

Diplomarbeit

**DER IN VITRO ABBAU VON CISATRACURIUM -
EINFLUSS EINER HÄMODILUTION**

eingereicht von
Vincent Verocai

zur Erlangung des akademischen Grades
**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Institut für Physiologische Chemie

unter der Anleitung von
Univ. Prof. Mag. Dr. Karl Öttl

Graz, 22.7.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 22.7.2015

Vincent Verocai, eh

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Univ. Prof. Mag. Dr. Karl Öttl, der mit allen Erwartungen übertreffendem Einsatz diese Arbeit betreut und mir die Welt des wissenschaftlichen Arbeitens in Theorie und Praxis näher gebracht hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Ashraf Dahaba, der im Rahmen seiner klinischen Forschungstätigkeit die Basis für diese Arbeit lieferte, sowie bei Univ.-Prof. Dr. Gilbert Reibnegger, der wertvolles Expertenwissen auf dem Gebiet der Pharmakokinetik und Statistik zu dieser Arbeit beisteuerte.

Bei Dipl. MTA Doris Payerl und Martina Brtnik möchte ich mich herzlich für ihre Hilfe und die angenehme Zusammenarbeit im HPLC-Labor des Instituts für Physiologische Chemie bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und all jenen guten Freunden bedanken, die mich während meines Studiums unterstützt und motiviert, aber auch immer wieder für die notwendige Ablenkung und Zerstreuung gesorgt haben - sie haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Prüfung eines in vitro Verfahrens zur laborchemischen Analyse des Abbaus von Cisatracurium um eventuelle Einflüsse des perioperativen Verfahrens der akuten normovolämischen Hämodilution (ANH) auf den Wirkstoff zu ermitteln.

Im Zuge dessen wurden in vitro Versuche durchgeführt, bei der die Abnahme der Konzentration von Cisatracurium in menschlichem Vollblut über einen Zeitraum von zwei Stunden hinweg der Konzentrationsabnahme gegenübergestellt wurde, die in mit kolloidaler Volumenersatzlösung (20% Gesamtanteil) verdünntem menschlichen Blut ermittelt wurde. Beide Gruppen bestanden aus insgesamt fünf Blutproben, aus denen zu vorgeschriebenen Zeitpunkten (0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 Minuten) Aliquots entnommen und mittels HPLC analysiert wurden. Die Konzentrationen wurden anhand einer Kalibrationsgeraden mit interner Standardisierung durch lineare Regression ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte in SPSS anhand eines Student-t-Tests für gepaarte Stichproben.

Die Ergebnisse zeigen einen Abbau mit einer Kinetik erster Ordnung und eine geringfügige, aber signifikante Zunahme der Halbwertszeit von Cisatracurium in der Hämodilutions-Gruppe.

Mögliche Ursachen für die gefundenen Unterschiede zwischen der Hämodilutions- und Kontroll-gruppe werden diskutiert, eine eindeutige Identifikation der Ursache ist aber anhand der angewendeten Methode nicht möglich.

Abstract

This thesis was aimed at developing and testing an in vitro method to determine whether or not the degradation of cisatracurium is influenced by the perioperative technique of acute normovolemic hemodilution (ANH).

For this purpose a series of in vitro tests (n=5) were conducted to compare the degradation of cisatracurium in human full blood to the degradation found in hemodiluted blood, in which 20% of the volume had been replaced with a colloidal volume expander. The degradation was measured over a time frame of 2 hours in total, during which samples were taken from both pools at pre-determined time points (0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 minutes).

The samples were analysed and the concentrations quantified by High-performance-liquid-chromatography using standard curves including internal standardization which were established daily prior to each test series. Statistical analysis was performed using a paired Student's-t-Test in SPSS.

The findings show a degradation following first order kinetics and a small, but statistically significant increase of cisatracurium half-life in hemodiluted human blood.

Possible causes behind these differences are discussed but could not be determined using the applied methodology.

