 erschienenen Kommentar auf einige wichtige Aspekte bei der aktuellen Diskussion über den Einsatz von HES hin. So geben sie zu Bedenken, dass die Plasmahalbwertszeit des modernen HES 130 deutlich kürzer ist als die der hochmolekularen älteren HES-Präparate. In der Folge verschwände HES innerhalb weniger Stunden aus dem Kreislauf. Damit sei die oft angeführte Überlegenheit gegenüber Kristalloiden nicht mehr in der Art gegeben („offers little advantage“). Anschließend betonen die Lameire und Hoste, dass der Volumeneffekt durch Kristalloide bei hypovolämischen Patienten viel größer sei als bei gesunden euvolämischen Probanden. Die Autoren befürchten ferner, dass die Kontroverse auf einem „believer versus non-believer“ Niveau stehen bleibt. Gleichzeitig betonen sie, dass es nicht nur in Anbetracht des Mangels an klinischem Benefit bei gleichzeitigem nephrotoxischen Potential (sic), sondern auch wegen der deutlich höheren Kosten („economically depressing times“) sehr schwierig ist, den Einsatz von HES weiter zu rechtfertigen [Lameire and Hoste, 2014].

#### 4.7.4 Zusammenfassung der Diskrepanz des theoretischen Modells und der klinischen Studien über HES

**Die in klinischen Studien beobachtete Nephrotoxizität von HES wird durch die *in vitro* – Daten dieser Arbeit bestätigt**

Diese Dissertation konnte zeigen, dass HES bereits bei nicht vorgeschädigten proximalen Tubulusepithelzellen ohne inflammatorische Stimulation zu einer massiven Einschränkung der Viabilität führt. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei HK-2 Zellen, wie bereits diskutiert, um immortalisierte und äußerst robuste Zellen handelt. Dies bedeutet, dass HES vermutlich nicht nur in der septischen Niere schädlich ist.

#### 4.7.5 Die Anwendungsbeschränkung für Hydroxyethylstärke-haltige Arzneimittel

Als Reaktion auf die Ergebnisse der 6S-Studie und der CHEST-Studie initiierte die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) im November 2012 eine Sicherheitsüberprüfung aller in der EU im Handel befindlichen HES-haltigen Infusionslösungen.

Dazu beobachteten Haase et al. 2014:

„In line with this, the European Medicines Agency’s Pharmacovigilance Risk Assessment Committee now recommends that the marketing authorisations of all HES solutions are suspended in the European Union.“  
aus [Haase, 2014]

Für die Überprüfung wurden Daten aus der wissenschaftlichen Literatur, Daten von pharmazeutischen Unternehmen, Daten von den Autoren der klinischen Studien und von anderen Interessensgruppen herangezogen. Im Juni 2013 kam der Ausschuss für Risikobewertung im Bereich der Pharmakovigilanz (PRAC) der EMA zu dem Ergebnis, dass der Nutzen von HES-Lösungen deren Risiken nicht länger überwiegt und zu der Empfehlung, die Genehmigung für das Inverkehrbringen von HES-Produkten in der Europäischen Union auszusetzen.

Inzwischen hat der PRAC auch neue Ergebnisse analysiert und berücksichtigt, die zum Zeitpunkt der initialen Empfehlung noch nicht verfügbar waren, einschließlich neuer Studien (z.B. CRISTAL, siehe oben) und Vorschläge für zusätzliche Risikominimierungsmaßnahmen. Überdies haben sich in der Zwischenzeit die pharmazeutischen Unternehmen dazu verpflichtet, weitere Studien durchzuführen, um die Wirksamkeit und

Langzeit-Sicherheit zu untersuchen. Deshalb wurde am 19.12.2013 von der EMA<sup>5</sup> kein generelles Verbot des HES-Einsatzes beschlossen, sondern nur ein zurückhaltender Einsatz angemahnt.

„The Committee confirmed that HES solutions must no longer be used to treat patients with sepsis (bacterial infection in the blood) or burn injuries or critically ill patients, because of an increased risk of kidney injury and mortality.“ „HES solutions may, however, **continue to be used** in patients to **treat hypovolaemia** (low blood volume) caused by acute blood loss, provided that appropriate measures are taken to reduce potential risks and that additional studies are carried out.“ aus [(PRAC), 2013].

Im Rote-Hand-Brief<sup>6</sup> vom 12.11.2013 wird empfohlen, HES-haltige Infusionslösungen nur noch dann für die Behandlung einer Hypovolämie bei kritischem Blutverlust einzusetzen, wenn kristalloide zuvor nicht ausreichend wirksam gewesen seien. Außerdem sollte immer die niedrigste wirksame Dosis so kurz wie möglich angewendet werden. Die Gabe solle sofort beendet werden, wenn die hämodynamischen Zielparameter erreicht seien. Als Kontraindikationen für HES gelten nun:

- Sepsis
- Verbrennungen
- Eingeschränkte Nierenfunktion oder Nierenersatztherapie
- Intrakranielle oder zerebrale Blutung
- Kritisch kranke Patienten (in der Regel auf der Intensivstation)
- Hyperhydratation, einschließlich Patienten mit Lungenödem
- Dehydratation
- Schwere Gerinnungsstörung
- Schwere Leberfunktionsstörungen

---

<sup>5</sup>online unter [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/Referrals\\_document/Solutions\\_for\\_infusion\\_containing\\_hydroxyethyl\\_starch/European\\_Commission\\_final\\_decision/WC500162361.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/Referrals_document/Solutions_for_infusion_containing_hydroxyethyl_starch/European_Commission_final_decision/WC500162361.pdf), [Stand:28.05.2014, 11:41]

<sup>6</sup>online unter <http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2013/20131118.pdf>, [Stand: 28.05.2014, 11:27]

Ferner wird darauf hingewiesen, dass keine „ausreichend robusten Langzeitdaten zur Sicherheit von HES bei chirurgischen und Trauma-Patienten“ vorlägen. Der „erwartete Nutzen der Behandlung“ müsse „sorgfältig gegen die Ungewissheit in Bezug auf die langfristige Sicherheit abgewogen werden. Große randomisierte klinische Studien haben über ein erhöhtes Risiko für Nierenfunktionsstörungen bei kritisch kranken Patienten, einschließlich Patienten mit Sepsis, berichtet. HES sollte bei diesen Patienten nicht weiter angewendet werden. Der Einsatz von HES sollte beim ersten Anzeichen einer Nierenschädigung beendet werden und es wird empfohlen, die Nierenfunktion der mit HES behandelten Patienten zu überwachen“<sup>7</sup>.

Grundsätzlich bleibt die Frage bestehen, welche Patienten dann in der Realität noch für die HES – Gabe geeignet bleiben. Man könnte die Indikation im folgenden Satz zusammenfassen: „Wer so krank ist, um HES zu benötigen, ist zu krank, um es zu vertragen“. Es ist nach Ansicht des Autoren dieser Arbeit unerheblich, ob HES beim Einsatz an gesunden Probanden im Hinblick auf die Nierenfunktion inert ist, weil es eben nicht beim Gesunden, sondern beim schwerkranken Patienten mit kritischem Blutverlust eingesetzt werden soll. Sogar nierengesunde Patienten, die im Rahmen eines Polytraumas Volumen benötigen, haben in diesem Moment kein uneingeschränkt intakte Nierenfunktion mehr. Es wird oft vergessen, dass der ärztliche Leitsatz „primum non nocere!“ im Zentrum des ärztlichen Bemühens vor allem bei der Behandlung kritisch Kranker stehen sollte. Die Autoren Singer und Glynne demonstrieren dies in einem exzellenten Artikel mit dem Titel „Treating Critical Illness: The Importance of First Doing No Harm“. Dabei geht es nicht direkt um den Einsatz von HES, er erklärt aber, dass

„An important but generally overlooked consideration is the possibility that superficially attractive, short-term benefits may camouflage an underlying tendency to cause harm.“ aus [Singer and Glynne, 2005].

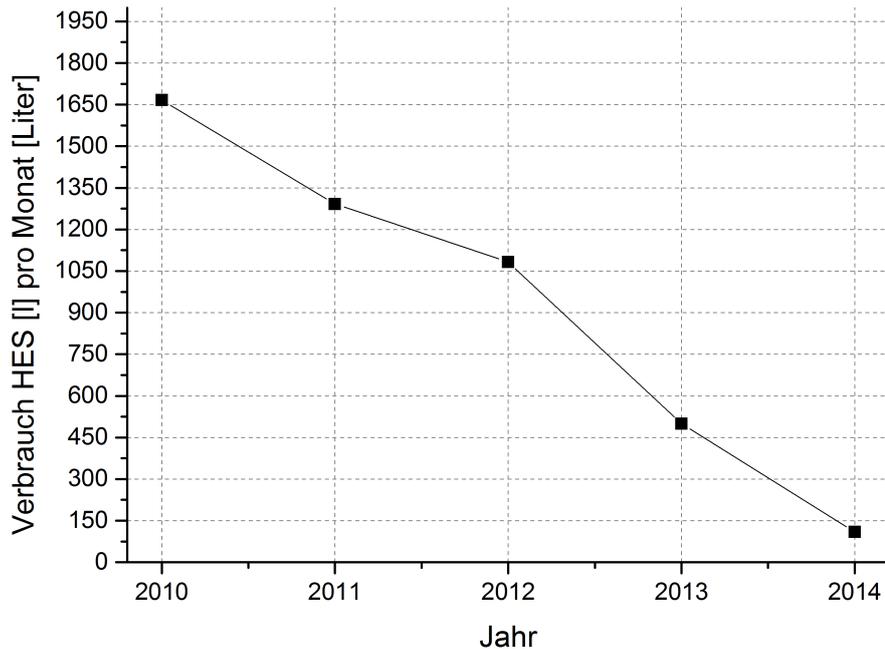
#### 4.7.6 Vergleich dieser Ergebnisse mit dem klinischen Einsatz in Deutschland

##### Einsatz von HES am Universitätsklinikum Würzburg

Am Universitätsklinikum Würzburg stellte Hydroxyethylstärke das bis Mitte dieses Jahres 2014 am meisten verwendete kolloidale Volumenersatzmittel dar. So wurde der Verbrauch im Jahr 2010 mit etwa 20000 Litern HES angegeben (zum Vergleich: Der

<sup>7</sup>online unter <http://www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/Archiv/2013/20131118.pdf>, [Stand: 28.05.2014, 11:27]

Verbrauch an Gelafundin® lag bei etwa 5 Litern). Die gebräuchlichsten Produkte waren bis Anfang 2010 Voluven® und seit 2010 Volulyte® (beide von Fresenius Kabi®). Parallel zu den oben genannten Entwicklungen hinsichtlich der Sicherheitsbedenken beim klinischen Einsatz von HES änderte sich auch dessen Einsatz am Universitätsklinikum Würzburg. Die Veränderungen sind in Abbildung 4.5 graphisch dargestellt.



**Abb. 4.5:** Übersicht: Durchschnittlicher Verbrauch von Hydroxyethylstärke (ab Mitte 2010 Volulyte®, vorher Voluven®) pro Monat im Universitätsklinikum Würzburg. Angabe in [Litern]<sup>8</sup>.

Im Jahr 2011 lag der Verbrauch mit 15.500 Litern HES / Jahr niedriger als 2010. Dieser Trend setzte sich 2012 (13.000 Liter HES / Jahr) fort. Im Folgejahr 2013 gab es einen merklichen „Knick“, da anfangs noch 700 Liter HES / Monat, ab August aber nur noch durchschnittlich 250 Liter HES / Monat) verbraucht wurden. Dies entsprach 6.000 Litern HES / Jahr. Im laufenden Jahr 2014 liegt der Verbrauch mit 110 Litern HES / Monat noch einmal deutlich niedriger.

<sup>8</sup>Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Johann Schurz, Leitender Apotheker, Universitätsklinikum Würzburg.

### **Einsatz von HES in Deutschland**

Daten über den Einsatz von HES an deutschen Kliniken zu finden, ist schwierig. Eine aktuelle Arbeit (05 / 2014) in „Anästhesie und Intensivmedizin“ von Koch et. al. beschäftigt sich mit dieser Fragestellung. Die Autoren erfassten dafür über einen Zeitraum von 13 Monaten (01.11.2011 bis 01.12.2012) den Einsatz von Infusionslösungen an 10 Kliniken des Rhein–Main–Gebietes, darunter zwei Universitätskliniken [Koch et al., 2014]. Als HES wurden dabei die Präparate 10% HES 200 kDa und 6% HES 130 kDa mit verschiedenen Trägerlösungen (NaCl, balanciert mit Malat mit / ohne Azetat) eingesetzt. Dabei wurden im Mittel zu 85,98% Kristalloide und zu 11,59% HES–Präparate eingesetzt. Die übrigen 2,43% entfielen auf „andere kolloidale Lösungen“. Dabei unterschieden sich die einzelnen teilnehmenden Kliniken zum Teil deutlich im Ausmaß des HES–Einsatzes, da der durchschnittliche HES–Anteil zwischen maximal 25,88% und minimal 0% (zwei Kliniken) variierte. Die beiden Kliniken mit 0% HES setzen dafür „andere Kolloide“ ein (zu 8,16% und 4,16%).

## **4.8 Betrachtung der Ergebnisse für Gelatine<sup>®</sup>, Humanalbumin und Sterofundin<sup>®</sup> ISO**

Obwohl der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Wirkung von HES lag, wurden auch Gelatine, Humanalbumin und die balancierte Vollelektrolytlösung Sterofundin<sup>®</sup> ISO im *in – vitro* – Modell untersucht.

### **4.8.1 Gelatine – Lösungen zeigen *in vitro* ähnliche Effekte auf proximale Tubulusepithelzellen**

Neben HES stellten Gelatine – Lösungen die weltweit am häufigsten eingesetzten synthetischen Kolloide dar [Finfer et al., 2010] (zur Verbreitung der einzelnen Infusionslösungen siehe Abbildung 6.2 auf Seite 185).

### **Über die Volumenwirksamkeit und damit therapeutische Äquivalenz von Gelatine und HES widersprechen sich Lehrmeinung und klinische Studien**

Insgesamt ist die Studienlage für Gelatine – Präparate deutlich schlechter als für HES. Hinsichtlich der Effektivität zum Volumenersatz gilt Gelatine dem HES als unterlegen, weil es pharmakokinetisch durch seine sich herstellungsbedingt unter der oder im Bereich der „Nierenschwelle“ befindende mittlere Molmasse rasch renal eliminiert wird

und damit seine Volumenwirksamkeit verliert [Thiel and Roewer, 2009]. Die Studienlage sieht keinen relevanten Unterschied zwischen HES – und Gelatine – Präparaten im Hinblick auf die Volumenwirksamkeit. Eine von Awad 2012 durchgeführte randomisierte Doppelblindstudie an 25 Patienten, die im Rahmen einer laparoskopischen Cholezystektomie entweder 1 Liter Gelofusine<sup>®</sup> oder Voluven<sup>®</sup> erhielten, fand keinen Unterschied in der Expandierung des Blutvolumens [Awad et al., 2012]. Auch Lobo et al. fanden 2010 bei einer Untersuchung an 10 gesunden männlichen Freiwilligen hinsichtlich der Volumenwirksamkeit keinen Unterschied. Dass HES und Gelatine – Präparate im Hinblick auf Volumenwirksamkeit, onkotischen Plasmadruck, Gerinnung und die Homöostase gleichwertig sind, fanden auch Beyer et al., die 46 Patienten im Rahmen einer orthopädischen Hüft – Operation entweder mit 6% HES 200 / 0,5 oder 3% (sic) Gelafundin<sup>®</sup> behandelten [Beyer et al., 1997].

Die ebenfalls 2010 von Yap et al. publizierte randomisierte kontrollierte Studie mit 40 Patienten verglich Gelofusine<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup> beim perioperativen Volumenersatz bei kardiopulmonalem Bypass. Als Parameter für den onkotischen Plasmadruck wurden dabei der Blutverlust, die Veränderungen im „Blutprofil“ und der intraokularer Druck als sekundäre und die absolut notwendige Menge an benötigtem Volumen als primäre Endpunkte verwendet. Dabei war der gemessene intraokularer Druck in der Gelatine–Gruppe signifikant höher als in der HES–Gruppe ( $p=0,016$ , Mittelwert 1,174 mmHg). Die Autoren schlussfolgern, dass dies implizieren könnte, dass HES besser geeignet ist, um den onkotischen Plasmadruck zu erhalten als Gelatine. Allerdings habe sich das nicht auf die totale Menge an substituiertem Volumen intra– und postoperativ ausgewirkt [Yap et al., 2007]. Eine neuere randomisierte Doppelblindstudie zu diesem Thema führten Awad et. al. durch. Sie verglichen dabei die Auswirkungen von Gelofusine<sup>®</sup> (4% succinylated Gelatine in 0,7% NaCl–Lösung, mit einem mittleren Molekulargewicht von 30 kDa) und Voluven<sup>®</sup> im Rahmen einer laparoskopischen Cholezystektomie auf Änderungen im Hämatokrit (als Parameter für das Blutvolumen) und die Urin – Albumin – Kreatinin – Ratio. Problematisch ist wieder die geringe Patientenzahl beider Gruppen (Gelofusine<sup>®</sup> mit  $n = 12$  und Voluven<sup>®</sup> mit  $n = 13$ ). Bei der Auswertung fanden sich keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Kolloiden [Awad et al., 2012].

#### **Die Nephrotoxizität von Gelatine wird unterschiedlich beurteilt**

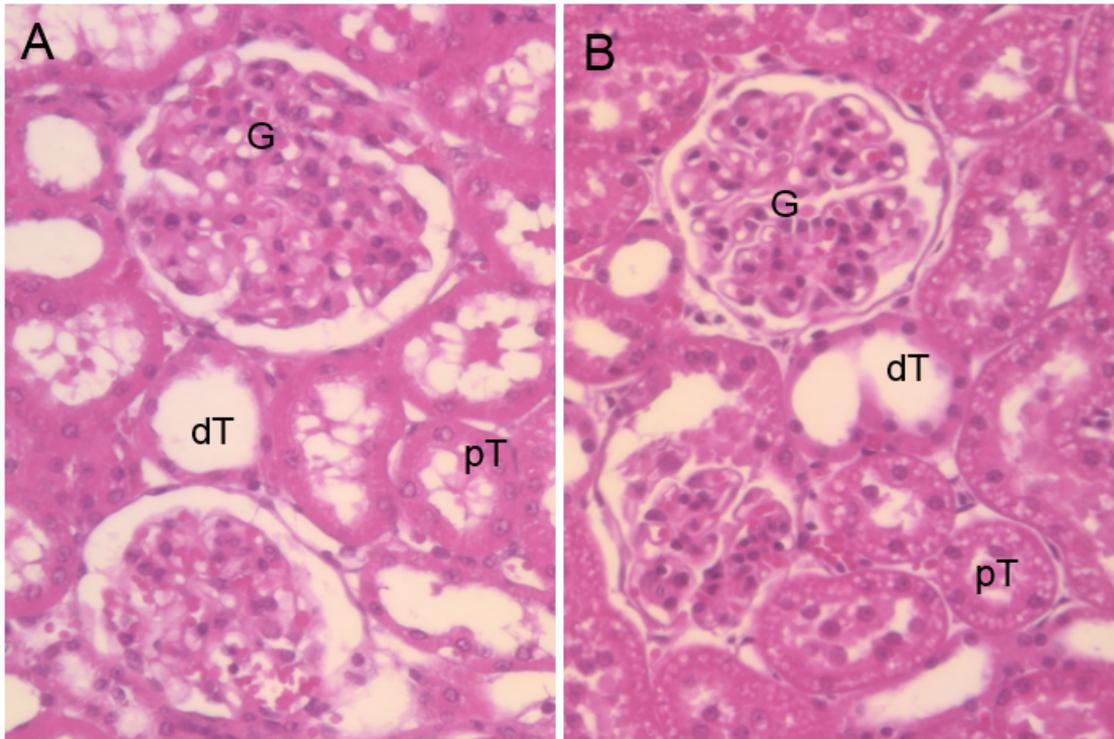
Im Hinblick auf die in dieser Arbeit im Vordergrund stehende Nierenschädlichkeit der synthetischen Kolloide findet sich in aktuellen Lehrbüchern die Aussage, dass bei einem

#### 4 Diskussion

Einsatz von Gelatine – Lösungen keine Nierenschädigung zu befürchten sei (siehe [Karrow, 2013], Seite 459 und [Thiel and Roewer, 2009], S. 242). Dabei betonen Thomas – Rueddel et al. in einem Review von 2012, dass Gelatine zwar seit mehr als 60 Jahren eingesetzt wird, die Sicherheit und Wirksamkeit aber nicht für alle klinischen Situationen zuverlässig beurteilt werden kann [Thomas-Rueddel et al., 2012].

Eine von Bayer et al. an der Universitätsklinik Jena durchgeführte und 2011 publizierte prospektive sequentielle Single – Center Studie verglich die Inzidenz von Nierenersatzverfahren in Abhängigkeit der verwendeten Volumensubstitution. Dabei erhielten 118 Patienten HES 130 / 0,4, 87 Patienten 4% Gelatine und 141 Patienten ausschließlich Kristalloide. Dabei fiel auf, dass 70% der HES – Patienten ( $p = 0,002$ ) und 68% der Gelatine – Gruppe ( $p = 0,025$ ) ein akutes Nierenversagen erlitten, während dies in der kristalloiden Gruppe nur bei 47% auftrat ( $p = 0,162$ ) [Bayer et al., 2011].

In den dieser Arbeit vorausgegangen *in vivo* – Versuchen zeigten Schick et al., dass auch bei Gelatine – Gabe zu mikroskopisch sichtbaren Vesikeln in der Niere führte. Im Vergleich zu den mit HES – behandelten Rattennieren fiel auf, dass sich die intrazellulären Vesikel – dargestellt in Abbildung 4.6 – auf den proximalen Tubulus beschränkten [Schick et al., 2010].



**Abb. 4.6:** Histopathologische Bilder der septischen Rattenniere in der HE – Färbung . (A) mit 0,9% NaCl behandelte Ratte, (B) mit 4% Gelafundin<sup>®</sup> behandelte Ratte (G = Glomerulus, pT = proximaler Tubulus, dT = distaler Tubulus), aus [Schick et al., 2010]<sup>9</sup>

#### **Gelafundin<sup>®</sup> ist *in vitro* und *in vivo* noch nierenschädlicher als HES**

Trotz des optisch geringer anmutenden Ausmaßes stellte sich bei der Auswertung der Nierenfunktionsparameter ein anderes Bild dar. Zusammengefasst konnten Schick et al. zeigen, dass Gelafundin<sup>®</sup> im verwendeten Tiermodell noch nephrotoxischer als HES war [Schick et al., 2010]. Im auf Seite 81 dargestellten EZ4U (Abbildung 3.16) mit pH – korrigiertem Gelafundin<sup>®</sup> zeigte sich, dass niedrige Konzentrationen bis einschließlich 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> sich kaum von der 0% – Referenzlösung unterschieden. Beginnend mit 0,67% Gelafundin<sup>®</sup> trat eine statistisch hoch signifikante Reduktion der Zellviabilität ein, die vom Ausmaß her der des HES vergleichbar war. Ferner konnte im auf Seite 86 in Abbildung 3.19 dargestellten Versuch demonstriert werden, dass eine im EZ4U alleine nicht schädliche Dosis von 0,33% Gelafundin<sup>®</sup> bei zusätzlicher Gabe von 1% Voluven<sup>®</sup> dessen Wirkung massiv verstärkte. Im LDH – Test (Abbildung 3.35 auf Seite 108) erwies sich Gelafundin<sup>®</sup> als deutlich zytotoxischer als Volulyte<sup>®</sup>. So trat eine im

<sup>9</sup>Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Schick

Vergleich zu HES deutlich früher einsetzende, bei allen Gelatine – Verdünnungen statistisch hochsignifikante Zelllyse (7,30% bis 17,04%) auf. Auf mRNA – Ebene induzierte Gelafundin® – anders als Voluven® – eine statistisch signifikant erhöhte Expression sowohl von ICAM – 1 (Abbildung 3.5) als auch von CCL – 2 (Abbildung 3.6). Damit wirkte Gelafundin® proinflammatorisch.