Inhaltsverzeichnis

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	I
DANKSAGUNG.....	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	V
INHALTSVERZEICHNIS	VI
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 NEUROMUSKULÄR BLOCKIERENDE STOFFE	1
1.1.1 <i>Geschichte und Verwendung</i>	1
1.1.2 <i>Wirkungsweise und Einteilung neuromuskulär blockierender Wirkstoffe</i>	2
1.2 CISATRACURIUM	3
1.2.1 <i>Geschichte und Eigenschaften</i>	3
1.2.2 <i>Abbau von Cisatracurium</i>	4
1.3 AKUTE NORMOVOLÄMISCHE HÄMODILUTION	6
1.3.1 <i>Erläuterung des Verfahrens</i>	6
1.3.2 <i>Hydroxyethylstärke (HES)</i>	7
1.5 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE.....	8
2 MATERIALIEN UND METHODIK.....	10
2.1 MATERIALIEN	10
2.1.1 <i>Verwendete Proben und Materialien zur Probenvorbereitung</i>	10
2.1.3 <i>Verwendete HPLC-Anlage</i>	10
2.2 METHODIK.....	12
2.2.1 <i>Genauer Ablauf der Probengewinnung und Verarbeitung</i>	12
2.2.2 <i>Standardreihe und Interner Standard</i>	13
2.2.3 <i>Konzentrationsbestimmung</i>	13
2.2.4 <i>Bestimmung der Halbwertszeit</i>	14
2.2.5 <i>Statistische Auswertung</i>	15
3 ERGEBNISSE	17
2.1 ENTWICKLUNG DER METHODE.....	17
3.2 ANWENDUNG DER METHODE	20
4 DISKUSSION.....	23
4.1 ZIEL DER ARBEIT	23
4.2 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT IN VITRO STUDIEN.....	23
4.3 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT TIERMODELLEN	25
4.4 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT KLINISCHEN STUDIEN	26
4.5 ABSCHLIEßENDE ZUSAMMENFASSENDE BEMERKUNGEN	29
5 QUELLEN- UND LITERATURVERZEICHNIS	30
ANHANG	34
DATENBLATT DER VERWENDETEN MESSERGEBNISSE:.....	34

Glossar und Abkürzungen

ACh	-	Acetylcholin
ANH	-	Akute normovolämische Hämodilution
art.	-	Arteriell
ED ₉₅	-	Effektive Dosis für eine 95%ige Muskelblockade
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure, hemmt als Kalziumpuffer die Blutgerinnung
FDA	-	Food & Drug Administration, US-amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde
GSK	-	GlaxoSmithKline, Pharmaunternehmen
HES	-	Hydroxyethylstärke
HPLC	-	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HWZ	-	Halbwertszeit
IS	-	Interner Standard
NMBD	-	Neuromuscular blocking drug

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SUXAMETHONIUM (1)	1
ABBILDUNG 2: VECURONIUM (2).....	2
ABBILDUNG 3: ATRACURIUM (3).....	2
ABBILDUNG 4: CISATRACURIUM (11).....	4
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ABBAUS VON CISATRACURIUM (21)	5
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AKUTEN NORMOVOLÄMISCHEN HÄMODILUTION (6)	6
ABBILDUNG 7: BEISPIEL EINES AUSDRUCKS DER ERGEBNISSE EINER PROBENANALYSE MITTELS HPLC INKLUSIVE CHROMATOGRAMM	11
ABBILDUNG 8: ARBEITSPLATZ IM HPLC-LABOR AM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, MEDUNI GRAZ	11
ABBILDUNG 9: BEISPIEL EINES EXCEL-DIAGRAMMS MIT STANDARDGERADEN - R^2 BEZEICHNET DAS BESTIMMTHEITSMAS.	14
ABBILDUNG 10: BEISPIEL EINER LOGARITHMISCH ERMITTELTEN REGRESSIONSGERADEN ZUR BESTIMMUNG DER HALBWERTSZEIT	15
ABBILDUNG 11: CHROMATOGRAMM MIT GERINGER PEAKSCHÄRFE AUS EINER VERSUCHSREIHE MIT DER ERSTEN TRENNSÄULE.....	18
ABBILDUNG 12: CHROMATOGRAMM VON CISATRACURIUM UND INTERNEM STANDARD IN WÄSSRIGER LÖSUNG, ZWEITE VERWENDETE TRENNSÄULE.....	19
ABBILDUNG 13: CHROMATOGRAMM VON CISATRACURIUM IN MENSCHLICHEM PLASMA - WEITERES BEISPIEL AUS EINER VERSUCHSREIHE MIT DER ZWEITEN TRENNSÄULE. DAS CHROMATOGRAMM ZEIGT EINE UNZUFRIEDENSTELLENDEN ABGRENZUNG DER EINZELNEN PEAKS.	19
ABBILDUNG 14: CHROMATOGRAMM DER FÜR DIE ANALYSEN VERWENDETE TRENNSÄULE.....	20
ABBILDUNG 15: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER KONZENTRAIONSABNAHME DER ANH- UND KONTROLLGRUPPEN UNTER VERWENDUNG DER MITTELWERTE.....	21
ABBILDUNG 16: GRAFISCHE DARSTELLUNG DER ABNEHMENDEN CISATRACURIUM-KONZENTRATION IN VIVO (32)	28

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PLASMAKONZENTRATIONEN IM ZEITLICHEN VERLAUF IN KONTROLL- UND ANH-GRUPPE. MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN, SOWIE P-WERTE DES GEPAARTEN T-TESTS.....	22
TABELLE 2: ERMITTELTE HALBWERTSZEITEN FÜR DEN ABBAU VON CISATRACURIUM IN 5 GEPAARTEN PROBEN AUS VOLLBLUT (KONTROLLE) UND VERDÜNNTEM VOLLBLUT (ANH).....	22
TABELLE 3: MITTELWERTE UND STANDARDABWEICHUNGEN DER HALBWERTSZEITEN DES CISATRACURIUM-ABBAUS, ERGEBNIS DES T-TESTS FÜR GEPAARTE STICHPROBEN.	22

1 Einleitung

1.1 Neuromuskulär blockierende Stoffe

1.1.1 Geschichte und Verwendung

Peripher wirkende Muskelrelaxantien (englisch: Neuromuscular blocking drugs, NMBD) finden weltweit als Standardkomponente von Narkosen Anwendung im klinischen Alltag. Sie erleichtern die endotracheale Intubation, verbessern die Operationsbedingungen für den Chirurgen und senken den Verbrauch von Narkotika samt deren Nebenwirkungen. NMBD werden weiters bei Krämpfen infolge einer Strychnin-Vergiftung, beim Wundstarrkrampf oder in der Psychiatrie bei der Elektrokrampftherapie verwendet.(1) Das bekannteste Beispiel für Muskelrelaxantien dürfte das Pfeilgift Curare sein, welches Alexander von Humboldt um 1800 der breiten Öffentlichkeit präsentierte - Südamerikanische Stämme benutzen noch heute das aus verschiedenen Lianen-Arten gewonnene Gift zur Jagd.

Um 1950 kam es zur Entdeckung eines neuen Wirkmechanismus (siehe Abschnitt 1.1.2) und in weiterer Folge zur Entwicklung der depolarisierenden Muskelrelaxantien. Von dieser Substanzklasse ist heute jedoch nur noch der Wirkstoff Suxamethonium (Abb. 1) als Notfallmedikament in klinischer Verwendung. (1,2)

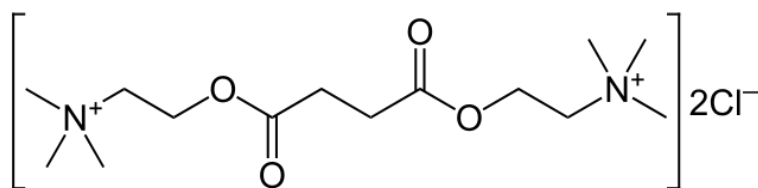


Abbildung 1: Suxamethonium (3)

Seit den 1960ern stehen die nicht-depolarisierenden Antagonisten aufgrund ihres günstigeren Nebenwirkungsprofils wieder im Zentrum des Interesses. Bei ihrer Entwicklung ging man zunächst von einem Steroidgerüst (z.B. Vecuronium, Abb. 2), später von einem Benzylisochinolin (z.B. Atracurium, Abb. 3) aus und fügte quaternäre Ammoniumverbindungen hinzu. Diese sorgen für eine Affinität zu Acetylcholinrezeptoren und führen auch zu Hydrophilie und Lipophobie der Substanzen. 1979 wurde Atracurium ersten klinischen Tests unterzogen, 1995 erfolgte die Zulassung von Cisatracurium in den Vereinigten Staaten. (1,4)