Diese *in – vitro* – Ergebnisse decken sich sowohl mit den experimentellen *in – vivo* – Daten von Schick et al. [Schick et al., 2010], als auch mit klinischen Studien. So konnten in einer randomisierten Studie im Rahmen der Operation an abdominellen Aortenaneurysmata an 62 Patienten zeigen, dass der Einsatz von Gelatine (4% Gelafusin®) statt HES (sowohl 6% 200 / 0,62 als auch 6% 130 / 0,4 ) eine schlechtere Nierenfunktion und größeren Nierenschaden zur Folge hatte [Mahmood et al., 2007]. In diesem Kontext ebenfalls erwähnenswert ist eine Arbeit derselben Autoren aus dem Jahr 2009, in der – ebenfalls im Rahmen einer Operation an abdominellen Aortenaneurysmata – die oben genannten Präparate hinsichtlich ihrer Effekte auf die Mikrozirkulation maßen. Dabei erwies sich HES 200 / 0,62 als am besten für die „splanchnic microcirculation protection“. Außerdem reduzierte das Präparat die Inflammation und die Dauer der Beatmung [Mahmood et al., 2009]. Unsere eigenen Daten aus dem Rattenmodell hingegen ergaben, dass Sterofundin® ISO auch für die intestinale Mikrozirkulation den Kolloiden überlegen ist [Schick et al., 2012].

Zusammenfassend zeigt sich Gelatine in den *in – vitro* – Ergebnissen dieser Arbeit als genauso oder noch schädlicher für Integrität und Viabilität der Nierenzellen als HES. Anders als HES induziert es eine inflammatorische Reaktion der Nierenzellen. Inwiefern beide synthetischen Kolloide dabei über denselben, einen ähnlichen oder einen völlig anderen Schädigungsmechanismus verfügen, ist unklar. In Anbetracht der wachsenden Hinweise darauf, dass Gelatine ein noch nierengefährdendes Präparat als HES darstellt, ist es fraglich, welche Indikationen in Zukunft für die Gelatine bleiben.

#### **4.8.2 Humanalbumin reduziert ebenfalls dosisabhängig die Viabilität und ist nicht inert**

Humanalbumin ist – anders als HES und Gelatine – ein natürliches Kolloid. Es ist im Rahmen klinischer Studien besser untersucht als Gelatine, aber schlechter als HES.

### **Verbleibende Indikation für Humanalbumin: Humanalbumin gilt außerhalb von klinischen Studien nicht als Mittel der 1. Wahl**

Unter den Kolloiden gilt Humanalbumin zwar als sicherer, aber auch deutlich teurer als die Hydroxyethylstärke [Groeneveld et al., 2011]. Patienten mit Hypoalbuminämie haben eine schlechtere Prognose [Vincent et al., 2003].

**Dubois et al:** Deshalb untersuchten Dubois et al. in ihrer prospektiven kontrollierten randomisierten Studie (n=100 insgesamt) den Einfluss der Humanalbuminsubstitution. Dabei erhielten die Patienten der Albumin-Gruppe 300 mL 20% Humanalbumin am 1. Tag und weiter 200 ml pro Tag bis der Serumspiegel an Albumin über 31 g / dl lag (Albumingruppe). Die Kontrollgruppe erhielt kein Albumin. Die durch den „Sequential Organ Failure Assessment score“ bestimmte Organfunktion war in der Albumingruppe besser (p=0,026). Außerdem wurde die enterale Ernährung besser toleriert und die Flüssigkeitsbilanz war weniger negativ [Dubois et al., 2006].

**SAFE-Studie:** Inwiefern Humanalbumin aber der Gabe von 0,9% NaCl wirklich überlegen ist, gilt als unsicher. Finfer et al. verglichen in einer deutlich größeren randomisierten Doppelblindstudie bei 6997 Patienten 4% Humanalbumin mit der Gabe von 0,9% NaCl bei Intensivpatienten. Dabei zeigte sich nach 28 Tagen ein vergleichbares Outcome (relatives Risiko 0,99, 95% CI, 0,91 – 1,09; p = 0,87). Auch die Notwendigkeit von Nierenersatzverfahren unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht [Finfer et al., 2004]. Die weiteren Analysen der SAFE – Studie (Saline versus Albumin Fluid Evaluation) zeigte nach zwei Jahren eine signifikant höhere Mortalität der 4% Humanalbumin – Gruppe für Patienten mit Schädel – Hirn – Trauma (relatives Risiko 1,63, 95% CI, 1,17 – 2,26; p = 0,003) [Myburgh et al., 2007]. Insgesamt konnte die SAFE – Studie keinen signifikanten Unterschied zu Gunsten der kolloidalen Lösung hinsichtlich des Einsatzes bei Hypoalbuminämie [Finfer et al., 2006] oder der hämodynamischen Effektivität zeigen. Der Mehrbedarf an kristalloider Lösung lag bei 1,4 : 1 [Myburgh and Mythen, 2013].

**FEAST-Studie:** Eine neuere FEAST – Studie (Fluid Expansion as Supportive Therapy) mit 3141 afrikanischen Kindern, die von Maitland et al. 2011 im NEJM publiziert wurde, kommt zu einem sehr überraschenden Ergebnis. Die Arbeitsgruppe untersuchte dabei die Auswirkung eines Bolus mit 20 bis 40 ml 5% Humanalbumin, 0,9% NaCl oder ohne Flüssigkeits-Bolus. Als Patientenkollektiv wurden dafür schwer

#### 4 Diskussion

fiebrige Patienten mit verminderter Perfusion („severe febrile illness and impaired perfusion“) ausgewählt. Dabei waren sowohl die Humanalbumin-Gabe (10,6% Mortalität) als auch die NaCl-Gabe (10,5% Mortalität) mit einer im Vergleich zur Kontrollgruppe (7,3% Mortalität) höheren 48 – Stunden – Mortalität verbunden. Das relative Risiko der Volumen-Substitutionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe betrug 1,45 (95% Konfidenzintervall: 1,13 bis 1,86,  $p=0,003$ ) [Maitland et al., 2011]. Bei der Suche nach den möglichen Ursachen rückte für die Autoren der Arbeit zunächst der negative Effekt durch die Flüssigkeitsüberladung („fluid overload“) in den Fokus. Dabei kam abermals ein überraschendes Resultat heraus. Anders als erwartet, war mehr ein „kardiovaskulärer Kollaps als eine Flüssigkeitsüberladung ursächlich“ für die erhöhte Mortalität [Maitland et al., 2013]. Maitland und al. folgern daraus:

„These results should prompt a re-evaluation of evidence on fluid resuscitation for shock and a re-appraisal of the rate, composition and volume of resuscitation fluids.“ aus [Maitland et al., 2013]

Myburgh und Finfer ergänzen in einem begleitenden Kommentar zu diesen Ergebnissen [Myburgh and Finfer, 2013]:

„The cause of excess deaths was primarily refractory shock and not fluid overload. These features are consistent with a potential cardiotoxic or ischemia-reperfusion injury following resuscitation with boluses of intravenous fluid.“ aus [Myburgh and Finfer, 2013].

Die beiden Kommentatoren weisen aber auch auf die Wichtigkeit oder besser die Notwendigkeit eines ausreichenden Monitorings bei der Volumentherapie hin:

„Although these effects may have been amplified by the absence of invasive monitoring, mechanical ventilation or vasopressors, the results provide compelling insights into the effects of intravenous fluid resuscitation and potential adverse effects that extend beyond the initial resuscitation period.“ aus [Myburgh and Finfer, 2013].

Wie alle großen Studien fand auch die FEAST – Studie zahlreiche Kritiker. So gibt Duke im Lancet zu bedenken, dass die Studie komplex, unvollständig veröffentlicht und deshalb offen für fehlerhafte Interpretationen sei [Duke, 2011]. Er belegt diese Aussage mit zahlreichen Beispielen aus der Studie (für die Einzelheiten siehe [Duke, 2011]).

**Cochrane – Analyse:** Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen die Autoren um Roberts in ihrer Cochrane – Analyse [Roberts I, 2011]. Diese finden im Einsatz bei hypovolämischen Patienten keine Evidenz für eine unter Humanalbumin reduzierte Mortalität im Vergleich zu den deutlich billigeren kristalloiden Alternativen wie 0,9% NaCl. Auch bei Patienten mit einer manifesten Hypoalbuminämie bringe der Einsatz von Humanalbumin keinen Vorteil. Zusammenfassend sehen die Autoren bei fehlender Überlegenheit und deutlich höheren Kosten keine Indikation für den Einsatz Humanalbumins außerhalb klinischer Studien [Roberts I, 2011]. Bei der Interpretation dieser Daten sollte beachtet werden, dass 0,9% NaCl in Deutschland nur noch in seltenen Ausnahmefällen zur Volumentherapie eingesetzt wird (siehe Abschnitt 1.2.6 auf Seite 6). Einen Vorteil könnte Humanalbumin beim Einsatz im bestehenden Hirnödem führen. So zeigten Jungner im Tierversuch, dass Humanalbumin im Vergleich zum Ringer – Azetat weniger posttraumatische Hirnödeme verursachte [Jungner et al., 2010]. Dem widersprechen allerdings die Ergebnisse der SAFE – Studie (siehe oben).

#### **Humanalbumin führt zur erhöhten Aluminiumzufuhr**

Ein in der Literatur nicht diskutierter Punkt betrifft das im Humanalbumin enthaltene Aluminium. Dieses ist in einer Konzentration von bis zu 200 µg / l Aluminium enthalten und liegt knapp unter dem als toxisch festgelegten Grenzwert. Die parenterale Aluminiumzufuhr ist alles andere als unproblematisch. Aluminium gilt als neurotoxisch und als entscheidend mitverantwortlich für die Entwicklung des Morbus Alzheimer [Walton, 2006] [Walton, 2009]. Parenteral appliziert durchbricht es rasch die Blut – Hirn – Schranke und bindet mit äußerst hoher Affinität an die großen Pyramidenzellen des Hippocampus [Bhattacharjee et al., 2013]. Andere Folgen von Aluminiumzufuhr sind neben einer auch für junge Menschen gefährlichen Demenz, das Auftreten von Anämie und Knochenschäden [Fewtrell et al., 2011].

#### **Humanalbumin unterscheidet sich in seiner Auswirkung *in vitro* von den synthetischen Kolloiden**

Im auf Seite 83 in Abbildung 3.17 dargestellten EZ4U wirkt die niedrigste Konzentration von 0,08% Humanalbumin inert, in niedrigen Dosierungen von 0,42% und 0,83% hochsignifikant protektiv und erst in höherer Dosis von 1,67% und 3,33% viabilitätsreduzierend um maximal 38,23% auf  $61,78\% \pm 14,65\% \text{ SD}$ . Damit ist Humanalbumin nicht inert, weist aber – anders als die synthetischen Kolloide HES und Gelatine – ein protektives Plateau auf. Der für die beiden anderen Präparate typische lineare Abfall

der Viabilität beginnt deutlich später. Zellen, die zur „Protektion“ 0,5% Humanalbumin zum 1% Voluven<sup>®</sup> konnten vom protektiven Effekt allerdings nicht profitieren (siehe Abbildung 3.19 auf Seite 86). Auf mRNA – Ebene beeinflusste es die beiden inflammatorischen Marker in gegensätzlicher Weise indem es ICAM – 1 herunter- und CCL – 2 heraufreguliert. Dies widerspricht den Ergebnissen von Sengul et al., die auch bei hohen Konzentrationen von Humanalbumin keine Auswirkung auf die CCL – 2 Expression von HK – 2 Zellen fanden [Sengul et al., 2002]. Im LDH – Test ist Humanalbumin zytotoxischer als HES. Es wirkt ab einer Konzentration von 0,42% Humanalbumin statistisch hochsignifikant toxischer als die 0% – Referenzlösung (siehe Abbildung 3.36 auf Seite 109).

#### 4.8.3 Sterofundin<sup>®</sup> ISO wirkt *in vitro* weitgehend inert

Zur Therapie speziell mit Sterofundin<sup>®</sup> ISO gibt es kaum Daten. Insgesamt ist die Studienlage zu den unterschiedlichen balancierten Vollelektrolytlösungen dürftig. Die Frage allerdings, ob Kristalloide im Volumenersatz den Kolloiden ebenbürtig sein können, wurde in einigen klinischen Studien untersucht, deren Ergebnis der Lehrmeinung widersprechen.

#### Der Stellenwert einer alleinigen Volumentherapie mit balancierten Vollelektrolytlösungen wie Sterofundin<sup>®</sup> ISO ist umstritten

Der Volumeneffekt Kolloid zu Kristalloid ist umstritten. In Lehrbüchern hält sich die Angabe eines Verhältnisses von etwa 1:4 [Larsen, 2011]. Neuere Studien schätzen dieses eher im Bereich 1:1,4 [Hartog, 2010] bis 1:1,3 [Myburgh and Mythen, 2013]. Damit sind – anders als von Befürwortern kolloidaler Volumentherapie behauptet – nicht deutlich größere Volumina mit den daraus resultierenden Ödemen zur hämodynamischen Stabilisierung erforderlich. Inwiefern Vollelektrolytlösungen wie Sterofundin<sup>®</sup> ISO auch zum Volumenersatz eingesetzt werden können, wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Einige Publikationen halten sie für im Hinblick auf die Hämodynamik für gleichwertig, hinsichtlich der Kosten für günstiger und vor allem wegen ihres deutlich günstigeren Nebenwirkungsprofils als den Kolloiden überlegen [Perel et al., 2013] [Bauer et al., 2009]. Die bereits zitierte Studie von Bayer kam zu dem Schluss, dass

„Fluid resuscitation with only crystalloids was equally effective, resulted in a more positive fluid balance only on the first 2 days, and was associated with a lesser incidence of acute kidney injury.“ [Bayer et al., 2011]

Trotzdem kamen Finfer et al. bei der Auswertung des Anteils der kristalloiden beim Volumenersatz weltweit zu dem Ergebnis:

„Although colloid solutions are more expensive and may possibly be harmful in some patients, they were administered to more patients and during more resuscitation episodes than crystalloids were.“ [Finfer et al., 2010]

Seit dem 18.09.2013 gilt im Universitätsklinikum Würzburg die Angabe, zum Volumenersatz bei Sepsis keine synthetischen kolloidalen, sondern nur noch kristalloide Lösungen anzuwenden. Als Mittel der 1. Wahl sollten kristalloide Lösungen eingesetzt werden. HES – Produkte sollten nur erwogen werden, wenn darüber hinaus eine Kreislaufstabilisierung durch adäquate Katecholamingabe nicht möglich ist.

#### **Balancierte Vollelektrolytlösungen gelten in vielen klinischen Studien als der 0,9% NaCl – Lösung überlegen**

Die Datenlage zum Einsatz von balancierten Vollelektrolytlösungen ist sehr schlecht. Weder zu dem in dieser Arbeit verwendeten Sterofundin® ISO, noch zum sonst in Deutschland gebräuchlichen Jonosteril® finden sich zum Zeitpunkt der Dissertation klinischen Studien. Dafür gibt es Beobachtungen über PlasmaLyte® A von der Firma Baxter. PlasmaLyte® A und das ebenfalls verfügbare PlasmaLyte® 148 unterscheiden sich nicht in ihrer Zusammensetzung, sondern in ihrem pH – Wert, der für erstere Lösung bei 7,4 und für letztere bei 5,5 liegt [Shaw et al., 2012].

Alle diese balancierten Lösungen sind zwar ähnlich, aber nicht gleich, wie ein Vergleich der Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen im Anhang von Seite 186 bis 188 zeigt. Deshalb können die Ergebnisse klinischer Untersuchungen streng genommen nicht ohne Weiteres auf einander übertragen werden. Kim et al. randomisierten in einer Studie an 60 Patienten im Rahmen einer Nierentransplantation je 30 in eine 0,9% NaCl – und 30 Patienten in eine PlasmaLyte® A Gruppe. Dabei kam heraus, dass die Anwendung für beide Präparate sicher durchführbar war, während PlasmaLyte® hinsichtlich des Säure – Basen – Haushaltes und der Elektrolytstabilität der Kochsalzlösung überlegen war [Kim et al., 2013]. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Hadimioglu et al. überein. Dessen Arbeitsgruppe randomisierte ebenfalls im Rahmen der Nierentransplantation in ihrer doppelt verblindeten Studie jeweils 30 Patienten in die drei Gruppen 0,9% NaCl, Ringer – Laktat oder PlasmaLyte® A. Auch hier zeigte sich, dass alle drei kristalloiden Lösungen sicher angewandt werden können. Abermals zeigte die balancierte Vollelektrolytlösung in diesem Kontext das beste „metabolische

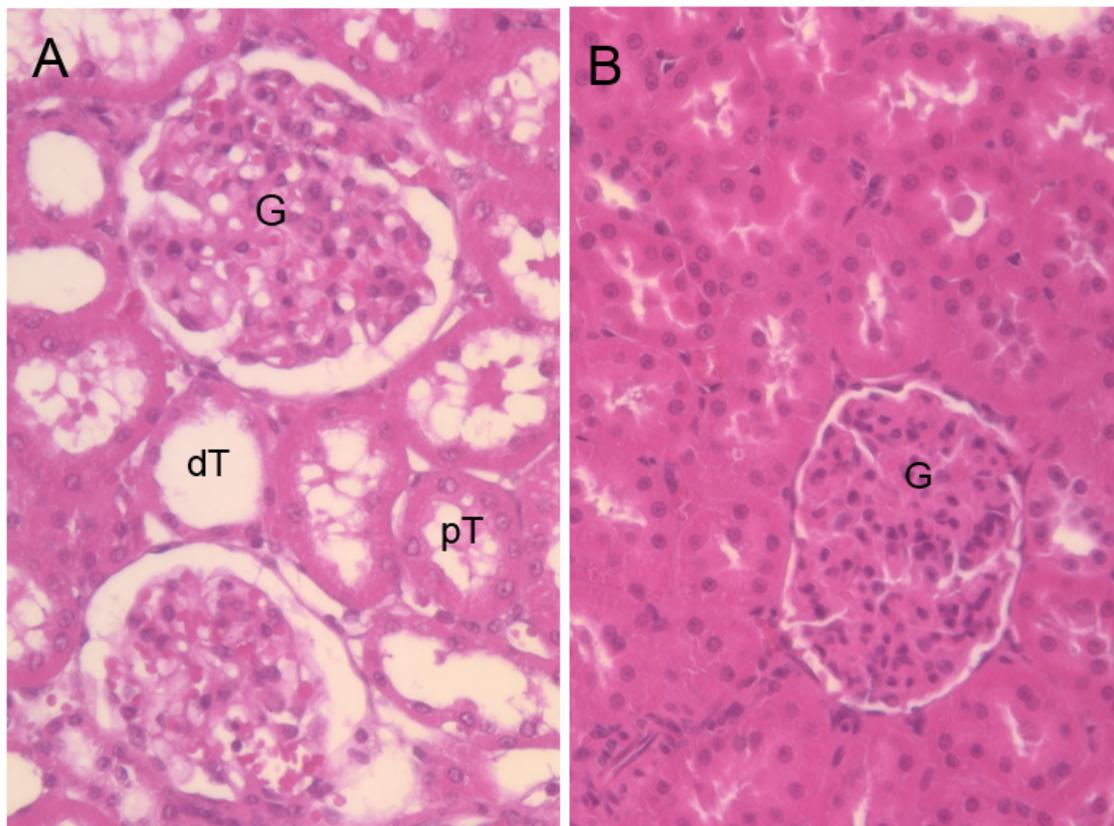
Profil“ [Hadimioglu et al., 2008]. Ein deutlich größeres Patientenkollektiv untersuchten Schaw et al. in ihrer Beobachtungsstudie. Dabei durchsuchten sie die „Premier Perspective Comparative Database“ nach erwachsene Patienten nach einer größeren offenen abdominalchirurgischen Operation. Eingeschlossen wurden 30,994 Patienten für 0,9% NaCl und 926 Patienten mit PlasmaLyte<sup>®</sup> A (oder PlasmaLyte<sup>®</sup> 148). Es fiel auf, dass die 0,9% NaCl – Gruppe statistisch signifikant häufiger postoperative Infektionen ( $p = 0,006$ ), Nierenversagen mit der Notwendigkeit von Nierenersatzverfahren ( $p < 0,001$ ), Bluttransfusionen ( $p < 0,001$ ), Elektrolytentgleisungen ( $p = 0,046$ ) und die Notwendigkeit zur Korrektur von Azidosen ( $p = 0,02$ ) aufwies als die PlasmaLyte<sup>®</sup> – Gruppe [Shaw et al., 2012].

Demgegenüber geben Guidet et al. in einem von FreseniusKabi unterstützten umfangreichen Review an, dass es keine überzeugende Evidenz für klinisch relevante Nebenwirkungen von 0,9% NaCl (als Trägerlösung) gibt [Guidet et al., 2010]. Rizoli et al. geben in ihrem Review zu bedenken, dass das in den balancierten Vollelektrolytlösungen enthaltene Magnesium den peripheren Gefäßwiderstand und die Herzfrequenz erhöhen und die Organischämie verschlimmern könne [Rizoli, 2011]. Im Lehrbuch „Intensivmedizin“ geben im Kapitel „Volumentherapie“ Hartog et al. zu bedenken, dass auch das zugesetzte Acetate unerwünschte Arzneimittelwirkungen aufweisen kann [Hartog, 2014]. Das häufig als metabolisierbares Anion verwendete Acetate kann die NO – Synthese induzieren [Noris et al., 1998] [Daugirdas, 1991] und so dosisabhängig negativ inotrop wirken [Sztajzel et al., 1993]. Untersuchungen bei kritisch kranken Patienten, die als Nierenersatzverfahren eine azetatgepufferte Lösung (35 mmol / l) erhalten hatten, konnten zeigen, dass der Herzindex sich signifikant verringerte und der Vasopressorenbedarf signifikant anstieg [Heering et al., 1999]. Umgekehrt resultierte eine azetatfreie Hämodiafiltration in geringerer Hypotension und Einschränkung der myokardialen Kontraktilität [Selby et al., 2006]. Untersuchungen über die Nebenwirkungen größerer Mengen balancierter Vollelektrolytlösungen mit Azetat sind aber nicht bekannt.

#### **Sterofundin<sup>®</sup> ISO zeigt keine der bei den Kolloiden *in vivo* und *in vitro* gesehenen Schädigungsmuster**

Die histopathologischen Bilder der septischen Rattenniere von Schick et al. hatte gezeigt, dass es nach Infusion von Sterofundin<sup>®</sup> ISO zu einer generalisierten Zellschwellung gekommen war (siehe Abbildung 4.7) [Schick et al., 2010]. Der erhobene „total injury score“ zeigte allerdings – im Gegensatz zu den kolloidal behandelten Tieren – keinen Unterschied zu der von „sham — treated animals“. Dies galt auch für die mit

0,9% NaCl behandelten Ratten.



**Abb. 4.7:** Histopathologische Bilder der septischen Rattenniere in der HE – Färbung . (A) mit 0,9% NaCl behandelte Ratte, (B) mit Sterofundin<sup>®</sup> ISO behandelte Ratte (G = Glomerulus, pT = proximaler Tubulus, dT = distaler Tubulus), aus [Schick et al., 2010]<sup>10</sup>

Im EZ4U (siehe Abbildung 3.18 auf Seite 84) finden sich – nach Korrektur der ausgalenischen Gründen vorhandenen Azidität – in niedrigen Dosierungen keine bis protektive Effekte auf die Zellviabilität. Nur die höchste Dosis von 66,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO senkt die Viabilität leicht, aber statistisch hoch signifikant um  $8,33\% \pm 7,67\% \text{ SD}$ . Verglichen mit den anderen untersuchten Lösungen wirkt Sterofundin<sup>®</sup> ISO also nahezu inert auf die Zellviabilität. Im LDH – Assay – dargestellt in Abbildung 3.37 auf Seite 110 – sind 16,67% und 66,67% Sterofundin<sup>®</sup> ISO leicht zytotoxisch (maximal  $6,38\% \pm 6,33\% \text{ SD}$ ). Damit liegt die kristalloide Lösung aber erneut deutlich unter den für die Kolloide gemessenen Zytotoxizitätswerte. In der qRT – RT – PCR zeigte Sterofundin<sup>®</sup> ISO für den Marker ICAM – 1 keinen Unterschied zur 0% Kontrolle (Abbildung 3.5 auf

<sup>10</sup>Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Schick

Seite 63). Für CCL – 2 hingegen senkte die Lösung als einzige die Expression deutlich. Nach 4 Stunden war diese Reduktion sogar statistisch hoch signifikant (Abbildung 3.6 auf Seite 64).

In der Zusammenschau zeigte Sterofundin® ISO von allen *in vitro* untersuchten Infusionslösungen die geringsten negativen Effekte auf die proximalen Tubulusepithelzellen. Traten diese auf, waren sie vom Ausmaß her marginal im Vergleich zu denen der Kolloide.

## 4.9 Ausblick

Die Volumentherapie im 21. Jahrhundert ist weit entfernt von einem endgültigen international akzeptierten und klinisch untermauerten Konsens. Die Beobachtungen dieser Arbeit werfen viele neue Fragen über den Pathomechanismus und die therapeutischen Möglichkeiten bei der „kolloid induzierten Nierenschädigung“ auf.

### 4.9.1 Die Ergebnisse dieser Arbeit im aktuellen Kontext

**1. Zum Beginn dieser Arbeit 2010 war die Einschätzung über die Risiken von HES anders als 2014:** Es sollte nicht vergessen werden, dass zum Zeitpunkt des Beginns dieser Untersuchungen im August 2010 in Forschung und klinischer Praxis eine völlig andere Situation vorlag. Ein Großteil der Krankenhäuser – mit Ausnahme der nephrologisch geführten Intensivstationen – setzte in der täglichen Routine auf HES (siehe Abbildung 4.5). Die HES – kritischen Studien wurden wegen methodischer Fehler (wie VISEP) abgelehnt. Erst mit der Publikation von CHEST und 6 – S drehte sich die Situation. Inwiefern die Rolle des Forschungs- und Korruptionsskandals von J. Boldt (siehe oben) dabei eine Rolle spielt, ist unklar. Durch die Publikation der CRISTAL – Studie wurde die Situation erneut komplexer (siehe oben).

**2. Die Entscheidung der EMA und die Ergebnisse der Studien sind umstritten:** Es ist damit zu rechnen, dass die Kritiker der HES – kritischen Studien diese Entwicklung nicht ohne Widerspruch akzeptieren. Sowohl das Studiendesign, als auch die Durchführung und Interpretation der Daten der VISEP – Studie, der CHEST – Studie und der 6S – Studie wurden massiv kritisiert. Eine gute Übersicht über die Kernargumente bieten Chappell und Jacob in ihrem 2013 publizierten Review „Hydroxyethyl starch – the importance of being earnest“ [Chappell, 2013a]. Darin kritisieren sie die Entscheidung der EMA (siehe unten), HES restriktiv einzusetzen, scharf:

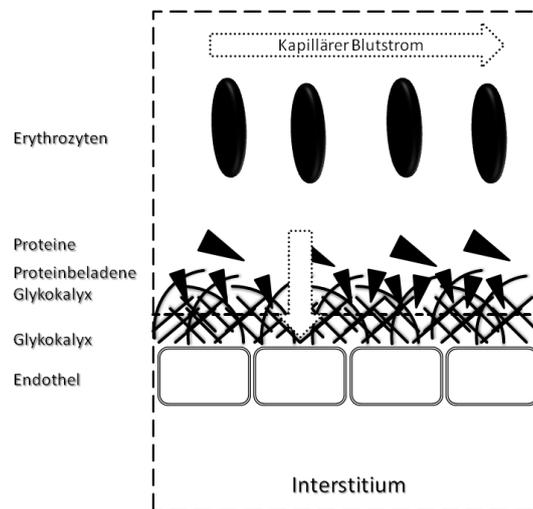
„The benefit of perioperative goal-directed preload optimization using starches is unquestioned. Taking these informations into account, the recommendation of the EMA starches to be generally dangerous remains mysterious and incomprehensible.“ aus [Chappell, 2013a]

Dass die HES – kritischen Autoren eine solche Aussage nicht unkommentiert lassen konnten, führte – nach deren Kritik an Chappells und Jacobs Kommentar – zu einer noch polemischeren Antwort „Twisting and ignoring facts on hydroxyethyl starch is not very helpful.“ [Chappell, 2013b]. Diese Beispiele sollen zwei Aspekte verdeutlichen: Erstens ist die Gruppe der HES – Befürworter – trotz aller Skandale um manipulierte Studien und Forschungsbetrug – nach wie vor sehr präsent und hartnäckig. Zweitens wird der Diskurs ungewöhnlich polemisch und zum Teil auch persönlich angreifend geführt. Dass die pharmazeutische Industrie ein äußerst großes Interesse an einem möglichst breitem Einsatz von kolloidalen Präparaten im Allgemeinen und HES – Präparaten im Speziellen hat, wird aus folgender Kalkulation ersichtlich. Eine 500 ml HES – Lösung kostet ein Vielfaches einer 500 ml kristalloiden Lösung, ohne dass für eine adäquate Volumentherapie vermutlich mehr als das 1,5-fache an Lösung gebraucht wird. Anders formuliert ist es aufgrund dieses gewaltigen Verlustes für die Unternehmen sehr fraglich, ob die aktuelle Indikationseinschränkung von HES langfristig Bestand haben wird.

**3. Die Rolle der Glykokalyx bei der Volumentherapie:** Die endotheliale Glykokalyx, deren Existenz Starling unbekannt war, die endotheliale Basalmembran und die Extrazellulärmatrix scheint eine wichtige Rolle bei der Volumen- und Flüssigkeitstherapie zu spielen [Woodcock and Woodcock, 2012]. Dies rückt die Glykokalyx vor allem durch die Arbeiten von Jacob, Rehm et al. zunehmend ins Zentrum der physiologischen Grundlagen der Volumentherapie. Diese zu den HES-Befürwortern zählende Arbeitsgruppe propagiert einen Vorteil bei der Gabe von HES und anderen Kolloiden. Die Glykokalyx stellt gewissermaßen eine halbdurchlässige Barriere dar und besteht aus Oligosacchariden, die an fast allen membranständigen Proteinen – den „Glykoproteinen“ –, aber auch in geringerer Zahl an Lipiden den – „Glykolipiden“ – kovalent gebunden sind. Die endotheliale Glykokalyx kleidet luminal jedes gesunde Gefäß aus („endothelial surface layer“). Der luminal gelegene Anteil ist dabei eng mit Plasmaproteinen besetzt. Die Entdeckung der Rolle der Glykokalyx führte zur Formulierung des „Revised Principle of Starling“.

„Wird die Glykokalyx zerstört, so geht auch ein Großteil vaskulärer Barrierekompetenz verloren und es kommt zur massiven druckpassiven Verschiebung von Plasmabestandteilen in den interstitiellen Raum.“ aus [Rossaint, 2012], S. 756 ff..

Der Zusammenbruch der Glykokalyx wird demnach durch unterschiedliche Faktoren wie systemische Inflammation oder auch die Volumenüberladung ausgelöst. In diesem Rahmen postulieren die Autoren einen Vorteil durch Kolloide, da diese zu einer Einsparung von Volumenmengen führen können [Rehm et al., 2004] [Jacob et al., 2007] [Levick and Michel, 2010] [Becker et al., 2010]. Dabei konnte die Arbeitsgruppe unter anderem eine leichte Überlegenheit bei der Gabe von Humanalbumin zur Stabilisierung der Glykokalyx feststellen [Jacob et al., 2006]. Diese neuen Aspekte könnten den Anhängern des Einsatzes von Kolloiden neue Argumente dafür liefern, dass der Einsatz von Kolloiden wie HES unverzichtbar sein könnte.



**Abb. 4.8:** Schema über die Rolle der Glykokalyx bei der Volumentherapie. Modifiziert nach [Kozek-Langenecker, 2009].

**4. Die Dissertation untersucht nicht nur die Auswirkungen von HES:** Die vorliegende Arbeit zeigt nicht nur die Auswirkungen von HES, sondern auch der beiden anderen gängigen Kolloide Humanalbumin und Gelatine. Die Ursache dieser „kolloid – induzierten Nierenschädigung (Colloid – induced kidney injury, nach [Schortgen and Brochard, 2009])“ bleibt unklar. Folgt man in den physiologischen Grundüberlegungen weiterhin uneingeschränkt dem Dogma Starlings (siehe Abschnitt 6.1.2 auf Seite 176, [Starling, 1896]), so ist zu erwarten, dass auch nach dem Verschwinden von HES früher oder

später andere kolloidale Lösungen zum Volumenersatz propagiert werden werden, obwohl in den letzten Jahren die physiologischen Grundlagen der Flüssigkeitsverteilung in Frage gestellt und deutlich erweitert wurden [Levick and Michel, 2010].

##### 4.9.2 Offene Fragen

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen viele neue Fragen auf. Nach wie vor ist unklar, ob die HES – Moleküle von basolateral oder luminal in die proximale Tubulusepithelzelle gelangen. Eine entscheidende Frage liegt auch darin, wie die in Abschnitt 4.1 auf Seite 115 gezeigte Aufnahme von HES stattfindet. Wie oben angesprochen ist es auch unklar, ob alle Kolloide über einen ähnlichen bis gleichen Mechanismus die Zellviabilität beeinträchtigen oder andere Reaktionen der Zelle mit demselben Ausgang hervorrufen. Dabei ist nach wie vor unbekannt, wie die Zelle auf die intrazellulären HES – Konglomerate reagiert. Unklar ist außerdem, ob eine Interaktion der proximalen Tubulusepithelzellen mit anderen Zellen wie zum Beispiel Makrophagen bei Kontakt mit HES stattfindet.

## 5 Zusammenfassung

Die Volumentherapie durch Infusionslösungen spielt eine herausragende Rolle im klinischen Alltag von Intensivmedizin, perioperativer Medizin und Notfallmedizin. Für diesen Zweck stehen verschiedene kristalloide und kolloidale Infusionslösungen zur Verfügung. Das in Deutschland am häufigsten eingesetzte Kolloid ist die Hydroxyethylstärke (HES). Dessen Stellenwert ist stark umstritten. Insbesondere die Wirkung von Hydroxyethylstärke auf die für den kritisch Kranken eine zentrale Rolle spielende Niere gilt als zentrales Problem.

Die vorliegende Arbeit untersuchte aufbauend auf die *in vivo* – Versuche von Schick et al. die Auswirkungen klinisch relevanter Dosierungen von Hydroxyethylstärke und anderen Infusionslösungen (Gelatine, Humanalbumin, 0,9% NaCl, Sterofundin® ISO) auf die Viabilität von immortalisierten humanen proximalen Tubulusepithelzellen (HK – 2). Im Anschluss wurde die Relevanz des pH – Wertes, der Osmolalität, der Trägerlösung, des Molekülsprungs, der Molekülgröße, der HES – Generation und der Inkubationsdauer auf die von HES ausgelösten Effekte geprüft. Danach wurde gezeigt, ob der beobachtete Effekt reversibel war, ob es sich um ein direkt zytotoxisches Phänomen handelte, ob die HES – Wirkung durch proinflammatorische Stimuli verstärkt und ob HES selbst eine Inflammation auf mRNA – Ebene induzieren konnte.

HES bewirkte keine proinflammatorische Stimulation der Zellen und wird durch die Anwesenheit proinflammatorischer Stimuli in seiner schädigenden Wirkung nicht verstärkt. Die mitochondriale Leistungsfähigkeit als Schlüsselaspekt des kritisch Kranken wurde durch den EZ4U („Viabilität“) bestimmt. Ein Messartefakt konnte nicht identifiziert werden. HES reduziert mit steigender Dosis die Viabilität der HK – 2 Zellen in deutlichem Ausmaß, obwohl die Zellen immortalisiert und nicht vorgeschädigt waren. Diese Reduktion erfolgte durch alle untersuchten HES – Präparate. Dabei war niedermolekulares HES leicht weniger schädlich als hochmolekulares HES. Der HES – Effekt war unmittelbar nach Beginn der Inkubation nachweisbar. Der Viabilitätsreduktion stand eine verzögert einsetzende Zytotoxizität gegenüber. Der HES – Effekt war auch nach einer „Regenerationsphase“ der Zellen nachweisbar und somit *in vitro* nur partiell reversibel.

Gelatine erwies sich im Vergleich als ebenso bis schlechter verträglich. Gelatine war deutlich zytotoxischer. Humanalbumin zeigte in niedrigen Dosierungen protektive, in

## 5 Zusammenfassung

hohen Dosierungen ebenfalls negative Einfluss auf Zellviabilität und war in höheren Dosierungen zytotoxisch. Die balancierte Vollelektrolytlösung Sterofundin® ISO war größtenteils inert, in seiner Wirkung auf die mRNA im Vergleich zur 0,9% NaCl Kontrolllösung protektiv.

Zusammenfassend konnte eine Überlegenheit des HES der „3. Generation“ gegenüber anderen HES – Präparaten nicht gefunden werden. Alles deutete daraufhin, dass ausschließlich die applizierte Gesamtmasse von HES ausschlaggebend ist. Synthetische Kolloide sind *in vitro* nephrotoxisch und beeinträchtigen die mitochondriale Funktionsfähigkeit deutlich. Diese Beobachtungen entsprechen denen großer klinischer Studien. Die Ursache dieses Phänomens bleibt unklar. Weitere Grundlagenforschung ist notwendig, um den zugrundeliegenden Pathomechanismus aufzuklären.

# 6 Ergänzendes Material

## 6.1 Ein kurzer Abriss über die Geschichte der Infusionstherapie

Es vergingen zunächst mehr als 200 Jahre bis die Entdeckung der physiologischen Grundlage („Blutkreislauf“) der Infusionstherapie im Angesicht humaner Katastrophen wie der Cholera 1832 von einzelnen Ärzten wiederaufgegriffen wurden. Das zu diesem Zeitpunkt verbreitete Beharrungsvermögen des überwiegenden Teils der Ärzteschaft gegen Innovationen verhinderte, dass einzelne Pioniere sich mit dem Konzept der Infusionstherapie durchsetzen konnten. Erst durch die großen europäischen Kriege zwischen 1870 und 1945 wurde wegen der horrenden Verluste unter den Soldaten eine Intensivierung der Forschung notwendig. Dabei entwickelte jedes Land eigene Strategien zur Behebung des Blutverlustes. Lange war umstritten, ob im Falle des akuten Blutverlustes der Infusions- oder der Bluttransfusionstherapie Vorrang gegeben werden sollte. Einige Aspekte dieser Entscheidung finden sich bis heute. So wird zum Beispiel in Deutschland tendenziell mehr Volumentherapie betrieben, während in den USA mehr transfundiert wird [Finfer et al., 2010].

### 6.1.1 Ursprünge der Volumentherapie

Die Geschichte der Volumen- und Infusionstherapie ist durchzogen von dem steten Erfinden, Vergessen und späteren Wiederentdecken der Infusionslösungen. Von der Entdeckung der Physiologie des Blutkreislaufes 1628 durch den englischen Arzt William Harvey<sup>1</sup> und der routinemäßigen Nutzung der intravenösen Applikation war es ein weiter Weg. Interessant ist, dass die ersten volumentherapeutischen Gehversuche nicht etwa auf den Schlachtfeldern entstanden, sondern sehr eng mit dem Aufflackern der Cholera verknüpft sind. Die Cholera stellte im 19. Jahrhundert ein gravierendes Problem der explodierenden Industriestädte Europas und Amerikas dar. Zwischen 1817 und 1899 fegten sieben Pandemien über Europa hinweg [Harris et al., 2012]. Im Angesicht dieser Katastrophe war die damalige Hochschulmedizin nicht in der Lage, effektive Therapiekonzepte zu entwickeln. Herkömmliche Ansätze – wie der Aderlass – verschlimmerten

---

<sup>1</sup>William Harvey, englischer Arzt und Anatom, \*1578 †1657

die Situation der Betroffenen zusätzlich. In dieser Situation entwickelte der englische Mediziner Thomas Latta<sup>2</sup> einen völlig neuen Ansatz: Er beobachtete die Zeichen der Hypovolämie seiner Patienten und beschloss, durch intravenösen Kochsalzlösungen den Flüssigkeitsverlust auszugleichen [Latta, 1832]. International wurden seine Empfehlungen größtenteils ignoriert. Sehr ausführliche Artikel zu Thomas Latta und seinem Kampf für die Infusionstherapie finden sich bei [MacGillivray, 2006] und [Foëx, 2003]. Parallel dazu beschrieb Robert Lewins 1832, wie er ebenfalls im Rahmen der Choleraepidemie Patienten mit intravenöser alkalisierte Kochsalzlösung behandelte. Dabei fiel auf, dass

„(...) the quantity necessary to be injected will probably be found to depend upon on the quantity of serum lost; the object being to place the patient in nearly his ordinary state as to the quantity of blood circulating in the vessels.“ [Lewins, 1832]

Die Beobachtungen bleiben auch nach 200 Jahren gültig [Myburgh and Mythen, 2013].

**Tabelle 6.1:** Übersicht über die Geschichte der Infusionstherapie

Jahr	Entwicklung
1628	Entdeckung des Blutkreislaufes durch Harvey
1832	Intravenösen Kochsalzlösungen gegen Cholera durch Letta und Lewis
1861	Erste Unterscheidung von Kolloiden und Kritalloiden durch Graham
1863	Erste Tiermodelle zur Volumentherapie durch Goltz
1871	Bergmann plädiert für den blutlosen Volumenersatz
1879	Kochsalzlösungen i.v. gegen Cholera durch Pacini gefordert
1880	Aufsehenerregende tierexperimentelle Daten von Kronecker
1882	Intraartielle Infusionen von Kochsalzlösung, u.a. durch Kümmell
1885	Landerer führt die routinemäßige i.v. – Gabe ohne venae sectio ein
1882	0,9% NaCl von H.J. Hamburger
1888	Ringer – Laktat von S. Ringer
1901	Landsteiner entdeckt das AB0 – System der Blutgruppen
1914	Im 1. Weltkrieg wird Gummi arabicum infundiert
1916	Hypertone NaCl – Lösung von Hercher
1939	Periston® (Polyvinylpyrrolidon) von Reppe
1950er	Dextrane und Gelatine werden flächenhaft eingesetzt
1970er	Hydroxyethylstärke wird eingeführt

<sup>2</sup> Thomas Latta, englischer Arzt, „Vater der Infusionstherapie“, \*1793 †1833

1879 veröffentlichte Filippo Pacini<sup>3</sup> eine Arbeit über seine Entdeckung über die Ursachen und die Behandlung der Cholera. Er empfahl seinen Kollegen, zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes Salzlösungen intravenös zu applizieren [Pacini, 1879]. Sowohl seine Entdeckungen als auch seine Therapieideen blieben – wie die von Thomas Latta zuvor – international unbeachtet.

Im selben Zeitraum – den 70er Jahren des 19. Jahrhunderts – diskutierten deutsche Militärärzte und Chirurgen – geprägt vom Verblutungstod deutscher Soldaten im Deutsch – Französischen Krieg – die grundsätzliche Frage, ob zur Behandlung des hypovolämischen (hämorrhagischen) Schocks die Substitution des Plasmas oder der Erythrozyten im Vordergrund stünde. Dabei genoss die (blutlose) Volumentherapie prominente Fürsprecher, wie den Chirurgen Ernst von Bergmann<sup>4</sup> [Bergmann and Buchholtz, 1914]. Dies war allerdings nicht zuletzt auf den Umstand zurückzuführen, dass Bluttransfusionen vor der Entdeckung der Blutgruppen durch K. Landsteiner 1901 häufig tödlich endeten. Trotzdem zögerte Bergmann zunächst, seine Überlegungen auch praktisch umzusetzen.

Parallel dazu erarbeiteten die Physiologen die fehlenden physiologischen Grundlagen der Infusionstherapie. Zunächst konnte 1863 der Königsberger F. Goltz<sup>5</sup> im Tiermodell demonstrieren, dass die periphere Vasokonstriktion im Rahmen der Hypovolämie dazu dienen musste, das Missverhältnis zwischen Gefäßlumen und Gefäßinhalt zu beheben. Er hielt die körpereigene Resorption von Flüssigkeit aus dem Gewebe für zu langsam und schlug vor, zusätzlich Kochsalzlösung zu infundieren [Goerig, 2001].

Kurz darauf postulierten Leipziger Physiologen J. Worm – Müller<sup>6</sup> und L. von Lesser<sup>7</sup>, dass die Blutmenge und der arterielle Druck auf der einen und die Transsudation von Flüssigkeit aus dem Gewebe auf der anderen Seite in einer engen Beziehung stehen müssten.