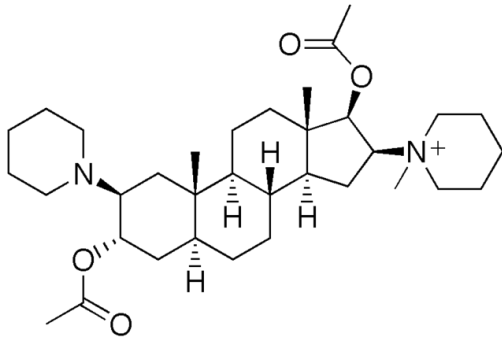


Abbildung 2: Vecuronium (5)

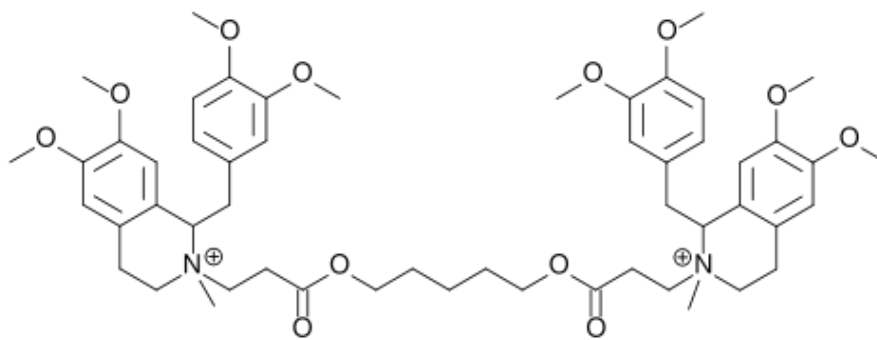


Abbildung 3: Atracurium (6)

1.1.2 Wirkungsweise und Einteilung neuromuskulär blockierender Wirkstoffe

Unter physiologischen Bedingungen führt die Erregung eines motorischen Nervs zur Freisetzung von Acetylcholin (ACh) in den synaptischen Spalt der motorischen Endplatte. Acetylcholin bindet an nikotinerge Rezeptoren des postsynaptischen Sarkolemm, die ionotrop sind, d.h. auch einen Ionenkanal darstellen. Dieser öffnet sich in Folge der Aktivierung durch ACh und führt zu einem Natriumeinstrom in die Muskelzelle und damit zur Depolarisation. Wird das Schwellenpotential von -50 mV erreicht, entsteht ein Aktionspotential, und die Muskelfaser kontrahiert sich. Acetylcholinesterasen der subsynaptischen Basalmembran spalten das Acetylcholin und die Zelle repolarisiert, bereit für eine erneute Aktivierung. (7)

Der Wirkmechanismus von Muskelrelaxantien setzt an den Acetylcholinrezeptoren am postsynaptischen Sarkolemm an. Anhand der Wirkung, die sie dort entfalten, werden depolarisierende von nicht-depolarisierenden Muskelrelaxantien unterschieden.

Depolarisierende Muskelrelaxantien binden als Agonisten an den Acetylcholinrezeptoren und aktivieren diese. Klinisch führt dies wie bei einer Aktivierung durch Acetylcholin zu einer initialen Muskelkontraktion.

Während Acetylcholin jedoch innerhalb von Sekundenbruchteilen abgebaut wird und die Zelle repolarisiert, bleiben Muskelrelaxantien länger an den Rezeptor gekoppelt und verhindern die Repolarisation - es kommt zu einer schlaffen Lähmung.

Aufgrund der mit ihnen verbundenen Nebenwirkungen (muskelkaterartige Schmerzen, maligne Hyperthermie, Hyperkaliämie) spielen depolarisierende NMBDs heute nur noch in Sondersituationen, etwa in der Notfallmedizin, eine Rolle.

Nicht-depolarisierende Muskelrelaxantien binden als Antagonisten an den Acetylcholinrezeptoren und führen somit zu keiner Depolarisierung, sondern verhindern diese durch eine Blockade der Rezeptoren. Nicht-depolarisierende NMBD sind ärmer an Nebenwirkungen und weisen eine längere Wirkdauer, aber auch einen verzögerten Wirkungseintritt gegenüber depolarisierenden NMBDs auf. (1)

1.2 Cisatracurium

1.2.1 Geschichte und Eigenschaften

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das nicht-depolarisierende Muskelrelaxans Cisatracurium (Abb. 4). Es ist eines von 10 optischen Isomeren aus denen Atracurium zusammengesetzt ist, der Anteil von Cisatracurium am Racemat Atracurium beträgt etwa 15%.