Dies war der Beginn von umfangreichen tierexperimentelle Arbeiten zur Volumentherapie. Ab 1880 begann – fußend auf Vorarbeiten des Franzosen F. Jolyet<sup>8</sup> – H. Kronecker<sup>9</sup> tierexperimentelle Daten zur Volumentherapie in chirurgischen, gynäkologischen und allgemeinmedizinischen Fachzeitschriften zu veröffentlichen. Zunächst bevorzugten viele Praktiker aus Angst vor negativen Konsequenzen bei der direkten Gefäßinjektionen

---

<sup>3</sup> *Filippo Pacini*, italienischer Anatom und Pathologe, Professor für Anatomie und Histologie in Florenz, \*1812 †1883

<sup>4</sup> *Ernst von Bergmann*, Chirurg und Professor in Dorpat, Würzburg und Berlin, \*1836 †1907

<sup>5</sup> *Friedrich Goltz*, deutscher Physiologe, Professor in Königsberg, \*1834 †1902

<sup>6</sup> *Jacob Worm – Müller*, deutscher Physiologe, \*1834 †1889

<sup>7</sup> *Ladislav Leo von Lesser*, deutscher Physiologe, \*1846 †1895

<sup>8</sup> *Felix Jolyet*, französischer Physiologe, \*1841 †1922

<sup>9</sup> *Hugo Kronecker*, deutscher Physiologe, Berlin, \*1839 †1914

subkutane, intrapertioneale, rektale und auch intraossäre Applikationswege. In diesem Rahmen empfahl zum Beispiel der Gynäkologe E. Schwarz<sup>10</sup>, Infusionen gegen akute Anämien durchzuführen. Andere Gynäkologen wie J. Bischoff<sup>11</sup> führten diese Infusionen dann auch routinemäßig durch, allerdings applizierten sie diese intraarteriell [Schüttler, 2003]. Dies führte zu massiven unerwünschten Arzneimittelwirkungen. So berichtete der Chirurg H. Kümmell<sup>12</sup> 1882 zwar, nur durch eine Kochsalzinfusion eine Patientin gerettet zu haben, publizierte aber genauso, dass die dabei eingesetzte intraarterielle Infusion zu einer Gangrän der Hand mit anschließender Amputation geführt habe [Kümmell, 1882].

Den Beginn ihres endgültigen Durchbruchs in der klinischen Lehre und Praxis verdanken intravenöse Infusionen dem Chirurgen A. Landerer<sup>13</sup>, der 1885 seine Erfahrungen mit diesen publizierte [Landerer, 1886]. Obwohl sich Landerer mit seiner Position durchsetzte und es sich bei seinen Vorschlägen schon 1898 um eine Lehrbuchmeinung [Landerer, 1898] handelte, blieben der rektale und subkutane Applikationsweg zunächst noch deutlich populärer [Schüttler, 2003]. Die eigentliche „Revolution“ von Landerer war dabei, dass er die Punktion der Vene radikal vereinfachte. Gelang bis dahin der übliche Zugang zur Vene über eine Venae sectio, empfahl Landerer, die Vene – wie heute üblich – direkt zu punktieren. Wenig später zogen die Internisten nach und verwendeten Kochsalzlösungen.

Durch die flächendeckende Akzeptanz der Infusionslösungen entstand auch die Notwendigkeit, endlich standardisierte Zusammenstellungen festzulegen. Basierend auf der Beobachtung des Physiologen H. Hamburger<sup>14</sup>, dass eine 0,9% Natriumchlorid-Lösung für Erythrozyten isotonisch – also osmotisch inert – ist, setzte sich die „isotone“ Kochsalzlösung rasch durch. Nur wenig später entwickelte S. Ringer die nach ihm benannte „Ringer – Lösung“ (mehr dazu siehe im Kapitel 1.2.6 auf Seite 8). Neben den wissenschaftlichen Erkenntnissen waren aber auch industrielle Grundlagen zwingend notwendig, denn für die von Landerer propagierte atraumatische Venenpunktion wurden große Mengen an geeigneten Spritzen und Kanülen gebraucht. Im 1. Weltkrieg konnten die Mediziner bereits auf eine Reihe von Infusionslösungen zur Behandlung akuter Volumenmangelzustände zurückgreifen. Wenig später führte die Suche nach Alternativen zur Kochsalzlösung, die dem Blut nicht nur osmotisch, sondern auch chemisch und

<sup>10</sup> *Emil Schwarz*, deutscher Gynäkologe, \*1865 †1918

<sup>11</sup> *Johann Jacob Bischoff*, Gynäkologe in Basel, \*1841 †1892

<sup>12</sup> *Hermann Kümmell*, Chirurg in Hamburg, \*1857 †1937

<sup>13</sup> *Albert Sigmund Landerer*, deutscher Chirurg, Professor in Leipzig, \*1854 †1904

<sup>14</sup> *Hartog Jacob Hamburger*, niederländischer Physiologe, \*1859 †1925

physikalisch näher kamen, zur Einführung von „Normosal“ (nach W. Straub<sup>15</sup>) und „Tutofusin“ (nach W. Weichardt<sup>16</sup>, vgl. Abbildung 6.2). Tutofusin wird heute noch verwendet und durch die Firma Baxter<sup>®</sup> vertrieben.

**Tabelle 6.2:** Zusammensetzung: Tutofusin<sup>®</sup>

Elektrolyte [mmol/l]	Blutplasma	Tutofusin <sup>®</sup>
<b>Natrium</b>	140	140
<b>Kalium</b>	4,5	5,0
<b>Calcium</b>	2,5	2,5
<b>Magnesium</b>	1,0	1,5
<b>Chlorid</b>	101	153
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	26	
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	1,2	

### 6.1.2 Entwicklung der Kolloide

Dem Dogma Starlings folgend hielt man diese kristalloiden Lösungen für ungeeignet, um das zirkulierende Blutvolumen dauerhaft zu erhöhen. Neben den Vorläufern kristalloider Lösungen (siehe Kapitel 1.2.6 auf Seite 6), wurden deshalb erste Alternativen entwickelt. Grundüberlegung war, dass der kolloidosmotische Druck einer Flüssigkeit der entscheidende Parameter für die intravasale Verweildauer war. So folgte E. Starling<sup>17</sup>, dass mit der Applikation von Kochsalzlösung zwar zunächst das intravasale Volumen ansteige, dann aber durch die gleichzeitige relative Abnahme der Plasmaproteinkonzentration auch der kolloidosmotische Druck sinken müsse. Letztes führe wiederum zur Abwanderung der Flüssigkeit von intra- nach extravasal, so dass der Volumeneffekt rasch schwände.

Um diese Probleme zu lösen, wurde unter anderem versucht, durch Beimischung von Gummi arabicum<sup>18</sup> die intravasale Verweildauer der Kochsalzlösungen zu erhöhen. Diese Versuche mündeten zwar in einem hervorragenden Volumeneffekt, gingen aber mit massiven Nebenwirkungen wie Schüttelfrost und Fieber einher. Infolgedessen sprach die American Medical Association 1922 eine offizielle Warnung vor der „Gum – saline“ aus.

<sup>15</sup> Walter Straub, Freiburger Pharmakologe, \*1874 †1944

<sup>16</sup> Wolfgang Weichardt, Erlanger Internist, \*1875 †1945

<sup>17</sup> Ernest Henry Starling, englischer Physiologe, \*1866 †1927

<sup>18</sup> Aus Akazien gewonnenes natürliches Polysaccharid

Spätestens 1937 verschwand es zunehmend aus der klinischen Praxis, da die Toxizität, die Antigenität und die Tendenz zur Leberzerstörung der schwer zu klassifizierenden Polysaccharide erkannt wurde [Le Gal, 1975].

1915 schlug J. Hogan vor, Gelatine zu benutzen [Hogan, 1915]. Diese Idee konnte sich aber zunächst aufgrund multipler schwerster Nebenwirkungen und der Furcht vor Kontamination mit Tetanus und *Bacillus anthracis* nicht durchsetzen [Le Gal, 1975]. Deshalb galten weiterhin Kochsalzlösungen mit zugesetzten Vasopressoren als Mittel der Wahl. Parallel zu dieser Idee entstand auch das Konzept der hypertonen Kochsalzlösung. F. Hercher<sup>19</sup> beobachtete bei kritisch verletzten Soldaten, dass bereits wenige Milliliter von hochkonzentrierter Kochsalzlösung genügten, um den Kreislauf zu stabilisieren [Hercher, 1916]. Diese Beobachtung mündete in der industriellen Produktion von „Schockalarose“, einem Vorläufer der so genannten „Small – Volume Resuscitation“. Bis zur (Wieder-) Entdeckung dieses Konzepts Anfang der 80er Jahre (siehe Abschnitt 1.2.7 auf Seite 24) geriet die stark hypertone Volumentherapie jedoch zunächst vorläufig wieder in Vergessenheit [Goerig, 2001].

Mit dem Ende des 1. Weltkrieges endete vorerst auch die Erforschung marktreifer kolloidaler Lösungen zur Volumentherapie. In diesem Zusammenhang war 1923 W. Cannons Beobachtung grundlegend, dass für die Ausbildung eines Schock weniger der akute Blutverlust als vielmehr der intravasale Volumenmangel von Bedeutung war [Cannon, 1923]. Erst mit dem Ausbruch des 2. Weltkrieges wurden die Bemühungen wieder intensiviert. Ziel der Suche war ein künstlich (massenhaft) herstellbares und chemisch inertes Kolloid. Den Anfang machten deutsche Militärärzte, die auf das 1939 von W. Reppe<sup>20</sup> entwickelte Polyvinylpyrrolidon<sup>21</sup> zurückgriffen. Vertrieben wurde dieser vielfach und erfolgreich angewandte Plasmaexpander unter dem Namen „Periston“ [Duesberg, 1944] [Weese, 1943]. Hauptproblem war, dass Polyvinylpyrrolidon nicht abgebaut werden kann, da entsprechende Enzyme nicht vorhanden sind. Wie andere Kolloide auch wird es durch das mononukleäre Phagozytose-System (MPS) phagozytiert und lagert sich in bestimmten Organen ab. In tierexperimentellen Studien stellte man außerdem auch eine permanente Ablagerung von PVP in der Niere fest. Das pathologische Korrelat dafür wurde „Kolloidnieren“ genannt [Heinlein, 1958].

Parallel wurde es durch die Entdeckung der Blutfraktionierung im Jahre 1941 möglich, erstmals Humanalbumin in großen Mengen für Patienten zur Verfügung zu stellen, die im Rahmen des Überfalls auf Pearl Harbor Verbrennungen erlitten hatten [Myburgh

---

<sup>19</sup> *Friedrich Hercher*, deutscher Chirurg, \*1881 †1958

<sup>20</sup> *Walter Reppe*, deutscher Chemiker bei BASF, \*1892 †1969

<sup>21</sup> Polyvinylpyrrolidon, PVP, auch Polyvidon oder Povidon, ein Polymer der Verbindung Vinylpyrrolidon

and Mythen, 2013]. Mit dem Ende des 2. Weltkriegs wurde „Periston“ deshalb zunehmend durch die besser verträgliche Kolloide Dextrane und Gelatine verdrängt und ersetzt. In den 70er Jahren wurde die 1. Generation der Hydroxyethylstärke auf dem Markt eingeführt. Diese traten in vielen Ländern der Welt rasch in den Vordergrund. HES galt dabei als zuverlässiger Plasmaexpander ohne klinische Toxizität [Lee WH Jr, 1968].

Weltweit entwickelten von Land zu Land und oft von Krankenhaus zu Krankenhaus höchst unterschiedliche Konzepte beim Volumenersatz. Während Deutschland mehrheitlich Hydroxyethylstärke anwendet, hat diese zum Beispiel in den USA einen sehr geringen Stellenwert. Häufig werden die heutigen Positionen bei der Wahl des Kolloides stark durch historische und (national-) ökonomische Faktoren beeinflusst.

## 6.2 Wie die Nephrotoxizität von HES in den Vordergrund der Diskussion rückte

Bei der oben zitierten Auswahl von aktuellen klinischen Studien und Reviews stand das Gesamt – Outcome der Patienten im Vordergrund. Dabei wird insbesondere der internationale Diskurs um die potentielle Nephrotoxizität von HES seit Jahren am lebhaftesten geführt. Ein Konsens konnte lange Zeit nicht gefunden werden. So gibt es Übersichtsarbeiten, denen zufolge eine HES – Applikation HES 130 / 0,4 nicht mit einer erhöhten Rate an Nierenversagen assoziiert ist [Boussekey et al., 2010]. Besonders gefährlich schien HES im Kontext der Kombination aus Sepsis und akuter Nierenschädigung zu sein. In der Literatur finden sich unabhängig vom Einsatz von HES bereits bis auf das 6,5–fache gesteigerte Letalitätsraten septischer Patienten im Vergleich zu Patienten ohne ein akutes Nierenversagen. Außerdem verlängert sich deren stationärer Aufenthalt [Bagshaw et al., 2008]. Auffällig ist, dass bereits nicht – septische Infektionen, wie unkomplizierte Pneumonien, das Risiko für ein akutes Nierenversagen und damit auch die Mortalität erhöhen [Murugan and Karajala-Subramanyam, 2010]. Besonders ältere Patienten mit einer Nierenschädigung haben eine deutlich schlechtere Prognose [Ishani et al., 2009]. Zentraler Angriffspunkt beim Kampf gegen die Sepsis gilt in der Frühphase die Stabilisierung der Hämodynamik [Licari et al., 2007]. Die so genannte „Early Goal directed therapy“ verbessert nicht nur das Outcome der Patienten, sondern mindert auch das Auftreten von Organkomplikationen, wie das septische Nierenversagen [Dellinger et al., 2008] [Rivers et al., 2001]. Die frühzeitige und effektive Infusionstherapie stellt dabei den Grundpfeiler der Therapie dar, um die Niere zu

schützen. Die Wahl des geeigneten Volumenersatzmittels zur schnellen und nachhaltigen hämodynamischen Stabilisierung ist seit langem umstritten. HES galt dabei lange den Kristalloiden wegen seiner Fähigkeit zur Volumenexpansion überlegen. Der bei zu aggressiver Infusion kristalloider Lösungen befürchtete so genannte „Fluid overload“ ist mit einem deutlich schlechteren Outcome assoziiert [Cerdea et al., 2010] [Payen et al., 2008]. Auch bei diesem Problemkomplex nimmt die Niere abermals eine Schlüsselstellung ein [Bouchard et al., 2009].

Der Paradigmenwechsel in der Volumentherapie begann im Kontext der hämodynamischen Stabilisierung bei septischen Patienten. Exemplarisch deutlich wird dies, wenn man die Änderungen der Sepsis – Guidelines von 2008 und 2010 betrachtet. So galt 2008 in den „international guidelines for management of severe sepsis and septic shock“ der Surviving Sepsis Campaign:

„We recommend fluid resuscitation with either natural/artificial colloids or crystalloids. There is no evidence-based support for one type of fluid over another (grade1B)“ [Dellinger et al., 2008]

In der deutschen 2k – Leitlinie von 2010 hingegen sind folgende Aussagen zu finden:

„Nach der gegenwärtigen Datenlage kann der Einsatz von niedermolekularen HAES – Lösungen und anderen künstlichen kolloidalen Lösungen bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock nicht empfohlen werden.

*Empfehlung Grad E (Evidenzgrad V: Expertenmeinung)*

Bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock kann eine Gabe von Humanalbumin erwogen werden.

*Empfehlung Grad E (Evidenzgrad V: Expertenmeinung)*

Wir empfehlen zur hämodynamischen Stabilisierung einen Volumenersatz mit kristalloiden Lösungen.

*Empfehlung Grad B (Evidenzgrad Ib für 235)“*

Ursächlich für die Änderung ist unter anderem der Abbruch der von Zander und Boldt [Zander et al., 2007] kritisierten VISEP – Studie (Volumen– und Insulintherapie bei schwerer Sepsis und septischem Schock) [Brunkhorst et al., 2008].

### 6.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Hydroxyethylstärke

Wie in Abschnitt 1.2.7 auf Seite 15 angesprochen, hat HES einige typische unerwünschte Arzneimittelwirkungen. In der Fachliteratur findet sich ein großes Spektrum bestehend aus:

1. *Verschlechterung der Gerinnungsfunktion bei größeren (kardiochirurgischen) Eingriffen:*

Die Ursache der Gerinnungshemmung ist unter anderem der so genannte „Coating – Effekt“. So ist für Hydroxyethylstärke (und Dextrane) beschrieben, dass es ab einer gewissen Dosis dazu kommen kann, dass Thrombozyten von einem Film des Kolloids umgeben werden können und so deren Gerinnungsfähigkeit eingeschränkt wird [Lang-Roth and Karow, 2005]. Dies betrifft vor allem die niedermolekularen Fraktionen. Daneben beeinflusst HES auch die plasmatische Gerinnung. Ursache dieser Beeinträchtigung sind aber die hochmolekularen Fraktionen des HES. Sie sollen durch eine Verminderung des Ristocetin – Kofaktors<sup>22</sup> dazu führen, dass die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten am Gefäßendothel und an einander abnimmt. Außerdem senkt hochmolekulares HES auch die Aktivität des „Willebrand – Faktor – VIII – Komplexes“ [Thiel and Roewer, 2009]. Die klinische Bedeutung dieses Phänomens indes ist umstritten. Im Lehrbuch findet sich die Aussage, dass HES aller Generationen keine „nennenswerte“ Gerinnungsbeeinträchtigung habe (siehe [Thiel and Roewer, 2009], S.242). Trotzdem kommen viele klinische Studien zu einem anderen Ergebnis (e.g. [Schramko et al., 2009], [Hecht-Dolnik et al., 2009]). So kommt eine umfangreiche Metaanalyse von Navickis et al. aus dem Jahr 2012 mit fast tausend Patienten zu dem Schluss:

„Hydroxyethyl starch increased blood loss, reoperation for bleeding, and blood product transfusion after cardiopulmonary bypass. There was no evidence that these risks could be mitigated by lower molecular weight and substitution [Navickis et al., 2012].“

2. *Gewebeeinlagerung mit dem Risiko eines Organversagens:*

Die bereits oben erwähnt, wird HES teilweise durch das MPS phagozytiert. Die Phagozytose und somit die Immunkompetenz der Makrophagen wird dabei nicht beeinträchtigt. Es kommt zur Vakuolenbildung, Zellschwellung und lysosomalen

---

<sup>22</sup>Ristocetin ist ursprünglich ein Antibiotikum

Speicherung. Diese sind als Ablagerungen im Gewebe sind mikroskopisch gut sichtbar (vgl. [Kamann et al., 2007]), deren zeitlicher Verlauf und interindividuell stark unterschiedlich ausgeprägt sein können (vgl. [Sirtl et al., 1999]). Dieses Phänomen ist vermutlich ursächlich für den Pruritus und die Hepatosplenomegalie.

### 3. *Pruritus:*

Für den bei jedem HES – Präparat möglichen Pruritus prädisponieren erstens die applizierte Gesamtdosis von HES, zweitens eine verlangsamte Elimination (z.B. bei Applikation von hochmolekularem und –substituiertem HES) und drittens das Vorliegen bestimmter Vorerkrankungen (e.g. Hörsturz, Schalltrauma) [Thiel and Roewer, 2009]. Die Auswirkungen des – meist therapierefraktären – Pruritus auf die Lebensqualität eines Patienten werden bei der Anwendung häufig unterschätzt, nicht selten führt dieser zu Schlafstörungen, permanentem Stress und massiver Störung des täglichen Lebens [Bork, 2005]. Als ursächlich für den Juckreiz gilt die Ablagerung von HES in den Zellen des Endo-, Perineuriums und den Schwann – Zellen [Ständer et al., 2001]. Eine aktuelle „post-hoc“ Analyse der Überlebenden der 6S-Studie von Perner et al. [Perner et al., 2012] durch Wittbrodt et al. zeigte, dass HES-Patienten nicht über einen signifikant gesteigerten Pruritus litten [Wittbrodt et al., 2013]. Demgegenüber zeigten Ständer et al. 2014 in einer Studie an 70 Patienten, dass - unabhängig von der Art des HES – Präparates - Pruritus für 80% der Patienten ein großes Problem darstellt [Ständer et al., 2014].

### 4. *Hepatosplenomegalie:*

Leber und Milz enthalten besonders viele Makrophagen. Entsprechend werden dort zum Teil auch erhebliche Mengen an HES phagozytiert. Es kommt zur exzessiven Vakuolisierung und konsekutiven Zellschwellung. Es ist beschrieben, dass hierdurch nicht nur die Leber makroskopisch anschwellen kann, sondern sogar die Lebersinusoiden so stark komprimiert werden können, dass sich eine portale Hypertension entwickeln kann. Dies kann so weit gehen, dass sich eine Milzstauung und auch ein Aszites manifestieren [Thiel and Roewer, 2009]. Diese Komplikation wird vor allem für Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz beschrieben [Dienes et al., 1986].

### 5. *Anaphylaktoid – anaphylaktische Reaktionen:*

Die Inzidenz von anaphylaktoid–anaphylaktische Reaktionen ist bei HES unter allen Kolloiden am geringsten. Sie wird mit etwa 0,06% angegeben [Laxenaire et al., 1994].

### 6. *Nierenschädigung:*

Inwiefern HES die Nierenfunktion beeinträchtigt, ist äußerst umstritten. Viele Reviews sehen einen Zusammenhang zwischen der infundierten HES – Menge und der darauf folgenden Notwendigkeit von Nierenersatzverfahren (z.B. [Zarychanski et al., 2009]). Die Studienlage zu diesem HES – assoziierten Nierenschaden ist unübersichtlich, die internationale Diskussion seit Jahren höchst kontrovers. Der in diesem Zusammenhang auftauchende Begriff der „osmotischen Nephrose“ wird in Kapitel 4.3.1 auf Seite 121 näher erläutert. Da die Nierenproblematik von HES der Schwerpunkt dieser Dissertation sein soll, sei an dieser Stelle aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Diskussion in Kapitel 4 auf Seite 115 für die ausführliche Darstellung dieser Thematik verwiesen.

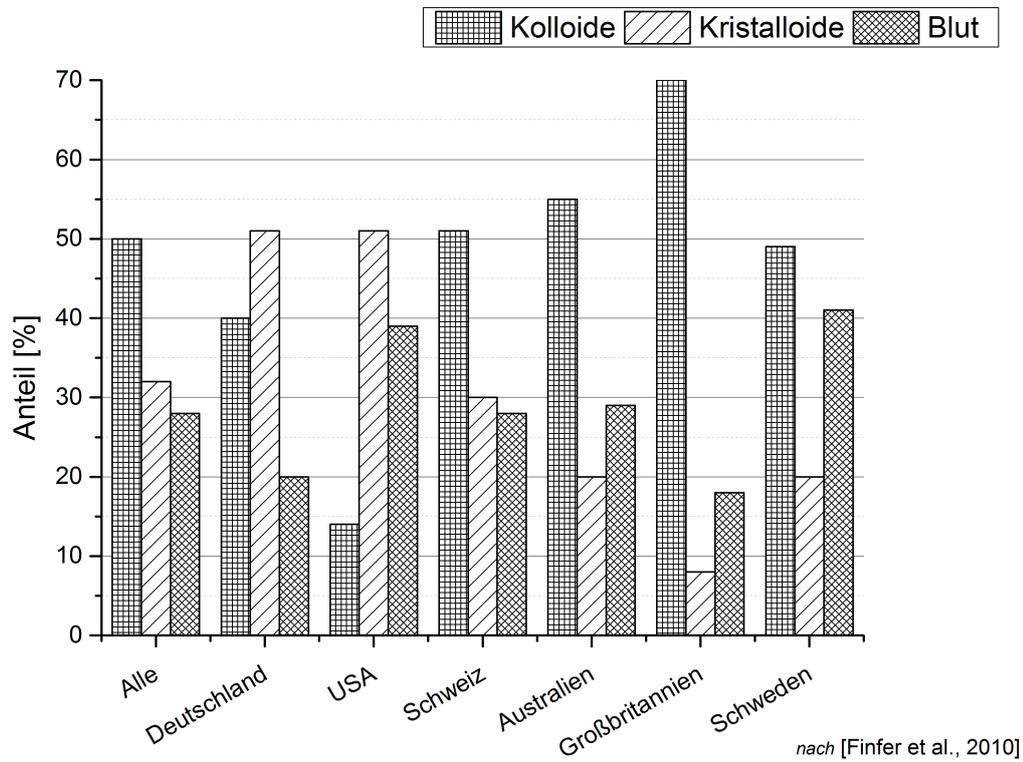
## 6.4 Zusätzliche Abbildungen

### 6.4.1 Abbildungen zur Studienlage zur Therapie mit Kolloiden, insbesondere zum Einsatz von HES

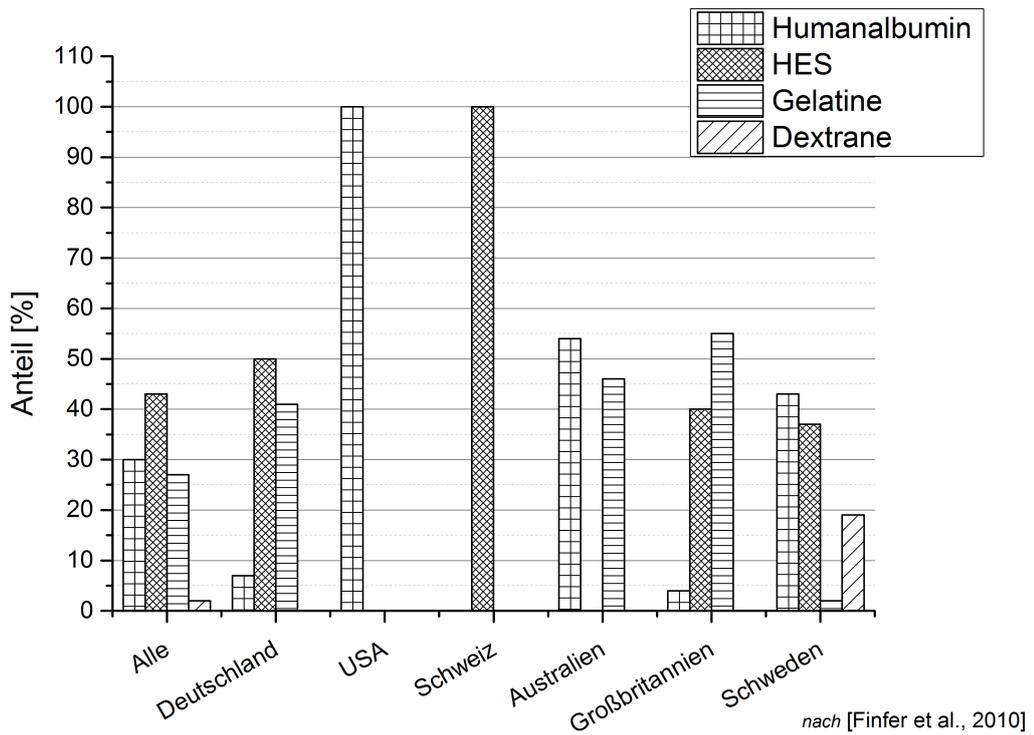
**Tabelle 6.3:** Zusammenfassung der Diskrepanz des theoretischen Modells und der klinischen Studien über Kolloide. Modifiziert nach der Übersicht von Hartog et al. im Kapitel „Volumentherapie“ des Lehrbuches „Intensivmedizin“, Van Aken et al., Thieme 2014 [Hartog, 2014].

Effekt	Historische	Argumente	Ergebnisse aus großen klinischen Studien
	pro Kristalloide	pro Kolloide	
<b>Volumenwirkung</b>	langsam, sowohl im Plasmavolumen (PV) als auch im Extrazellulärvolumen (EZV)	schnell, v.a. im PV	kein Unterschied bzgl. der <i>definitiven</i> hämodynamischen Stabilisierung
<b>Volumenmenge</b>	periphere Ödeme sind klinisch nicht relevant	Kristalloide müssen in einem 4-fach höheren Volumen eingesetzt werden, im „Capillary Leak“ sogar noch mehr erforderlich	Kristalloid / Kolloid – Volumenquotient ist bei intensivmedizinischen und septischen Patienten unter 2
<b>Ödeme</b>	überschüssiges Volumen leicht mobilisierbar, Kolloide dagegen binden Wasser im EZV	Kolloide ziehen Wasser aus dem EZV, Kristalloide dagegen erhöhen Wassergehalt im EZV	Kristalloide oder Kolloide haben keinen unterschiedlichen Einfluss auf Lungenödem und pulmonale Permeabilität
<b>KOD (= kolloidosmotischer Druck)</b>	KOD erniedrigt, nicht ausschlaggebend	KOD erhöht, reduziert Ödeme	
<b>Kosten</b>	gering	synthetische Kolloide kosten weniger als Albumin bei gleicher Wirkung	bei vergleichbarem klinischen Outcome wesentlich geringere Kosten mit kristalloiden Lösungen

6.4.2 Weltweite Verteilung der einzelnen Infusionslösungen



**Abb. 6.1:** Übersicht über den weltweiten Einsatz von Infusionslösungen nach Land. Angaben in [%]. Auswahl von Daten nach [Finfer et al., 2010]



**Abb. 6.2:** Übersicht über den weltweiten Einsatz von Kolloiden nach Land. Angaben in [%].  
Auswahl von Daten nach [Finfer et al., 2010]

### 6.4.3 Zusammensetzung der einzelnen Infusionslösungen

**Tabelle 6.7:** Zusammensetzung: 0,9% NaCl – Lösung

Elektrolyte	Blutplasma	0,9% NaCl – Lösung
[mmol/l]		
Natrium	140	154
Kalium	4,5	
Calcium	2,5	
Magnesium	1,0	
Chlorid	101	154
Laktat		
$\text{HCO}_3^-$	26	
$\text{PO}_4^{3-}$	1,2	

## 6 Ergänzendes Material

**Tabelle 6.8:** Zusammensetzung: Ringer – Lösung

Elektrolyte	Blutplasma	Ringer – Lösung
[mmol/l]		
Natrium	140	147
Kalium	4,5	4,0
Calcium	2,5	2,3
Magnesium	1,0	
Chlorid	101	156
Laktat		
$\text{HCO}_3^-$	26	
$\text{PO}_4^{3-}$	1,2	

**Tabelle 6.9:** Zusammensetzung: Ringer – Laktat

Elektrolyte	Blutplasma	Ringer – Laktat
[mmol/l]		
Natrium	140	125 - 134
Kalium	4,5	4,0 - 5,4
Calcium	2,5	0,9 - 2,0
Magnesium	1,0	
Chlorid	101	106 - 117
Laktat		25 - 31
$\text{HCO}_3^-$	26	
$\text{PO}_4^{3-}$	1,2	

## 6 Ergänzendes Material

**Tabelle 6.10:** Zusammensetzung: Sterofundin® ISO

Elektrolyte	Blutplasma	Sterofundin® ISO
<i>[mmol/l]</i>		
Natrium	140	145
Kalium	4,5	4,0
Calcium	2,5	2,5
Magnesium	1,0	
Chlorid	101	127
Azetat		24
Malat		5,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26	
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1,2	

**Tabelle 6.11:** Zusammensetzung: Jonosteril®

Elektrolyte	Blutplasma	Jonosteril®
<i>[mmol/l]</i>		
Natrium	140	137
Kalium	4,5	4,0
Calcium	2,5	1,65
Magnesium	1,0	1,25
Chlorid	101	110
Azetat		36,8
Malat		
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	26	
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1,2	

**Tabelle 6.12:** Zusammensetzung: PlasmaLyte® A

Elektrolyte [mmol / l]	Blutplasma	PlasmaLyte® A
<b>Natrium</b>	140	140
<b>Kalium</b>	4,5	5,0
<b>Calcium</b>	2,5	
<b>Magnesium</b>	1,0	3,0
<b>Chlorid</b>	101	98
<b>Azetat</b>		27
<b>Malat</b>		
<b>Glukonat</b>		23
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>		26
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>		1,2

#### 6.4.4 Andere balancierte Vollelektrolytlösungen

Eine andere häufig eingesetzte balancierte Vollelektrolytlösung ist Jonosteril® von FreseniusKabi. Jonosteril® unterscheidet sich hinsichtlich seiner Zusammensetzung in einigen Punkten von Sterofundin® ISO (siehe Tabelle 6.11). So enthält Jonosteril® mehr Azetat, aber kein Malat. Anwendungsspektrum, Kontraindikation und unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind aber mit denen des Sterofundin® ISO vergleichbar. Eine andere, in Deutschland kaum gebräuchliche balancierte Vollelektrolytlösung ist PlasmaLyte® A von der Firma Baxter. Die Zusammensetzung dieser Infusionslösung wird in Abbildung 6.12 gezeigt. PlasmaLyte® A enthält kein Calcium und weniger Chlorid als Sterofundin® ISO. Als metabolisierbare Anionen greift es auf Azetat und Glukonat zurück.

Tabelle 6.4: Auswahl wichtiger klinischer Studien zu HES. Patienten und Indikationen. Nach [Zarychanski et al., 2013]

Studie	Autoren [Jahr]	Indikation	Trigger	Intervention [h]	Kontrolle [h]
WISEP	Brunkhorst 2008	Septischer Schock	ZVD < 8 mmHg MAP < 70 mmHg	10% HES 200 0,45 – 0, 55 <sup>†</sup>	Ringer – Laktat
				[297]	[303]
CRYSTMAS	Guidet 2012	Schwere Sepsis	ZVD < 8 mmHg MAP < 65 mmHg  U/O < 2 ml / kg KG	6% HES 130 / 0,4 [100]	0,9% NaCl [96]
CHEST	Myburgh 2012	Hypovolämie	ZVD < 10 mmHg MAP < 75 mmHg  U/O < 0,5 ml / kg KG für 1h (u.v.m. <sup>a</sup> )	6% HES 130 / 0,4 [3500]	0,9% NaCl [3500]
6-S	Perner 2012	Septischer Schock	Einschätzung des  Intensivarztes <sup>b</sup>	6% HES 130 / 0,42 [400]	Ringer – Azetat [400]

<sup>a</sup>Herzfrequenz > 0 pro Minute, RR sys. < 100 mmHg oder mittlerer arterieller Druck < 75 mmHg oder eine Abfall um 40 mmHg im Vergleich zur „Baseline“, ZVD 10 mmHg, Pulmonal – arterieller Wedge – Druck < 12 mmHg, Respiratorische Varianz des artiiellen Blutdrucks um > 5 mmHg, Kapilläre Füllung > Sekunde. Siehe Appendix von [Myburgh et al., 2012]

<sup>b</sup>siehe [Perner et al., 2012]

**Tabelle 6.5:** Auswahl wichtiger klinischer Studien zu HES. **Mortalität.** Nach [Zarychanski et al., 2013]

<b>Studie</b>	<b>Autoren [Jahr]</b>	<b>Mortalität [n]</b>	<b>HES Mortalität [n]</b>	<b>Kontrolle Mortalität [n]</b>	<b>RR (95% CI)<sup>a</sup></b>
WISEP	Brunkhorst 2008	[107] 297	[93] 303		1,17 (0,94 – 1,47)
CRYSTMAS	Guidet 2012	[40] 100	[32] 96		1,20 (0,83 – 1,74)
CHEST	Myburgh 2012	[597] 3500	[566] 3500		1,05 (0,95 – 1,17)
6-S	Perner 2012	[201] 400	[172] 400		1,17 (1,01 – 1,36)

<sup>a</sup>CI: Konfidenzintervall

**Tabelle 6.6:** Auswahl wichtiger klinischer Studien zu HES. Nierenersatzverfahren (= „NEV“). Nach [Zarychanski et al., 2013]

Studie	Autoren [Jahr]	NEV HES [n]	NEV Kontrolle [n]	RR (95% CI) <sup>a</sup>
WISEP	Brunkhorst 2008	[81] 297	[51] 303	1,62 (1,19 – 2,21)
CRYSTMAS	Guidet 2012	[21] 100	[11] 96	1,83 (0,93 – 3,59)
CHEST	Myburgh 2012	[235] 3500	[196] 3500	1,20 (1,00 – 1,44)
6-S	Perner 2012	[87] 400	[65] 400	1,34 (1,00 – 1,79)

<sup>a</sup>CI: Konfidenzintervall

Tabelle 6.13: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
$\mu\text{m}$	Mikrometer
APTS	8 – Aminopyrene – 1, 3, 6 – trisulfonic Säure
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CCL – 2	Chemokine (C – C motif) Ligand 2
CD54	Cluster of Differentiation 54 (= ICAM – 1)
CI	kumulative Inzidenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	European Medicines Agency
EPH – Gestose	alter Begriff für Präeklampsie, Ödeme ( <b>Edema</b> ), <b>Proteinurie</b> und <b>Hypertension</b>
e.g.	exemplum gratia (lat. zum Beispiel)
EZ4U	„Easy for you“, nichtradioaktiver Zellproliferations– und zytotoxizitätstest
FCS	Fetal calf serum
ICAM – 1	Intercellular Adhesion Molecule 1
$\text{HCO}_3^-$	(Natrium–) Hydrogencarbonat, Bicarbonat
HES	Hydroxyethylstärke
HK – 2	Human kidney 2
HWZ	Halbwertszeit
kDa	1000 Dalton, Maß für die atomare Masse
LPS	Lipopolysaccharid
MCP – 1	monocyte chemoattractant protein – 1
ml	Milliliter
NEJM	New England Journal of Medicine
nm	Nanometer
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat – gepufferte Salzlösung
pH	pH – Wert
$\text{PO}_4^{3-}$	Phosphat
ppm	parts per million, 1 ppm = 1 Teil pro Million = 0,0001%
PRAC	Pharmacovigilance Risk Assessment Committee der EMA
LDH	Laktatdehydrogenase
RT – PCR	Real – Time – Polymerasechainreaction
RNA	Ribonukleinsäure
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
$\text{TNF}\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VEL	Vollelektrolytlösung
RT – PCR	quantitative polymerase chain reaction

# Literaturverzeichnis

- [Adams, 2007] Adams, H. A. (2007). Volumen- und flüssigkeitsersatz - physiologie, pathophysiologie, pharmakologie und klinischer einsatz. *Anästhesiologie & Intensivmedizin*, 9:448–460.
- [Allen, 1951] Allen, A. C. (1951). Clinico-pathologic correlation of nephrosis. *Wis Med J*, 50(12):1204.
- [Annane et al., 2013] Annane, D., Siami, S., Jaber, S., Martin, C., Elatrous, S., Declère, A. D., Preiser, J. C., Outin, H., Troché, G., Charpentier, C., Trouillet, J. L., Kimmoun, A., Forceville, X., Darmon, M., Lesur, O., Reignier, J., Régnier, J., Abroug, F., Berger, P., Clec'h, C., Cle'h, C., Cousson, J., Thibault, L., Chevret, S., and , C. R. I. S. T. A. L. I. (2013). Effects of fluid resuscitation with colloids vs crystalloids on mortality in critically ill patients presenting with hypovolemic shock: the cristal randomized trial. *JAMA*, 310(17):1809–1817.
- [Antonelli and Sandroni, 2013] Antonelli, M. and Sandroni, C. (2013). Hydroxyethyl starch for intravenous volume replacement: more harm than benefit. *JAMA*, 309(7):723–724.
- [Awad et al., 2008] Awad, S., Allison, S. P., and Lobo, D. N. (2008). The history of 0.9% saline. *Clin Nutr*, 27(2):179–188.
- [Awad et al., 2012] Awad, S., Dharmavaram, S., Wearn, C. S., Dube, M. G., and Lobo, D. N. (2012). Effects of an intraoperative infusion of 4% succinylated gelatine (gelofusine) and 6% hydroxyethyl starch (voluven) on blood volume. *Br J Anaesth*, 109(2):168–176.
- [Bae et al., 2013] Bae, E. H., Kim, I. J., Joo, S. Y., Kim, E. Y., Choi, J. S., Kim, C. S., Ma, S. K., Lee, J., and Kim, S. W. (2013). Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*.
- [Bagshaw et al., 2008] Bagshaw, S. M., George, C., Bellomo, R., and , A. N. Z. I. C. S. D. M. C. (2008). Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care*, 12(2):R47.

- [Bakker et al., 1996] Bakker, J., Gris, P., Coffernils, M., Kahn, R. J., and Vincent, J. L. (1996). Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *Am J Surg*, 171(2):221–226.
- [Ballinger et al., 1966] Ballinger, 2nd, W., Solanke, T. F., and Thompson, W. L. (1966). The effect of hydroxyethyl starch upon survival of dogs subjected to hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet*, 122(1):33–36.
- [Banks et al., 1973] Banks, W., Greenwood, C. T., and Muir, D. D. (1973). The structure of hydroxyethyl starch. *Br J Pharmacol*, 47(1):172–178.
- [Base et al., 2011] Base, E. M., Standl, T., Lassnigg, A., Skhirtladze, K., Jungheinrich, C., Gayko, D., and Hiesmayr, M. (2011). Efficacy and safety of hydroxyethyl starch 6% 130/0.4 in a balanced electrolyte solution (volulyte) during cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 25(3):407–414.
- [Basnayake et al., 2010] Basnayake, K., Ying, W.-Z., Wang, P.-X., and Sanders, P. W. (2010). Immunoglobulin light chains activate tubular epithelial cells through redox signaling. *J Am Soc Nephrol*, 21(7):1165–1173.
- [Bauer et al., 2009] Bauer, M., Kortgen, A., Hartog, C., Riedemann, N., and Reinhart, K. (2009). Isotonic and hypertonic crystalloid solutions in the critically ill. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 23(2):173–181.
- [Bayer et al., 2011] Bayer, O., Reinhart, K., Sakr, Y., Kabisch, B., Kohl, M., Riedemann, N. C., Bauer, M., Settmacher, U., Hekmat, K., and Hartog, C. S. (2011). Renal effects of synthetic colloids and crystalloids in patients with severe sepsis: a prospective sequential comparison. *Crit Care Med*, 39(6):1335–1342.
- [Bayliss, 1920] Bayliss, W. (1920). The action of gum acacia on the circulation. *JPET*, 15(1):29 – 74.
- [Becker et al., 2010] Becker, B. F., Chappell, D., and Jacob, M. (2010). Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol*, 105(6):687–701.
- [Bellmann et al., 2012] Bellmann, R., Feistritz, C., and Wiedermann, C. J. (2012). Effect of molecular weight and substitution on tissue uptake of hydroxyethyl starch: a meta-analysis of clinical studies. *Clin Pharmacokinet*, 51(4):225–236.

- [Bellomo et al., 2002] Bellomo, R., Kellum, J. A., Mehta, R., Palevsky, P. M., and Ronco, C. (2002). Acute dialysis quality initiative ii: the vicenza conference. *Curr Opin Crit Care*, 8(6):505–508.
- [Bellomo et al., 2008] Bellomo, R., Wan, L., Langenberg, C., and May, C. (2008). Septic acute kidney injury: new concepts. *Nephron Exp Nephrol*, 109(4):e95–100.
- [Bergmann and Buchholtz, 1914] Bergmann, E. v. and Buchholtz, A. (1914). *Kriegsbriefe 1866, 1870/71 und 1877*. Vogel, Würzburg.
- [Bernard et al., 1996] Bernard, C., Alain, M., Simone, C., Xavier, M., and Jean-François, M. (1996). Hydroxyethylstarch and osmotic nephrosis-like lesions in kidney transplants. *Lancet*, 348(9041):1595.
- [Beyer et al., 1997] Beyer, R., Harmening, U., Rittmeyer, O., Zielmann, S., Mielck, F., Kazmaier, S., and Kettler, D. (1997). Use of modified fluid gelatin and hydroxyethyl starch for colloidal volume replacement in major orthopaedic surgery. *Br J Anaesth*, 78(1):44–50.
- [Bhattacharjee et al., 2013] Bhattacharjee, S., Zhao, Y., Hill, J. M., Culicchia, F., Kruck, T. P. A., Percy, M. E., Pogue, A. I., Walton, J. R., and Lukiw, W. J. (2013). Selective accumulation of aluminum in cerebral arteries in alzheimer's disease (ad). *J Inorg Biochem*, 126:35–37.
- [Biewener, 2008] Biewener, C. (2008). *Molekulare Mechanismen der Kontrastmittel-induzierten Apoptose in proximalen Nierentubuluszellen*. Ulm.
- [Blasco et al., 2008] Blasco, V., Leone, M., Antonini, F., Geissler, A., Albanese, J., and Martin, C. (2008). Comparison of the novel hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6 in brain-dead donor resuscitation on renal function after transplantation. *Br J Anaesth*, 100(4):504–508.
- [Boldt, 2009a] Boldt, J. (2009a). Modern rapidly degradable hydroxyethyl starches: current concepts. *Anesth Analg*, 108(5):1574–1582.
- [Boldt, 2009b] Boldt, J. (2009b). Pro: hydroxyethylstarch can be safely used in the intensive care patient—the renal debate. *Intensive Care Med*, 35(8):1331–1336.
- [Bork, 2005] Bork, K. (2005). Pruritus precipitated by hydroxyethyl starch: a review. *Br J Dermatol*, 152(1):3–12.

- [Bouchard et al., 2009] Bouchard, J., Soroko, S. B., Chertow, G. M., Himmelfarb, J., Ikizler, T. A., Paganini, E. P., Mehta, R. L., and , P. t. l. C. i. A. R. D. P. l. C. A. R. D. S. G. (2009). Fluid accumulation, survival and recovery of kidney function in critically ill patients with acute kidney injury. *Kidney Int*, 76(4):422–427.
- [Boulos et al., 2003] Boulos, M., Astiz, M. E., Barua, R. S., and Osman, M. (2003). Impaired mitochondrial function induced by serum from septic shock patients is attenuated by inhibition of nitric oxide synthase and poly(adp-ribose) synthase. *Crit Care Med*, 31(2):353–358.
- [Boussekey et al., 2010] Boussekey, N., Darmon, R., Langlois, J., Alfandari, S., Devos, P., Meybeck, A., Chiche, A., Georges, H., and Leroy, O. (2010). Resuscitation with low volume hydroxyethylstarch 130 kda/0.4 is not associated with acute kidney injury. *Crit Care*, 14(2):R40.
- [BRAUN, 2008] BRAUN, B. B. M. A. (2008). Fachinformation (zusammenfassung der merkmale des arzneimittels) gelafundin 4% infusionslösung. Melsungen.
- [Brealey et al., 2002] Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N. A., Cooper, C. E., and Singer, M. (2002). Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, 360(9328):219–223.
- [Brealey et al., 2004] Brealey, D., Karyampudi, S., Jacques, T. S., Novelli, M., Stidwill, R., Taylor, V., Smolenski, R. T., and Singer, M. (2004). Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286(3):R491–R497.
- [Brickman et al., 1966] Brickman, R. D., Murray, G. F., Thompson, W. L., and Ballinger, 2nd, W. (1966). The antigenicity of hydroxyethyl starch in humans. studies in seven normal volunteers. *JAMA*, 198(12):1277–1279.
- [Brunkhorst et al., 2008] Brunkhorst, F. M., Engel, C., Bloos, F., Meier-Hellmann, A., Ragaller, M., Weiler, N., Moerer, O., Gruendling, M., Oppert, M., Grond, S., Olthoff, D., Jaschinski, U., John, S., Rossaint, R., Welte, T., Schaefer, M., Kern, P., Kuhnt, E., Kiehntopf, M., Hartog, C., Natanson, C., Loeffler, M., Reinhart, K., and , G. C. N. S. S. (2008). Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med*, 358(2):125–139.