1989 gelang D A Hill und G L Turner erstmals die Synthese des Isomers. 1995 erfolgte die erstmalige Zulassung durch die US-Amerikanische FDA unter dem Handelsnamen Nimbex (**Excelent Neuromuscular Blocker**). (4,8)

Cisatracurium gilt als drei- bis viermal so potent wie Atracurium, die gängige Dosierung für die endotracheale Intubation Erwachsener liegt nach Herstellerangaben zwischen 0,1mg und 0,4mg pro Kilogramm Körpergewicht, die ED₉₅ (Dosierung die nötig ist um eine Muskelzuckung nach neuraler Stimulation in einem Erwachsenen zu 95% zu unterdrücken) beträgt 0,05mg/kg Körpergewicht. Die Wirkung tritt nach 2 bis 3 Minuten ein und dauert bei einer Halbwertszeit von 25 Minuten zwischen 40 und 50 Minuten an. (9–11) Auch hohe Dosen von Cisatracurium führen zu keiner nennenswerten Histamin-Ausschüttung, welche bei Atracurium schon in niedrig-normaler Dosierung auftreten kann

und immer wieder zu weiteren Komplikationen wie Blutdruckabfällen und Bronchospasmen führt. (12)

Ebenso fällt im Vergleich zu Atracurium weniger Laudanosin an, ein Abbauprodukt welches die Blut-Hirn-schranke durchdringen und Krampfanfälle auslösen könnte – die gängigen Dosierungen sowohl von Atracurium als auch Cisatracurium lassen jedoch zu wenig Laudanosin anfallen um eine solche Wirkung erzielen zu können. (13)

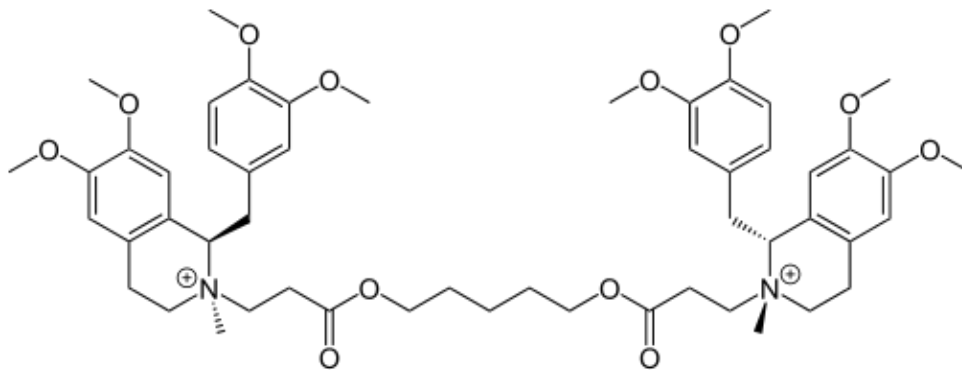


Abbildung 4: Cisatracurium (4)

1.2.2 Abbau von Cisatracurium

Ein weiterer klinischer Vorteil von Cisatracurium ergibt sich aus seinem Abbau im menschlichen Körper. Cisatracurium wird nur zu 23% durch Leber und Niere verstoffwechselt und ausgeschieden, der Großteil des Abbaus (77%) erfolgt organunabhängig größtenteils durch die Hofmann-Eliminierung (Abb. 5) und unspezifische Esterasen. (14) Der Anteil dieser unspezifischen Esterasen ist gegenüber der Hofmann-Elimination zu vernachlässigen, wie Weindlmayr-Goettel et al. in vitro zeigen. Die Zerfallsraten sowohl von Atracurium als auch von Cisatracurium in Pufferlösungen änderten sich nach der Zugabe von Carboxylesterasen nicht signifikant. (15) Welch konnte keinen Einfluss auf die in vitro Degradation von Cisatracurium in Plasma durch die Zugabe von Carboxylanhydrase-Inhibitoren feststellen. (16)

Weindlmayr-Goettel et al. gelang zudem der Nachweis, dass die Esterasen insbesondere an dem zweiten Reaktionsschritt (Hydrolyse von quaternärem Monoacrylat zu Monoquaternärem Alkohol) beteiligt sind. (15)