- [Callaway et al., 2009] Callaway, D. W., Shapiro, N. I., Donnino, M. W., Baker, C., and Rosen, C. L. (2009). Serum lactate and base deficit as predictors of mortality in normotensive elderly blunt trauma patients. *J Trauma*, 66(4):1040–1044.
- [Cannon, 1923] Cannon, W. B. (1923). Traumatic shock. *New York: D Appleton*.
- [Cash et al., 1969] Cash, R. A., Toha, K. M., Nalin, D. R., Huq, Z., and Phillips, R. A. (1969). Acetate in the correction of acidosis secondary to diarrhoea. *Lancet*, 2(7615):302–303.
- [Cerdeja et al., 2010] Cerdeja, J., Sheinfeld, G., and Ronco, C. (2010). Fluid overload in critically ill patients with acute kidney injury. *Blood Purif*, 29(4):331–338.
- [Chappell, 2013a] Chappell, Daniel; Jacob, M. (2013a). Hydroxyethyl starch - the importance of being earnest. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 21:61.
- [Chappell, 2013b] Chappell, Daniel; Jacob, M. (2013b). Twisting and ignoring facts on hydroxyethyl starch is not very helpful. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 21:85.
- [Chen, 1995] Chen, F. T.; Evangelista, R. A. (1995). Analysis of mono- and oligosaccharide isomers derivatized with 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Anal Biochem*, 230(2):273–280.
- [Chowdhury et al., 2014] Chowdhury, A. H., Cox, E. F., Francis, S. T., and Lobo, D. N. (2014). A randomized, controlled, double-blind crossover study on the effects of 1-l infusions of 6and a balanced solution (plasma volume redibag) on blood volume, renal blood flow velocity, and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers. *Ann Surg*, 259(5):881–887.
- [Cittanova et al., 1996] Cittanova, M. L., Leblanc, I., Legendre, C., Mouquet, C., Riou, B., and Coriat, P. (1996). Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. *Lancet*, 348(9042):1620–1622.
- [Dart et al., 2010] Dart, A. B., Mutter, T. C., Ruth, C. A., and Taback, S. P. (2010). Hydroxyethyl starch (hes) versus other fluid therapies: effects on kidney function. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):CD007594.
- [Daugirdas, 1991] Daugirdas, J. T. (1991). Dialysis hypotension: a hemodynamic analysis. *Kidney Int*, 39(2):233–246.

- [de Saint-Aurin et al., 2007] de Saint-Aurin, R. G., Kloeckner, M., and Annane, D. (2007). Crystalloids versus colloids for fluid resuscitation in critically-ill patients. *Acta Clin Belg Suppl*, (2):412–416.
- [Decker, 1988] Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (tnf) activity. *J Immunol Methods*, 115(1):61–69.
- [Dellinger et al., 2008] Dellinger, R. P., Levy, M. M., Carlet, J. M., Bion, J., Parker, M. M., Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, D. C., Brun-Buisson, C., Beale, R., Calandra, T., Dhainaut, J.-F., Gerlach, H., Harvey, M., Marini, J. J., Marshall, J., Ranieri, M., Ramsay, G., Sevransky, J., Thompson, B. T., Townsend, S., Vender, J. S., Zimmerman, J. L., and Vincent, J.-L. (2008). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med*, 34(1):17–60.
- [Dickenmann et al., 2008] Dickenmann, M., Oettl, T., and Mihatsch, M. J. (2008). Osmotic nephrosis: acute kidney injury with accumulation of proximal tubular lysosomes due to administration of exogenous solutes. *Am J Kidney Dis*, 51(3):491–503.
- [Dienes et al., 1986] Dienes, H. P., Gerharz, C. D., Wagner, R., Weber, M., and John, H. D. (1986). Accumulation of hydroxyethyl starch (hes) in the liver of patients with renal failure and portal hypertension. *J Hepatol*, 3(2):223–227.
- [Dubois et al., 2006] Dubois, M.-J., Orellana-Jimenez, C., Melot, C., De Backer, D., Berre, J., Leeman, M., Brimiouille, S., Appoloni, O., Creteur, J., and Vincent, J.-L. (2006). Albumin administration improves organ function in critically ill hypoalbuminemic patients: A prospective, randomized, controlled, pilot study. *Crit Care Med*, 34(10):2536–2540.
- [Duesberg, 1944] Duesberg, Richard; Schroeder, W. (1944). *Pathophysiologie und Klinik der Kollapszustände*. Hirzel, Stuttgart.
- [Duke, 2011] Duke, T. (2011). What the african fluid-bolus trial means. *Lancet*, 378(9804):1685–1687.
- [Eddy, 2005] Eddy, A. A. (2005). Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 12(4):353–365.

- [Eknoyan, 2002] Eknoyan, G. (2002). Emergence of the concept of acute renal failure. *Am J Nephrol*, 22(2-3):225–230.
- [Ertmer et al., 2011] Ertmer, C., Kampmeier, T. G., Rehberg, S., Morelli, A., Köhler, G., Lange, M., Bollen Pinto, B., Höhn, C., Hahnenkamp, K., Van Aken, H., and Westphal, M. (2011). Effects of balanced crystalloid vs. 0.9% saline-based vs. balanced 6% tetrastarch infusion on renal function and tubular integrity in ovine endotoxemic shock. *Crit Care Med*, 39(4):783–792.
- [Ertmer et al., 2009] Ertmer, C., Rehberg, S., Van Aken, H., and Westphal, M. (2009). Relevance of non-albumin colloids in intensive care medicine. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 23(2):193–212.
- [Fewtrell et al., 2011] Fewtrell, M. S., Edmonds, C. J., Isaacs, E., Bishop, N. J., and Lucas, A. (2011). Aluminium exposure from parenteral nutrition in preterm infants and later health outcomes during childhood and adolescence. *Proc Nutr Soc*, 70(3):299–304.
- [Finfer et al., 2004] Finfer, S., Bellomo, R., Boyce, N., French, J., Myburgh, J., Norton, R., and , S. A. F. E. S. I. (2004). A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med*, 350(22):2247–2256.
- [Finfer et al., 2006] Finfer, S., Bellomo, R., McEvoy, S., Lo, S. K., Myburgh, J., Neal, B., and Norton, R. S. A. F. E. S. I. (2006). Effect of baseline serum albumin concentration on outcome of resuscitation with albumin or saline in patients in intensive care units: analysis of data from the saline versus albumin fluid evaluation (safe) study. *BMJ*, 333(7577):1044.
- [Finfer et al., 2010] Finfer, S., Liu, B., Taylor, C., Bellomo, R., Billot, L., Cook, D., Du, B., McArthur, C., Myburgh, J., and , S. A. F. E. T. R. I. P. S. I. (2010). Resuscitation fluid use in critically ill adults: an international cross-sectional study in 391 intensive care units. *Crit Care*, 14(5):R185.
- [F.M. Brunkhorst, 2010] F.M. Brunkhorst, K. R. e. a. (2010). *AWMF online - S2-Leitlinie: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis*. Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin.
- [Fotakis, 2006] Fotakis, George; Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays:

- comparison of ldh, neutral red, mtt and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 160(2):171–177.
- [Foëx, 2003] Foëx, B. A. (2003). How the cholera epidemic of 1831 resulted in a new technique for fluid resuscitation. *Emerg Med J*, 20(4):316–318.
- [Förster, 1948] Förster (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437:55–75.
- [Förster et al., 2005] Förster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J., and Drenckhahn, D. (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J Physiol*, 565(Pt 2):475–486.
- [Fukumoto et al., 2001] Fukumoto, M., Kujiraoka, T., Hara, M., Shibasaki, T., Hosoya, T., and Yoshida, M. (2001). Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells. *Life Sci*, 69(3):247–254.
- [Gattas et al., 2013] Gattas, D. J., Dan, A., Myburgh, J., Billot, L., Lo, S., Finfer, S., and , C. H. E. S. T. M. C. (2013). Fluid resuscitation with 6 130/0.42) in acutely ill patients: systematic review of effects on mortality and treatment with renal replacement therapy. *Intensive Care Med*, 39(4):558–568.
- [Gkotsamanidou et al., 2011] Gkotsamanidou, M., Kastritis, E., and et al. (2011). Increased serum lactate dehydrogenase should be included among the variables that define very-high-risk multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 11(5):409–413.
- [Goerig, 2001] Goerig, M. (2001). Die Anfänge der Volumentherapie. *Anästhesiologie & Intensivmedizin*, 36(Suppl 2)::71–75.
- [Graham, 1861] Graham, T. (1861). Liquid diffusion applied to analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 151:pp. 183–224.
- [Groeneveld et al., 2011] Groeneveld, A. B. J., Navickis, R. J., and Wilkes, M. M. (2011). Update on the comparative safety of colloids: a systematic review of clinical studies. *Ann Surg*, 253(3):470–483.
- [Guidet et al., 2012] Guidet, B., Martinet, O., Boulain, T., Philippart, F., Poussel, J. F., Maizel, J., Forceville, X., Feissel, M., Hasselmann, M., Heininger, A., and Van

- Aken, H. (2012). Assessment of hemodynamic efficacy and safety of 6% hydroxyethylstarch 130/0.4 vs. 0.9% nacl fluid replacement in patients with severe sepsis: The crystmas study. *Crit Care*, 16(3):R94.
- [Guidet et al., 2010] Guidet, B., Soni, N., Della Rocca, G., Kozek, S., Vallet, B., Annane, D., and James, M. (2010). A balanced view of balanced solutions. *Crit Care*, 14(5):325.
- [Gurkan et al., 2010] Gurkan, S., Scarponi, K. J., Hotchkiss, H., Savage, B., and Drachtman, R. (2010). Lactate dehydrogenase as a predictor of kidney involvement in patients with sickle cell anemia. *Pediatr Nephrol*, 25(10):2123–2127.
- [Guttman et al., 1996] Guttman, A., Chen, F. T., Evangelista, R. A., and Cooke, N. (1996). High-resolution capillary gel electrophoresis of reducing oligosaccharides labeled with 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate. *Anal Biochem*, 233(2):234–242.
- [Haase et al., 2013] Haase, N., Perner, A., Hennings, L. I., Siegemund, M., Lauridsen, B., Wetterslev, M., and Wetterslev, J. (2013). Hydroxyethyl starch 130/0.38-0.45 versus crystalloid or albumin in patients with sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *BMJ*, 346:f839.
- [Haase, 2014] Haase, N. R. S. (2014). Hydroxyethyl starch in sepsis. *Dan Med J*, 61(1):B4764.
- [Hackenbroch, 2011] Hackenbroch, V. (2011). Wissenschaftliches Vakuum. *DER SPIEGEL*, 01 / 2011.
- [Hadimioglu et al., 2008] Hadimioglu, N., Saadawy, I., Saglam, T., Ertug, Z., and Dincan, A. (2008). The effect of different crystalloid solutions on acid-base balance and early kidney function after kidney transplantation. *Anesth Analg*, 107(1):264–269.
- [Handy and Soni, 2008] Handy, J. M. and Soni, N. (2008). Physiological effects of hyperchloraemia and acidosis. *Br J Anaesth*, 101(2):141–150.
- [Harris et al., 2012] Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., and Calderwood, S. B. (2012). Cholera. *Lancet*, 379(9835):2466–2476.
- [Hartmann, 1932] Hartmann, A. F.; Senn, M. J. (1932). Studies in the metabolism of sodium r-lactate. i. response of normal human subjects to the intravenous injection of sodium r-lactate. *J Clin Invest*, 11(2):327–335.

- [Hartog et al., 2012] Hartog, C. S., Skupin, H., Natanson, C., Sun, J., and Reinhart, K. (2012). Systematic analysis of hydroxyethyl starch (hes) reviews: proliferation of low-quality reviews overwhelms the results of well-performed meta-analyses. *Intensive Care Med*, 38(8):1258–1271.
- [Hartog, 2010] Hartog, Bauer, R. (2010). Volumenersatz beim kritisch Kranken – Glaube und Evidenz 2010. *Anästhesiologie und Intensivmedizin*, 4:219–231.
- [Hartog, 2014] Hartog, Bauer, R. (2014). *Kapitel „Volumentherapie“ in Intensivmedizin*. Georg Thieme Verlag, 3. auflage edition.
- [Hecht-Dolnik et al., 2009] Hecht-Dolnik, M., Barkan, H., Taharka, A., and Loftus, J. (2009). Hetastarch increases the risk of bleeding complications in patients after off-pump coronary bypass surgery: a randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 138(3):703–711.
- [Heering et al., 1999] Heering, P., Ivens, K., Thümer, O., Morgera, S., Heintzen, M., Passlick-Deetjen, J., Willers, R., Strauer, B. E., and Grabensee, B. (1999). The use of different buffers during continuous hemofiltration in critically ill patients with acute renal failure. *Intensive Care Med*, 25(11):1244–1251.
- [Heinlein, 1958] Heinlein, H. (1958). Nachweis des Periston in Blut, Harn und Gewebe. *Beitr. path. Anat.*, 119:301.
- [Hercher, 1916] Hercher, F. (1916). Die Behandlung der Gefäßatonie mit hypertoni-scher physiologischer Salzlösung. *Münch med. Wschr*, 49:1740–1742.
- [Heyman et al., 2009] Heyman, S. N., Rosen, S., and Rosenberger, C. (2009). Animal models of renal dysfunction: acute kidney injury. *Expert Opin Drug Discov*, 4(6):629–641.
- [Hogan, 1915] Hogan, J. (1915). The intravenous use of colloidal (gelatin) solutions in shock. *Journal of the American Medical Association*, LXIV(9):721–726.
- [Hsieh et al., 2012] Hsieh, T.-J., Hsieh, P.-C., Tsai, Y.-H., Wu, C.-F., Liu, C.-C., Lin, M.-Y., and Wu, M.-T. (2012). Melamine induces human renal proximal tubular cell injury via transforming growth factor- $\beta$  and oxidative stress. *Toxicol Sci*, 130(1):17–32.
- [Hüter et al., 2009] Hüter, L., Simon, T.-P., Weinmann, L., Schuerholz, T., Reinhart, K., Wolf, G., Amann, K. U., and Marx, G. (2009). Hydroxyethylstarch impairs renal

- function and induces interstitial proliferation, macrophage infiltration and tubular damage in an isolated renal perfusion model. *Crit Care*, 13(1):R23.
- [Huebinger et al., 2010] Huebinger, R. M., Gomez, R., McGee, D., Chang, L.-Y., Bender, J. E., O'Keefe, T., Burris, A. M., Friese, S. M., Purdue, G. F., Hunt, J. L., Arnoldo, B. D., Horton, J. W., and Barber, R. C. (2010). Association of mitochondrial allele 4216c with increased risk for sepsis-related organ dysfunction and shock after burn injury. *Shock*, 33(1):19–23.
- [Investigators et al., 2011] Investigators, S. A. F. E. S., Finfer, S., McEvoy, S., Bellomo, R., McArthur, C., Myburgh, J., and Norton, R. (2011). Impact of albumin compared to saline on organ function and mortality of patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*, 37(1):86–96.
- [Ishani et al., 2009] Ishani, A., Xue, J. L., Himmelfarb, J., Eggers, P. W., Kimmel, P. L., Molitoris, B. A., and Collins, A. J. (2009). Acute kidney injury increases risk of esrd among elderly. *J Am Soc Nephrol*, 20(1):223–228.
- [Jacob et al., 2006] Jacob, M., Bruegger, D., Rehm, M., Welsch, U., Conzen, P., and Becker, B. F. (2006). Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology*, 104(6):1223–1231.
- [Jacob et al., 2007] Jacob, M., Chappell, D., Hofmann-Kiefer, K., Conzen, P., Peter, K., and Rehm, M. (2007). [determinants of insensible fluid loss. perspiration, protein shift and endothelial glycocalyx]. *Anaesthetist*, 56(8):747–58, 760–4.
- [Jacobs et al., 2011] Jacobs, R., Honore, P. M., Joannes-Boyau, O., Boer, W., De Regt, J., De Waele, E., Collin, V., and Spapen, H. D. (2011). Septic acute kidney injury: the culprit is inflammatory apoptosis rather than ischemic necrosis. *Blood Purif*, 32(4):262–265.
- [James et al., 2011] James, M. F. M., Michell, W. L., Joubert, I. A., Nicol, A. J., Navsaria, P. H., and Gillespie, R. S. (2011). Resuscitation with hydroxyethyl starch improves renal function and lactate clearance in penetrating trauma in a randomized controlled study: the first trial (fluids in resuscitation of severe trauma). *Br J Anaesth*, 107(5):693–702.
- [Jamnicki et al., 1998] Jamnicki, M., Zollinger, A., Seifert, B., Popovic, D., Pasch, T., and Spahn, D. R. (1998). The effect of potato starch derived and corn starch derived hydroxyethyl starch on in vitro blood coagulation. *Anaesthesia*, 53(7):638–644.

- [Jungheinrich and Neff, 2005] Jungheinrich, C. and Neff, T. A. (2005). Pharmacokinetics of hydroxyethyl starch. *Clin Pharmacokinet*, 44(7):681–699.
- [Jungner et al., 2010] Jungner, M., Gründe, P.-O., Mattiasson, G., and Bentzer, P. (2010). Effects on brain edema of crystalloid and albumin fluid resuscitation after brain trauma and hemorrhage in the rat. *Anesthesiology*, 112(5):1194–1203.
- [Kamann et al., 2007] Kamann, S., Flaig, M. J., and Korting, H. C. (2007). Hydroxyethyl starch-induced itch: relevance of light microscopic analysis of semi-thin sections and electron microscopy. *J Dtsch Dermatol Ges*, 5(3):204–208.
- [Karow, 2013] Karow, T.; Lang-Roth, R. (21 Aufl. 2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie - Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden*. Thomas Karow, Köln.
- [Kasper et al., 2003] Kasper, S.-M., Meinert, P., Kampe, S., Görg, C., Geisen, C., Mehlhorn, U., and Diefenbach, C. (2003). Large-dose hydroxyethyl starch 130/0.4 does not increase blood loss and transfusion requirements in coronary artery bypass surgery compared with hydroxyethyl starch 200/0.5 at recommended doses. *Anesthesiology*, 99(1):42–47.
- [Kellum et al., 2011] Kellum, J. A., Ronco, C., and Vincent, J.-L. (2011). Unveiling current controversies in acute kidney injury. *Contrib Nephrol*, 174:1–3.
- [Khajavi et al., 2008] Khajavi, M. R., Etezadi, F., Moharari, R. S., Imani, F., Meysamie, A. P., Khashayar, P., and Najafi, A. (2008). Effects of normal saline vs. lactated ringer's during renal transplantation. *Ren Fail*, 30(5):535–539.
- [Kierdorf and Sieberth, 1995] Kierdorf, H. and Sieberth, H. G. (1995). Continuous treatment modalities in acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 10(11):2001–2008.
- [Kim et al., 2013] Kim, S. Y., Huh, K. H., Lee, J. R., Kim, S. H., Jeong, S. H., and Choi, Y. S. (2013). Comparison of the effects of normal saline versus plasmalyte on acid-base balance during living donor kidney transplantation using the Stewart and base excess methods. *Transplant Proc*, 45(6):2191–2196.
- [Kümmell, 1882] Kümmell, H. (1882). *Über die Wirksamkeit und die Gefahren der intraarteriellen Infusion alkalischer Kochsalzlösung bei akuter Anämie*. Zbl. Chir.
- [Kümpers, 2015] Kümpers, P. (2015). [*nacl 0.9 Internist (Berl)*, 56(7):773–778.

- [Koch et al., 2014] Koch, A., Lischke, V., Westphal, K., Kessler, P., Sold, M., Neidhart, G., Hopf, H.-B., Roos, H., Meininger, D., Booke, M., Meier, J., Zacharowski, K., and Scheller, B. (2014). Praxis der intraoperativen infusionstherapie mit kolloidalen lösungen: Eine bestandsaufnahme in 10 kliniken des rhein-main-gebietes. *Anästhesiologie und Intensivmedizin*, 5:224–227.
- [Koch, 2013] Koch, T. (2013). Rethinking the role of hydroxyethyl starch in fluid replacement. *Dtsch Arztebl Int*, 110(26):441–442.
- [Kozek-Langenecker, 2009] Kozek-Langenecker (2009). *Kolloidale Volumentherapie*. Number 64 S., 14 Abb. Uni-Med, 1. auflage edition.
- [Kozek-Langenecker et al., 2008] Kozek-Langenecker, S. A., Jungheinrich, C., Sauer- mann, W., and Van der Linden, P. (2008). The effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%) on blood loss and use of blood products in major surgery: a pooled analysis of randomized clinical trials. *Anesth Analg*, 107(2):382–390.
- [Kretz and Teufel, 2006] Kretz, F.-J. and Teufel, F. (2006). *Anästhesie und Intensiv- medizin*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. aufl. edition.
- [Lameire and Hoste, 2014] Lameire, N. and Hoste, E. (2014). What's new in the controversy on the renal/tissue toxicity of starch solutions? *Intensive Care Med*, 40(3):427–430.
- [Landerer, 1886] Landerer, A. S. (1886). Über Transfusion und Infusion. *Virchows Archiv*, 105:351–372.
- [Landerer, 1898] Landerer, A. S. (1898). *Handbuch der allgemeinen chirurgischen Pathologie und Therapie - Für Ärzte und Studierende*. Urban, Berlin.
- [Lang-Roth and Karow, 2005] Lang-Roth, R. and Karow, T. (2005). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie - Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden*. Thomas Karow, Pulheim.
- [Langeron et al., 2001] Langeron, O., Doelberg, M., Ang, E. T., Bonnet, F., Capdevila, X., and Coriat, P. (2001). Voluven, a lower substituted novel hydroxyethyl starch (hes 130/0.4), causes fewer effects on coagulation in major orthopedic surgery than hes 200/0.5. *Anesth Analg*, 92(4):855–862.
- [Larsen, 2011] Larsen, R. (2011). *Anästhesie*. Elsevier, Urban, München, 9. aufl. editi- on.

- [Latta, 1832] Latta, T. (1832). *Malignant cholera: documents communicated by the Central Board of Health London, relative to the treatment of cholera by the copious injection of aqueous and saline fluids into the veins*. Lancet.
- [Laxenaire et al., 1994] Laxenaire, M. C., Charpentier, C., and Feldman, L. (1994). [anaphylactoid reactions to colloid plasma substitutes: incidence, risk factors, mechanisms. a french multicenter prospective study]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 13(3):301–310.
- [Le Gal, 1975] Le Gal, Y. M. (1975). A review of the history of blood replacement from the 17th to the 20th centuries. *Rev Surg*, 32(4):229–239.
- [Lee et al., 2006] Lee, S., Moon, S.-O., Kim, W., Sung, M. J., Kim, D. H., Kang, K. P., Jang, Y. B., Lee, J. E., Jang, K. Y., Lee, S. Y., and Park, S. K. (2006). Protective role of l-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury. *Nephrol Dial Transplant*, 21(8):2085–2095.
- [Lee WH Jr, 1968] Lee WH Jr, Cooper N, W. M. J. M. E. (1968). Clinical evaluation of a new plasma expander hydroxyethyl starch. *The journal of trauma*, 8 (3):381–393.
- [Legendre et al., 1993] Legendre, C., Thervet, E., Page, B., Percheron, A., Noël, L. H., and Kreis, H. (1993). Hydroxyethylstarch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation. *Lancet*, 342(8865):248–249.
- [Lehmann et al., 2007a] Lehmann, G., Marx, G., and Förster, H. (2007a). Bioequivalence comparison between hydroxyethyl starch 130/0.42/6 :1 and hydroxyethyl starch 130/0.4/9 :1. *Drugs R D*, 8(4):229–240.
- [Lehmann et al., 2007b] Lehmann, G. B., Asskali, F., Boll, M., Burmeister, M. A., Marx, G., Hilgers, R., and Förster, H. (2007b). Hes 130/0.42 shows less alteration of pharmacokinetics than hes 200/0.5 when dosed repeatedly. *Br J Anaesth*, 98(5):635–644.
- [Lesch, 2003] Lesch, A. (2003). *Hydroxyethylstärke (HES) im Urin nach Mehrfachinfusion von HES (450/0,7) : physiko-chemische Veränderungen der Substanzcharakteristika einer hochsubstituierten, hochmolekularen HES*. Johann Wolfgang Goethe-Univ. Frankfurt am Main.
- [Levick and Michel, 2010] Levick, J. R. and Michel, C. C. (2010). Microvascular fluid exchange and the revised starling principle. *Cardiovasc Res*, 87(2):198–210.

- [Lewins, 1832] Lewins, R. (1832). Saline injections into the veins. *London Medical Gazette*, 257-68.
- [Li et al., 2005] Li, H., Ruan, X. Z., Powis, S. H., Fernando, R., Mon, W. Y., Wheeler, D. C., Moorhead, J. F., and Varghese, Z. (2005). EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int*, 67(3):867–874.
- [Li et al., 2011] Li, Q., Liu, B.-C., Lv, L.-L., Ma, K.-L., Zhang, X.-L., and Phillips, A. O. (2011). Monocytes induce proximal tubular epithelial-mesenchymal transition through NF-kappa B dependent upregulation of ICAM-1. *J Cell Biochem*, 112(6):1585–1592.
- [Licari et al., 2007] Licari, E., Calzavacca, P., Ronco, C., and Bellomo, R. (2007). Fluid resuscitation and the septic kidney: the evidence. *Contrib Nephrol*, 156:167–177.
- [Lieberthal et al., 1998] Lieberthal, W., Koh, J. S., and Levine, J. S. (1998). Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol*, 18(5):505–518.
- [Lloyd et al., 1997] Lloyd, C. M., Minto, A. W., Dorf, M. E., Proudfoot, A., Wells, T. N., Salant, D. J., and Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). Rantes and monocyte chemoattractant protein-1 (mcp-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only mcp-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med*, 185(7):1371–1380.
- [MacGillivray, 2006] MacGillivray, N. (2006). Dr Latta of Leith: pioneer in the treatment of cholera by intravenous saline infusion. *J R Coll Physicians Edinb*, 36(1):80–85.
- [Mahmood et al., 2009] Mahmood, A., Gosling, P., Barclay, R., Kilvington, F., and Vohra, R. (2009). Splanchnic microcirculation protection by hydroxyethyl starches during abdominal aortic aneurysm surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 37(3):319–325.
- [Mahmood et al., 2007] Mahmood, A., Gosling, P., and Vohra, R. K. (2007). Randomized clinical trial comparing the effects on renal function of hydroxyethyl starch or gelatine during aortic aneurysm surgery. *Br J Surg*, 94(4):427–433.
- [Maitland et al., 2013] Maitland, K., George, E. C., Evans, J. A., Kiguli, S., Olupot-Olupot, P., Akech, S. O., Opoka, R. O., Engoru, C., Nyeko, R., Mtove, G., Reyburn,

- H., Brent, B., Nteziyaremye, J., Mpoya, A., Prevatt, N., Dambisya, C. M., Semakula, D., Ddungu, A., Okuuny, V., Wokulira, R., Timbwa, M., Oti, B., Levin, M., Crawley, J., Babiker, A. G., Gibb, D. M., and , F. E. A. S. T. t. g. (2013). Exploring mechanisms of excess mortality with early fluid resuscitation: insights from the feast trial. *BMC Med*, 11:68.
- [Maitland et al., 2011] Maitland, K., Kiguli, S., Opoka, R. O., Engoru, C., Olupot-Olupot, P., Akech, S. O., Nyeko, R., Mtove, G., Reyburn, H., Lang, T., Brent, B., Evans, J. A., Tibenderana, J. K., Crawley, J., Russell, E. C., Levin, M., Babiker, A. G., Gibb, D. M., and , F. E. A. S. T. T. G. (2011). Mortality after fluid bolus in african children with severe infection. *N Engl J Med*, 364(26):2483–2495.
- [Marino and Sutin, 2012] Marino, P. L. and Sutin, K. M. (2012). *The ICU Book*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [Marjanovic et al., 2010] Marjanovic, G., Villain, C., and al. (2010). Colloid vs. crystalloid infusions in gastrointestinal surgery and their different impact on the healing of intestinal anastomoses. *Int J Colorectal Dis*, 25(4):491–498.
- [Matsota et al., 2010] Matsota, P., Politou, M., and al. (2010). Do different substitution patterns or plant origin in hydroxyethyl starches affect blood coagulation in vitro? *Blood Coagul Fibrinolysis*, 21(5):448–451.
- [Mion et al., 1964] Mion, C. M., Hegstrom, R. M., Boen, S. T., and Scribner, B. H. (1964). Substitution of sodium acetate for sodium bicarbonate in the bath fluid for hemodialysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 10:110–115.
- [Mizzi et al., 2011] Mizzi, A., Tran, T., Karlnoski, R., Anderson, A., Mangar, D., and Camporesi, E. M. (2011). Voluven, a new colloid solution. *Anesthesiol Clin*, 29(3):547–555.
- [Müller, 2011] Müller, S. (2011). *Memorix Notfallmedizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [Morishita et al., 2011] Morishita, Y., Watanabe, M., Nakazawa, E., Ishibashi, K., and Kusano, E. (2011). The interaction of LFA-1 on mononuclear cells and ICAM-1 on tubular epithelial cells accelerates TGF- $\beta$ 1-induced renal epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 6(8):e23267.

- [Murugan and Karajala-Subramanyam, 2010] Murugan, R. and Karajala-Subramanyam (2010). Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*, 77(6):527–535.
- [Myburgh et al., 2007] Myburgh, J., Cooper, D. J., Finfer, S., Bellomo, R., Norton, R., Bishop, N., Kai Lo, S., Vallance, S. S. A. F. E. S. I., A., Group, N. Z. I. C. S. C. T., A. R. C. B. S., and G. I. f. I. H. (2007). Saline or albumin for fluid resuscitation in patients with traumatic brain injury. *N Engl J Med*, 357(9):874–884.
- [Myburgh and Finfer, 2013] Myburgh, J. and Finfer, S. (2013). Causes of death after fluid bolus resuscitation: new insights from feast. *BMC Med*, 11:67.
- [Myburgh et al., 2012] Myburgh, J. A., Finfer, S., Bellomo, R., Billot, L., Cass, A., Gattas, D., Glass, P., Lipman, J., Liu, B., McArthur, C., McGuinness, S., Rajbhandari, D., Taylor, C. B., Webb, S. A. R., C. H. E. S. T. I., A., and Group, N. Z. I. C. S. C. T. (2012). Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care. *N Engl J Med*, 367(20):1901–1911.
- [Myburgh and Mythen, 2013] Myburgh, J. A. and Mythen, M. G. (2013). Resuscitation fluids. *N Engl J Med*, 369(13):1243–1251.
- [Navickis et al., 2012] Navickis, R. J., Haynes, G. R., and Wilkes, M. M. (2012). Effect of hydroxyethyl starch on bleeding after cardiopulmonary bypass: a meta-analysis of randomized trials. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 144(1):223–230.
- [Neuhaus et al., 2006a] Neuhaus, W., Bogner, E., Wirth, M., Trzeciak, J., Lachmann, B., Gabor, F., and Noe, C. R. (2006a). A novel tool to characterize paracellular transport: the APTS-dextran ladder. *Pharm Res*, 23(7):1491–1501.
- [Neuhaus et al., 2012] Neuhaus, W., Schick, M. A., Bruno, R. R., Schneiker, B., Förster, C. Y., Roewer, N., and Wunder, C. (2012). The effects of colloid solutions on renal proximal tubular cells in vitro. *Anesth Analg*, 114(2):371–374.
- [Neuhaus et al., 2006b] Neuhaus, W., Trzeciak, J., Lauer, R., Lachmann, B., and Noe, C. R. (2006b). Apts-labeled dextran ladder: a novel tool to characterize cell layer tightness. *J Pharm Biomed Anal*, 40(4):1035–1039.
- [Noris et al., 1998] Noris, M., Todeschini, M., Casiraghi, F., Roccatello, D., Martina, G., Minetti, L., Imberti, B., Gaspari, F., Atti, M., and Remuzzi, G. (1998). Effect of acetate, bicarbonate dialysis, and acetate-free biofiltration on nitric oxide synthesis: implications for dialysis hypotension. *Am J Kidney Dis*, 32(1):115–124.

- [O'Malley et al., 2005] O'Malley, C. M. N., Frumento, R. J., Hardy, M. A., Benvenisty, A. I., Brentjens, T. E., Mercer, J. S., and Bennett-Guerrero, E. (2005). A randomized, double-blind comparison of lactated ringer's solution and 0.9 *Anesth Analg*, 100(5):1518–24, table of contents.
- [Ostermann and Chang, 2007] Ostermann, M. and Chang, R. W. S. (2007). Acute kidney injury in the intensive care unit according to rifle. *Crit Care Med*, 35(8):1837–43; quiz 1852.
- [Pacini, 1879] Pacini, F. (1879). *Del processo morboso del colera asiatico, memoria*.
- [Park et al., 2010] Park, J. W., Bae, E. H., Kim, I. J., Ma, S. K., Choi, C., Lee, J., and Kim, S. W. (2010). Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin-induced kidney injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(2):F301–F313.
- [Patel et al., 2013] Patel, A., Waheed, U., and Brett, S. J. (2013). Randomised trials of 6% tetrastarch (hydroxyethyl starch 130/0.4 or 0.42) for severe sepsis reporting mortality: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*, 39(5):811–822.
- [Payen et al., 2008] Payen, D., de Pont, A. C., Sakr, Y., Spies, C., Reinhart, K., Vincent, J. L., and , S. O. i. A. I. P. S. O. A. P. I. (2008). A positive fluid balance is associated with a worse outcome in patients with acute renal failure. *Crit Care*, 12(3):R74.
- [Perel and Roberts, 2012] Perel, P. and Roberts, I. (2012). Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*, 6:CD000567.
- [Perel et al., 2013] Perel, P., Roberts, I., and Ker, K. (2013). Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*, 2:CD000567.
- [Perner et al., 2012] Perner, A., Haase, N., Guttormsen, A. B., Tenhunen, J., Klemenzson, G., Åneman, A., Madsen, K. R., Møller, M. H., Elkjær, J. M., Poulsen, L. M., Bendtsen, A., Winding, R., Steensen, M., Berezowicz, P., Sjøe-Jensen, P., Bestle, M., Strand, K., Wiis, J., White, J. O., Thornberg, K. J., Quist, L., Nielsen, J., Andersen, L. H., Holst, L. B., Thormar, K., Kjældgaard, A.-L., Fabritius, M. L., Mondrup, F., Pott, F. C., Møller, T. P., Winkel, P., Wetterslev, J., , S. T. G., and , S. C. C. T. G. (2012). Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med*, 367(2):124–134.

- [Perner et al., 2014] Perner, A., Haase, N., Winkel, P., Guttormsen, A. B., Tenhunen, J., Klemenzson, G., Müller, R. G., Aneman, A., and Wetterslev, J. (2014). Long-term outcomes in patients with severe sepsis randomised to resuscitation with hydroxyethyl starch 130/0.42 or ringer's acetate. *Intensive Care Med*.
- [Phillips et al., 2013] Phillips, D. P., Kaynar, A. M., Kellum, J. A., and Gomez, H. (2013). Crystalloids vs. colloids: Ko at the twelfth round? *Crit Care*, 17(3):319.
- [(PRAC), 2013] (PRAC), P. R. A. C. (2013). Prac confirms that hydroxyethyl – starch solutions (hes) should no longer be used in patients with sepsis or burn injuries or in critically ill patients. *European Medicines Agency*, EMA/606303/2013.
- [Ragaller M, 2009] Ragaller M, T. H. (2009). *Colloid osmotic pressure*. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum J, (eds.): *Critical Care Nephrology. 2nd edition*. Elsevier Health Sciences, Philadelphia.
- [Ramesh and Reeves, 2002] Ramesh, G. and Reeves, W. B. (2002). TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest*, 110(6):835–842.
- [Ramseyer and Garvin, 2013] Ramseyer, V. D. and Garvin, J. L. (2013). Tumor necrosis factor- $\alpha$ : regulation of renal function and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304(10):F1231–F1242.
- [Rehm et al., 2004] Rehm, M., Zahler, S., Lötsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Jacob, M., and Becker, B. F. (2004). Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of  $\delta$ coronary vascular bed. *Anesthesiology*, 100(5):1211–1223.
- [Resz, 1956] Resz, H. (1956). Über natürliche und synthetische Amylose. V. Über Oxyäthylamylosen. *Journal of Polymer Science*, 19.
- [Rivers et al., 2001] Rivers, E., Nguyen, B., Havstad, S., Ressler, J., Muzzin, A., Knoblich, B., Peterson, E., Tomlanovich, M., and , E. G.-D. T. C. G. (2001). Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345(19):1368–1377.
- [Rixen et al., 2001] Rixen, D., Raum, M., Bouillon, B., Lefering, R., Neugebauer, E., and , A. P. o. t. D. G. f. U. (2001). Base deficit development and its prognostic significance in posttrauma critical illness: an analysis by the trauma registry of the deutsche gesellschaft für unfallchirurgie. *Shock*, 15(2):83–89.

- [Rizoli, 2011] Rizoli, S. (2011). Plasmalyte. *J Trauma*, 70(5 Suppl):S17–S18.
- [Roberts I, 2011] Roberts I, Blackhall K, A. P. B. F. S. G. (2011). Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev*, (10):CD001208.
- [Rossaint, 2012] Rossaint, Werner, Z. (2012). *Die Anästhesiologie – Allgemeine und spezielle Anästhesiologie, Schmerztherapie und Intensivmedizin*. Springer, 22. auflage edition.
- [Ryan et al., 1994] Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A., and Torok-Storb, B. (1994). HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*, 45(1):48–57.
- [Salpeter et al., 2014] Salpeter, S. R., Buckley, J. S., and Chatterjee, S. (2014). Impact of more restrictive blood transfusion strategies on clinical outcomes: a meta-analysis and systematic review. *Am J Med*, 127(2):124–131.e3.
- [Saner et al., 2004] Saner, F., Kavuk, I., Lang, H., Biglarnia, R., Frühauf, N. R., Schäfers, R. F., Malagó, M., and Broelsch, C. E. (2004). Terlipressin and gelafundin: safe therapy of hepatorenal syndrome. *Eur J Med Res*, 9(2):78–82.
- [Sarre, 1963] Sarre, K. (1963). Die sog. osmotische Nephrose oder Zuckerspeicherniere zur Niereninsuffizienz. *Klinische Wochenschau*, 41. Jahrgang, Heft 7:311 – 317.
- [Schick et al., 2012] Schick, M. A., Isbary, J. T., Stueber, T., Brugger, J., Stumpner, J., Schlegel, N., Roewer, N., Eichelbroenner, O., and Wunder, C. (2012). Effects of crystalloids and colloids on liver and intestine microcirculation and function in cecal ligation and puncture induced septic rodents. *BMC Gastroenterol*, 12:179.
- [Schick et al., 2010] Schick, M. A., Isbary, T. J., Schlegel, N., Brugger, J., Waschke, J., Muellenbach, R., Roewer, N., and Wunder, C. (2010). The impact of crystalloid and colloid infusion on the kidney in rodent sepsis. *Intensive Care Med*, 36(3):541–548.
- [Schmidt and Unsicker, 2003] Schmidt, R. F. and Unsicker, K. (2003). *Lehrbuch Vor-klinik - integrierte Darstellung in vier Teilen*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 1. aufl. edition.

- [Schortgen and Brochard, 2009] Schortgen, F. and Brochard, L. (2009). Colloid-induced kidney injury: experimental evidence may help to understand mechanisms. *Crit Care*, 13(2):130.
- [Schortgen et al., 2004] Schortgen, F., Deye, N., Brochard, L., and , C. R. Y. C. O. S. G. (2004). Preferred plasma volume expanders for critically ill patients: results of an international survey. *Intensive Care Med*, 30(12):2222–2229.
- [Schramko et al., 2009] Schramko, A. A., Suojaranta-Ylinen, R. T., Kuitunen, A. H., Kukkonen, S. I., and Niemi, T. T. (2009). Rapidly degradable hydroxyethyl starch solutions impair blood coagulation after cardiac surgery: a prospective randomized trial. *Anesth Analg*, 108(1):30–36.
- [Schramm et al., 2007] Schramm, S., Thyges, C., Frascarolo, P., Buclin, T., Burki, M., Fisch, A., Burmeister, M.-A., Asmis, L., and Spahn, D. R. (2007). Impact of the c2/c6 ratio of high-molecular-weight hydroxyethyl starch on pharmacokinetics and blood coagulation in pigs. *Anesthesiology*, 107(3):442–451.
- [Schüttler, 2003] Schüttler, J. (2003). *50 Jahre Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin*. Springer DE, Berlin.
- [Scudiero et al., 1988] Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., and Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17):4827–4833.
- [Selby et al., 2006] Selby, N. M., Fluck, R. J., Taal, M. W., and McIntyre, C. W. (2006). Effects of acetate-free double-chamber hemodiafiltration and standard dialysis on systemic hemodynamics and troponin t levels. *ASAIO J*, 52(1):62–69.
- [Sengul et al., 2002] Sengul, S., Zwizinski, C., Simon, E. E., Kapasi, A., Singhal, P. C., and Batuman, V. (2002). Endocytosis of light chains induces cytokines through activation of nf-kappab in human proximal tubule cells. *Kidney Int*, 62(6):1977–1988.
- [Serpa Neto et al., 2014] Serpa Neto, A., Veelo, D. P., Peireira, V. G. M., de Assunção, M. S. C., Manetta, J. A., Espósito, D. C., and Schultz, M. J. (2014). Fluid resuscitation with hydroxyethyl starches in patients with sepsis is associated with an increased incidence of acute kidney injury and use of renal replacement therapy: a systematic review and meta-analysis of the literature. *J Crit Care*, 29(1):185.e1–185.e7.

- [Shaw et al., 2012] Shaw, A. D., Bagshaw, S. M., Goldstein, S. L., Scherer, L. A., Duan, M., Schermer, C. R., and Kellum, J. A. (2012). Major complications, mortality, and resource utilization after open abdominal surgery: 0.9 *Ann Surg*, 255(5):821–829.
- [Shimamura et al., 2003] Shimamura, T., Takamori, A., Ukeda, H., and Sawamura, M. (2003). Reduction mechanism of tetrazolium salt XTT by a glucosamine derivative. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(2):295–299.
- [Silbernagl, 2010] Silbernagl, K. R. P. H. K. A. (2010). *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 6. auflage edition.
- [Singer and Glynn, 2005] Singer, M. and Glynn, P. (2005). Treating critical illness: the importance of first doing no harm. *PLoS Med*, 2(6):e167.
- [Sirtl et al., 1999] Sirtl, C., Laubenthal, H., Zumbel, V., Kraft, D., and Jurecka, W. (1999). Tissue deposits of hydroxyethyl starch (hes): dose-dependent and time-related. *Br J Anaesth*, 82(4):510–515.
- [Skhirtladze et al., 2014] Skhirtladze, K., Base, E. M., Lassnigg, A., Kaider, A., Linke, S., Dworschak, M., and Hiesmayr, M. J. (2014). Comparison of the effects of albumin 56 *Br J Anaesth*, 112(2):255–264.
- [Solanke, 1968] Solanke, T. F. (1968). Clinical trial of 6 per cent hydroxyethyl starch (a new plasma expander). *Br Med J*, 3(5621):783–785.
- [Sommermeyer et al., 2007] Sommermeyer, K., Cech, F., and Schossow, R. (2007). Differences in chemical structures between waxy maize- and potato starch-based hydroxyethyl starch volume therapeutics. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*, 9(3):127–133.
- [Starling, 1896] Starling, E. H. (1896). On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *J Physiol*, 19(4):312–326.
- [Steyerberg et al., 2012] Steyerberg, E. W., Pencina, M. J., Lingsma, H. F., Kattan, M. W., Vickers, A. J., and Van Calster, B. (2012). Assessing the incremental value of diagnostic and prognostic markers: a review and illustration. *Eur J Clin Invest*, 42(2):216–228.