Bei der Hofmann-Eliminierung werden Säureamide in Amine umgewandelt. Im Falle von Cisatracurium wird dafür zunächst eine Stickstoff-Kohlenstoff Bindung gespalten - es entstehen ein tertiäres Amin (Laudanosin) und ein quaternäres Monoacrylat. Letzteres

wird in weiterer Folge enzymatisch durch Esterasen hydrolysiert, wobei Acrylsäure und ein monoquartärer Alkohol entsteht, welcher wiederum durch Hofmann-Elimination in ein Molekül Laudanosin und einen Acrylsäureester zerfällt. (16)

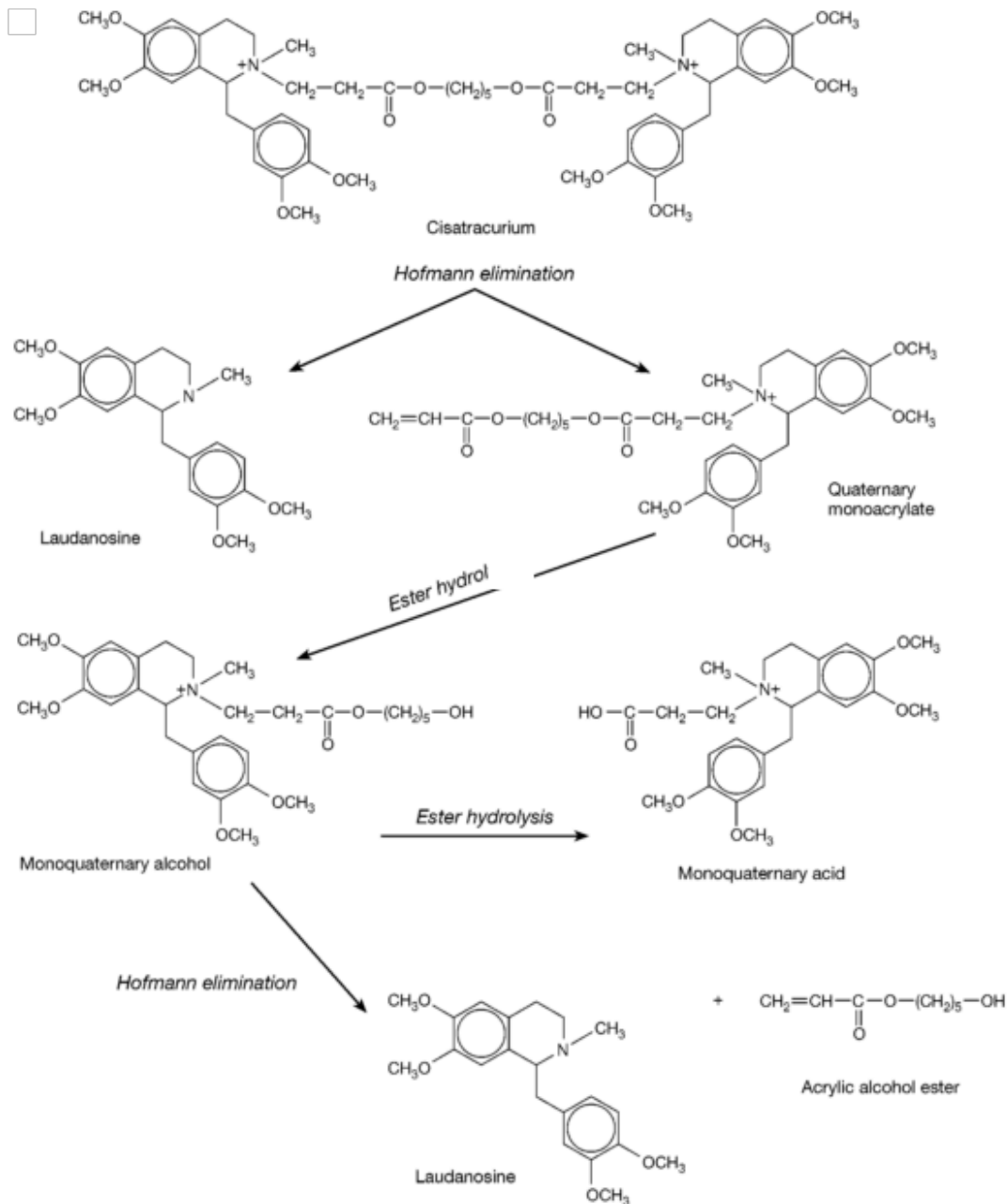


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Abbaus von Cisatracurium (17) - Aus einem Molekül Cisatracurium entstehen zwei Moleküle Laudanosin und ein Acrylsäure-Ester. Erfolgt der Abbau durch Esterasen, entsteht anstelle des Laudanosins eine Monoquaternäre Säure als stabiles Endprodukt.