- [Ständer et al., 2014] Ständer, S., Richter, L., Osada, N., and Metze, D. (2014). Hydroxyethyl starch-induced pruritus: Clinical characteristics and influence of dose, molecular weight and substitution. *Acta Derm Venereol*, 94(3):282–287.
- [Ständer et al., 2001] Ständer, S., Szépfalusi, Z., Bohle, B., Ständer, H., Kraft, D., Luger, T. A., and Metze, D. (2001). Differential storage of hydroxyethyl starch (hes) in the skin: an immunoelectron-microscopical long-term study. *Cell Tissue Res*, 304(2):261–269.
- [Suzuki et al., 2010] Suzuki, T., Miyao, H., Terui, K., Koyama, K., and Shiibashi, M. (2010). Fluid therapy with hydroxyethyl starch for massive blood loss during surgery. *J Anesth*, 24(3):418–425.
- [Sztajzel et al., 1993] Sztajzel, J., Ruedin, P., Stoermann, C., Monin, C., Schifferli, J., Leski, M., Rutishauser, W., and Lerch, R. (1993). Effects of dialysate composition during hemodialysis on left ventricular function. *Kidney Int Suppl*, 41:S60–S66.
- [Thiel and Roewer, 2009] Thiel, H. and Roewer, N. (2009). *Anästhesiologische Pharmakotherapie - Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [Thomas-Rueddel et al., 2012] Thomas-Rueddel, D. O., Vlasakov, V., Reinhart, K., Jaeschke, R., Rueddel, H., Hutagalung, R., Stacke, A., and Hartog, C. S. (2012). Safety of gelatin for volume resuscitation—a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*, 38(7):1134–1142.
- [Treib et al., 1999] Treib, J., Baron, J. F., Grauer, M. T., and Strauss, R. G. (1999). An international view of hydroxyethyl starches. *Intensive Care Med*, 25(3):258–268.
- [Trof and Groeneveld, 2011] Trof, R. J. and Groeneveld, A. B. J. (2011). Use of synthetic colloids in sepsis: a critical review on efficacy, safety and patient benefits. *Minerva Anesthesiol*, 77(12):1216–1223.
- [Uchino et al., 2005] Uchino, S., Kellum, J. A., Bellomo, R., Doig, G. S., Morimatsu, H., Morgera, S., Schetz, M., Tan, I., Bouman, C., Macedo, E., Gibney, N., Tolwani, A., Ronco, C., , B., and for the Kidney (BEST Kidney) Investigators, E. S. T. (2005). Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*, 294(7):813–818.

- [Van Der Linden et al., 2013] Van Der Linden, P., James, M., Mythen, M., and Weiskopf, R. B. (2013). Safety of modern starches used during surgery. *Anesth Analg*, 116(1):35–48.
- [Vincent et al., 2003] Vincent, J.-L., Dubois, M.-J., Navickis, R. J., and Wilkes, M. M. (2003). Hypoalbuminemia in acute illness: is there a rationale for intervention? a meta-analysis of cohort studies and controlled trials. *Ann Surg*, 237(3):319–334.
- [Vincent and Gottin, 2011] Vincent, J.-L. and Gottin, L. (2011). Type of fluid in severe sepsis and septic shock. *Minerva Anesthesiol*, 77(12):1190–1196.
- [Vineyard et al., 1966] Vineyard, G. C., Bradley, B. E., Defalco, A., Lawson, D., Wagner, T. A., Pastis, W. K., Nardella, F. A., and Hayes, J. R. (1966). Effect of hydroxyethyl starch on plasma volume and hematocrit following hemorrhagic shock in dogs: comparison with dextran, plasma and ringer's. *Ann Surg*, 164(5):891–899.
- [Wagenblast, 2004] Wagenblast, M. (2004). *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*. Univ.-Bibliothek Frankfurt am Main.
- [Walton, 2006] Walton, J. R. (2006). Aluminum in hippocampal neurons from humans with alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 27(3):385–394.
- [Walton, 2009] Walton, J. R. (2009). Brain lesions comprised of aluminum-rich cells that lack microtubules may be associated with the cognitive deficit of alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 30(6):1059–1069.
- [Wang and Sanders, 2007] Wang, P.-X. and Sanders, P. W. (2007). Immunoglobulin light chains generate hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol*, 18(4):1239–1245.
- [Wang et al., 2011] Wang, W. M., Chen, H., Zhong, F., Lu, Y., Han, L., and Chen, N. (2011). Inhibitory effects of rosiglitazone on lipopolysaccharide-induced inflammation in a murine model and hk-2 cells. *Am J Nephrol*, 34(2):152–162.
- [Weese, 1943] Weese, G. H. (1943). Periston, ein neuer blutflüssigkeitsersatz. *MMW Munch Med Wochenschr*, 90:11 ff.
- [Weidhase et al., 1998] Weidhase, R., Faude, K., and Weidhase, R. (1998). [hydroxyethyl starch—an interim report]. *Anaesthesiol Reanim*, 23(1):4–14.

- [Westphal et al., 2009] Westphal, M., James, M. F. M., Kozek-Langenecker, S., Stocker, R., Guidet, B., and Van Aken, H. (2009). Hydroxyethyl starches: different products—different effects. *Anesthesiology*, 111(1):187–202.
- [Wickert, 2007] Wickert, H. (2007). Die quantitative real-time-pcr (qrt-pcr). methoden und anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 32:120 ff.
- [Wiedermann, 2014] Wiedermann, C. J. (2014). Reporting bias in trials of volume resuscitation with hydroxyethyl starch. *Wien Klin Wochenschr*, 126(7-8):189–194.
- [Wiedermann and Joannidis, 2012] Wiedermann, C. J. and Joannidis, M. (2012). Mortality after hydroxyethyl starch 130/0.4 infusion: an updated meta-analysis of randomized trials. *Swiss Med Wkly*, 142:w13656.
- [Wiedersheim, 1957] Wiedersheim, M. (1957). An investigation of oxyethylstarch as a new plasma volume expander in animals. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 111(3):353–361.
- [Wilcox, 1983] Wilcox, C. S. (1983). Regulation of renal blood flow by plasma chloride. *J Clin Invest*, 71(3):726–735.
- [Williams et al., 1999] Williams, E. L., Hildebrand, K. L., McCormick, S. A., and Bedel, M. J. (1999). The effect of intravenous lactated ringer's solution versus 0.9sodium chloride solution on serum osmolality in human volunteers. *Anesth Analg*, 88(5):999–1003.
- [Wills et al., 2005] Wills, B. A., Nguyen, M. D., Ha, T. L., Dong, T. H. T., Tran, T. N. T., Le, T. T. M., Tran, V. D., Nguyen, T. H., Nguyen, V. C., Stepniewska, K., White, N. J., and Farrar, J. J. (2005). Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome. *N Engl J Med*, 353(9):877–889.
- [Wittbrodt et al., 2013] Wittbrodt, P., Haase, N., Butowska, D., Winding, R., Poulsen, J. B., Perner, A., S. t. g., and S. C. C. T. G. (2013). Quality of life and pruritus in patients with severe sepsis resuscitated with hydroxyethyl starch long-term follow-up of a randomised trial. *Crit Care*, 17(2):R58.
- [Wittlinger et al., 2010] Wittlinger, M., Schläpfer, M., De Conno, E., Z'graggen, B. R., Reyes, L., Booy, C., Schimmer, R. C., Seifert, B., Burmeister, M.-A., Spahn, D. R., and Beck-Schimmer, B. (2010). The effect of hydroxyethyl starches (hes 130/0.42 and hes 200/0.5) on activated renal tubular epithelial cells. *Anesth Analg*, 110(2):531–540.

- [Wohlauer et al., 2012] Wohlauer, M. V., Sauaia, A., Moore, E. E., Burlew, C. C., Banerjee, A., and Johnson, J. (2012). Acute kidney injury and posttrauma multiple organ failure: the canary in the coal mine. *J Trauma Acute Care Surg*, 72(2):373–8; discussion 379–80.
- [Woodcock and Woodcock, 2012] Woodcock, T. E. and Woodcock, T. M. (2012). Revised starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy. *Br J Anaesth*, 108(3):384–394.
- [Wu et al., 2007] Wu, X., Guo, R., Wang, Y., and Cunningham, P. N. (2007). The role of icam-1 in endotoxin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(4):F1262–F1271.
- [Wunder, 2012] Wunder, C. e. a. (2012). *Anästhesie compact*. Georg Thieme,Verlag.
- [Yang et al., 2014] Yang, R.-l., Wang, X.-t., Liu, D.-w., and Liu, S.-b. (2014). Energy and oxygen metabolism disorder during septic acute kidney injury. *Kidney Blood Press Res*, 39(4):240–251.
- [Yap et al., 2007] Yap, W. W., Young, D., and Pathi, V. (2007). Effects of gelatine and medium molecular weight starch as priming fluid in cardiopulmonary bypass—a randomised controlled trial. *Perfusion*, 22(1):57–61.
- [Yunos et al., 2012] Yunos, N. M., Bellomo, R., Hegarty, C., Story, D., Ho, L., and Bailey, M. (2012). Association between a chloride-liberal vs chloride-restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA*, 308(15):1566–1572.
- [Zager et al., 2006] Zager, R. A., Johnson, A. C. M., Hanson, S. Y., and Lund, S. (2006). Acute nephrotoxic and obstructive injury primes the kidney to endotoxin-driven cytokine/chemokine production. *Kidney Int*, 69(7):1181–1188.
- [Zander et al., 2007] Zander, R., Boldt, J., Engelmann, L., Mertzlufft, F., Sirtl, C., and Stuttmann, R. (2007). [the design of the vissep trial. critical appraisal]. *Anaesthetist*, 56(1):71–77.
- [Zarychanski et al., 2013] Zarychanski, R., Abou-Setta, A. M., Turgeon, A. F., Houston, B. L., McIntyre, L., Marshall, J. C., and Fergusson, D. A. (2013). Association of

hydroxyethyl starch administration with mortality and acute kidney injury in critically ill patients requiring volume resuscitation: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 309(7):678–688.

[Zarychanski et al., 2009] Zarychanski, R., Turgeon, A. F., Fergusson, D. A., Cook, D. J., Hébert, P., Bagshaw, S. M., Monsour, D., and McIntyre, L. (2009). Renal outcomes and mortality following hydroxyethyl starch resuscitation of critically ill patients: systematic review and meta-analysis of randomized trials: Attention: The analysis and conclusions of this article are being revised by the authors. this is due to the journal anesthesia and analgesia's retraction of a paper by dr. joachim boldt, an author in seven of the studies analyzed in this review. as such, the editors of open medicine recommend interpreting this review with extreme caution until zarychanski et al. publish a new analysis and interpretation in open medicine. for more information, see anesthesia and analgesia's press release. *Open Med*, 3(4):e196–e209.

[Ziese, 1934] Ziese, W. (1934). Beitrag zur spezifität der amylasen. einwirkung von amylasen auf oxyäthylstärke. *Z. Physiol. Chem*, 235.

[Ziese, 1935] Ziese, W. (1935). Beitrag zur spezifität der amylasen ii. Über das nicht-auftreten von reduktionsvermögen beim enzymatischen abbau von aus nativstärke gewonnener oxyäthylstärke. *Z. Physiol. Chem.*, 235.

[Zollinger and Rohr, 1966] Zollinger, H. and Rohr, H. (1966). Die sogenannte zuckerspeicherniere unter besonderer berücksichtigung elektronenoptisch - autoradiographischer untersuchungen mit <sup>14</sup>c - saccharose. *Virchows Arch. path. Anat.*, 341:122 – 155.

## Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Christian Wunder für die Überlassung des Themas und die immer freundliche und lehrreiche Unterstützung, nicht nur bei der Erstellung dieser Arbeit, sondern auch bei der Publikation unserer Ergebnisse. Nicht zuletzt die Ermöglichung der gemeinsamen Reise unserer Arbeitsgruppe zum ESICM 2013 in Lissabon mit einwöchigem Surf – Kurs war einfach nur großartig.

Meinen beiden Betreuern, Herrn Dr. med. Martin Schick und Dr. rer. nat. habil. Winfried Neuhaus bin ich sehr dankbar für die geduldige Art und Weise. Beide waren jederzeit ansprechbar und offen für konstruktive Vorschläge. Durch ihren begeisterten Einsatz für unsere Forschung und die ständige Bereitschaft, meine Ideen zu unterstützen, gelang es ihnen, meinen Enthusiasmus für wissenschaftliche Arbeit zu entfachen und meine Neugier stets aufrecht zu erhalten. Die Arbeitsatmosphäre war einmalig offenherzig, ehrlich und humorvoll.

Großer Dank gebührt den medizinisch – technischen Assistentinnen des ZOM, insbesondere Bianca Schneiker (jetzt Universität Bonn) und Anja Neuhoff, B.Sc., ohne deren technische und personelle Unterstützung diese Arbeit in der Form nicht möglich gewesen wäre.

Auch meinen AG – Kollegen Wolfgang Barr und Jakob Wollborn möchte ich herzlich danken für die vielen heiteren Stunden bei der Arbeit und danach. Insbesondere die Kongress – Besuche waren eine sehr schöne Erfahrung.

Außerdem danke ich Frau Priv.Do. Dr. rer. nat. Heike Claus vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg für die mehrfache Zuverfügungstellung der „Speed – Vac“, der freundlichen und geduldigen Beratung und Frau Professor Glatz, Pathologisches Institut des Universitätsspitals Bern für die freundliche Zuverfügungstellung des EM – Bildes der „osmotischen Nephrose“.

Ich danke besonders meinen Eltern, ohne die das Studium der Humammedizin und die Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meiner Frau, Ariane Trinks, M.Sc., die mit großer Geduld meine Abwesenheit durch lange Stunden im Labor und am Schreibtisch ertragen hat, mich permanent unterstützt und diese Arbeit über den gesamten Zeitraum konstruktiv begleitet hat.

# Curriculum vitae

---

## Persönliche Daten

Name Bruno  
Vorname Raphael Romano

---

## Akademische und schulische Ausbildung

- 1997–2006 **Abitur**, *Gymnasium Fabritianum*, Krefeld–Uerdingen  
Schulabschluss: Abitur *Note: 1,0*
- 2007–2008 **Studium der Rechtswissenschaften**, *Ruprecht–Karls–Universität*, Heidelberg
- 2008–2012 **Studium der Humanmedizin**, *Julius–Maximilian–Universität*, Würzburg  
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: *Note: 2,0*
- 2012–2014 **Studium der Humanmedizin**, *Friedrich–Alexander–Universität*, Erlangen  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: *Note: 1,0*
- 22.05.2014 **Ärztliche Prüfung**, *Friedrich–Alexander–Universität*, Erlangen  
Gesamtnote Ärztliche Prüfung: *Note: 1,3*
- 30.05.2014 **Approbation als Arzt**
- 01.08.2014 **Weiterbildungsassistent**, *Medizinische Klinik 1*, Klinik für Notfallmedizin und Internistische Intensivmedizin, Prof. Dr. M. Christ  
Klinikum Nürnberg
- 01.10.2015 **Weiterbildungsassistent und Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, *Klinik für Nephrologie*, Prof. Dr. L. C. Rump  
Universitätsklinikum Düsseldorf

### Dissertation

- 2010–2014 **Doktorand**, *AG Mikrozirkulation*, Prof. Dr. C. Wunder  
**Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie**, Direktor: Prof. Dr. N. Roewer,  
*Universitätsklinikum Würzburg*
- Titel *Auswirkung von Infusionslösungen mit Hydroxyethylstärke (HES) auf humane proximale Tubulusepithelzellen der Niere in vitro*
- Betreuer Dr. med. M. Schick und Prof. Dr. rer. nat. W. Neuhaus
- Note Summa cum laude

## Praktisches Jahr

1. Tertial Allgemeinchirurgie, Klinikum Forchheim
2. Tertial Innere Medizin, Universitätsklinik Erlangen, Medizinische Klinik 1 und 5
3. Tertial Anästhesie, Notfall- und Intensivmedizin, Klinikum Forchheim

---

## Berufserfahrung

### Zivildienst

07/06 – 03/07 Zivildienst beim Rettungsdienst des Malteser Hilfsdienstes e.V. in Krefeld

### Ausbildung

- 07/06 Ausbildung zum Rettungshelfer NRW  
10/07 – 02/08 Ausbildung zum Rettungssanitäter

---

## Wissenschaftliche Tätigkeit

### Vorträge und Posterpräsentationen

- 05/2011 **HES 130 / 0,4 UND GELANTINE SCHÄDIGEN PROXIMALE NIERENTUBULUSZELLEN IN VITRO**  
**Bruno RR**, Schick MA, Neuhaus W, Roewer N, Foerster C, Wunder C, *Posterpräsentation auf der 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin*, 14. – 17.05.2011, Hamburg
- 09/2011 **BALANCIERTES HES 130 / 0,4 UND HUMANALBUMIN 5% SCHÄDIGEN HUMANE PROXIMALE NIERENTUBULUSZELLEN (HK-2) IN VITRO**  
**Bruno RR**, Schick MA, Neuhaus W, Roewer N, Wunder C, *Freier Vortrag auf dem Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie*, 11. – 13.09.2011, Berlin
- 10/2012 **THE IMPACT OF HYDROXYETHYLSTARCH 130 / 0.4 ON HUMAN PROXIMAL TUBULAR CELLS IN VITRO**  
**Bruno RR**, Schick MA, Neuhaus W, Roewer N, Wunder C, *Posterpräsentation auf dem ESICM, (25th Annual Congress of the European Society of Intensive Care Medicine)*, 13.– 17.10.2012, Lissabon
- 12/2012 **DIE SCHÄDIGENDE WIRKUNG VON KOLLOIDEN AUF PROXIMALE TUBULUSZELLEN (HK-2) WIRD NICHT DURCH INFLAMMATION VERURSACHT**  
**Bruno RR**, Schick MA, Neuhaus W, Neuhoff A, Roewer N, Wunder C, *Posterpräsentation auf dem zum 12. Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)*, 5. – 7. Dezember 2012, Hamburg
- 05/2013 **GRUNDLAGEN ZUR DIAGNOSTIK UND THERAPIE DER SEPSIS**  
**Bruno RR**, *Freier Vortrag am 03.05.2013 am Klinikum Forchheim*
- 05/2013 **GRUNDLAGEN ZUR DIAGNOSTIK, TRIAGE UND THERAPIE DER AKUTEN PANKREATITIS**  
**Bruno RR**, *Freier Vortrag am 17.05.2013 am Klinikum Forchheim*

- 02/2014 **DIE MOLEKÜLGRÖÖE UND DIE HERSTELLUNGSGRUNDLAGE (MAIS ODER KARTOFFEL) HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE SCHÄDIGENDE WIRKUNG VON HYDROXYETHYLSTÄRKE (HES) AUF PROXIMALE HUMANE NIERENTUBULUSEPITHELZELLEN IN VITRO**  
**Bruno RR**, Neuhaus W, Neuhoff A, Roewer N, Wunder C, Schick MA, *Freier Vortrag, 28. Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI, 14. – 15.02.2014, Würzburg*
- 12/2014 **HISTORISCHE URSPRÜNGE DER INFUSIONSTHERAPIE UND DEREN AKTUELLE RELEVANZ FÜR DIE DISKUSSION UM DIE KOLLOIDALE VOLUMENTHERAPIE**  
**Bruno RR**, Roewer N, Wunder C, Schick MA, *e-Poster Präsentation auf dem zum 14. Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI), 03. – 05.12.2014, Hamburg, (voraussichtlich)*
- [Auszeichnungen und Stipendien](#)
- 09/2011 3. Preis für freie Vorträge, Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie, 11. – 13.09.2011 Berlin
- 04/2013 Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, DGIM, 119. Internistenkongress in Wiesbaden, 6. – 9. April 2013
- 10/2013 Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, DGfN, Kongress für Nephrologie in Berlin, 5. – 8. Oktober 2013
- [Publikationen](#)
- 2011 **CLINICALLY RELEVANT DOSES OF HES 130/0.4 DECREASE VIABILITY OF HUMAN RENAL PROXIMAL TUBULUS CELLS (HK-2) IN VITRO**, Neuhaus W, Schick MA, **Bruno RR**, Schneiker B, Foerster C, Roewer N, Wunder C, *Anesthesia & Analgesia (Anesth Analg February 2012 114:371-374)*
- 2014 **MOLECULAR SIZE AND ORIGIN DO NOT INFLUENCE THE HARMFUL SIDE EFFECTS OF HYDROXYETHYL STARCH ON HUMAN PROXIMAL TUBULE CELLS (HK-2) IN VITRO**, **Bruno RR**, Neuhaus W, Roewer N, Wunder C, Schick MA, *Anesth Analg. 2014 Sep;119(3):570-7*
- 2015 **PHOSPHODIESTERASE-4 INHIBITION WITH ROLIPRAM ATTENUATES HEPATOCELLULAR INJURY IN HYPERINFLAMMATION IN VIVO AND IN VITRO WITHOUT INFLUENCING INFLAMMATION AND HO-1 EXPRESSION.**, Wollborn J, Wunder C, Stix J, Neuhaus W, **Bruno RR**, Baar W, Flemming S, Roewer N, Schlegel N, Schick MA., *J Pharmacol Pharmacother. 2015 Jan-Mar;6(1):13-23*
- 2015 **BALANCED HYDROXYETHYLSTARCH (HES 130/0.4) IMPAIRS KIDNEY FUNCTION IN-VIVO WITHOUT INFLAMMATION**, Schick MA, Baar W, **Bruno RR**, Wollborn J, Held C, Schneider R, Flemming S, Schlegel N, Roewer N, Neuhaus W, Wunder C, *PLoS One. 2015 Sep 4;10(9)*
- 2015 **THE INTERDISCIPLINARY MANAGEMENT OF ACUTE CHEST PAIN**, **Bruno RR**, Donner-Banzhoff N, Söllner W, Frieling T, Müller C, Christ M, *Dtsch Arztebl Int. 2015 Nov 6;112(45)*

### Kongressbeiträge

- 02/2014 **DIE MOLEKÜLGRÖÖE UND DIE HERSTELLUNGSGRUNDLAGE (MAIS ODER KARTOFFEL) HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE SCHÄDIGENDE WIRKUNG VON HYDROXYETHYLSTÄRKE (HES) AUF PROXIMALE HUMANE NIERENTUBULOSEEPITHELZELLEN IN VITRO**  
Bruno RR, Neuhaus W, Neuhoff A, Roewer N, Wunder C, Schick MA, 28. *Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI*, 14. – 15.02.2014, Würzburg
- 02/2014 **PHOSPHODIESTERASE-4-INHIBITION VERMINDERT DEN LEBERZELL-SCHADEN IN DER SYSTEMISCHEN INFLAMMATION IN-VITRO UND IN-VIVO OHNE EINFLUSS AUF DIE ENTZÜNDUNGSREAKTION UND DIE HÄMOXYGENASE-1 (HO-1)**  
Wollborn J, Wunder C, Stix J, Neuhaus W, Bruno RR, Flemming S, Roewer N, Schlegel N, Schick MA, 28. *Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI*, 14. – 15.02.2014, Würzburg

### Schriftliche Kongressbeiträge

- 02/2014 **DIE MOLEKÜLGRÖÖE UND DIE HERSTELLUNGSGRUNDLAGE (MAIS ODER KARTOFFEL) HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE SCHÄDIGENDE WIRKUNG VON HYDROXYETHYLSTÄRKE (HES) AUF PROXIMALE HUMANE NIERENTUBULOSEEPITHELZELLEN IN VITRO**  
Bruno RR, Neuhaus W, Neuhoff A, Roewer N, Wunder C, Schick MA, 28. *Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI*, 14. – 15.02.2014, Würzburg
- 02/2014 **PHOSPHODIESTERASE-4-INHIBITION VERMINDERT DEN LEBERZELL-SCHADEN IN DER SYSTEMISCHEN INFLAMMATION IN-VITRO UND IN-VIVO OHNE EINFLUSS AUF DIE ENTZÜNDUNGSREAKTION UND DIE HÄMOXYGENASE-1 (HO-1)**  
Wollborn J, Wunder C, Stix J, Neuhaus W, Bruno RR, Flemming S, Roewer N, Schlegel N, Schick MA, 28. *Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI*, 14. – 15.02.2014, Würzburg