Die Hofmann-Eliminierung ist abhängig von pH-Wert und Temperatur und die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit jeweils steigenden Werten zu. (18) In vitro

Versuche bei konstantem, physiologischem pH-Wert (7,4) und Temperatur (37°C) zeigen einen Einfluss der Zusammensetzung der Trägerlösung auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Zerfalls von Cisatracurium - eine erhöhte Basenkonzentration führt in vitro zu einem schnelleren Zerfall. Genauso üben die Elektrolyt-Konzentrationen, sowie im Plasma gelöste Moleküle wie beispielsweise Glukose einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus. (17)

1.3 Akute Normovolämische Hämodilution

1.3.1 Erläuterung des Verfahrens

Bei dem Verfahren der akuten normovolämischen Hämodilution (ANH), auch Präoperative Isovolumämische Hämodilution genannt, wird dem Patienten kurz vor Operationsbeginn Eigenblut durch den Anästhesisten entnommen und in Standard-Transfusionsbeuteln mit Antikoagulantien aufbewahrt. Um die Normovolämie zu erhalten, werden zellulose Flüssigkeiten substituiert, namentlich Kristalloide oder Kolloide (Abb. 6). Durch die damit erreichte Senkung des Hämatokrits ergibt sich ein geringerer Verlust von Erythrozyten, Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren, durch die im Anschluss an die Blutstillung stattfindende Retransfusion eine Einsparung an Fremdblut. (19)

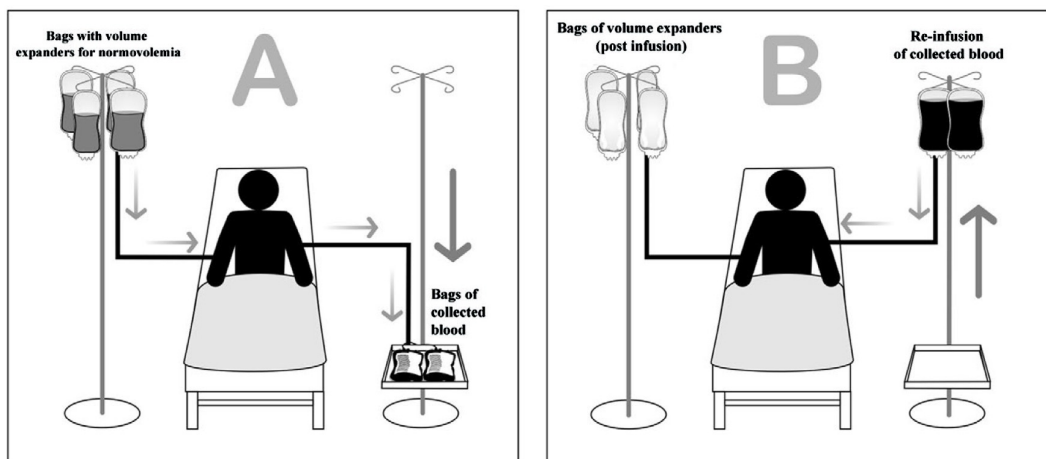


Abbildung 6: Schematische Darstellung der akuten normovolämischen Hämodilution (20)

Die Blutentnahme kann grundsätzlich über einen zentralen oder peripher-venösen, aber auch arteriellen Zugang erfolgen. Die Entnahmemenge richtet sich nach dem geschätzten Blutvolumen des Patienten, dem gemessenen Ausgangshämatokrit und dem für den

jeweiligen Patienten niedrigsten für vertretbar gehaltenen Hämatokrit. (20)

Durch die Senkung des Hämatokrits verbessern sich die rheologischen Eigenschaften des Blutes, der periphere Widerstand sinkt, der venöse Rückstrom zum Herzen wird verbessert, das Schlagvolumen und somit das Herzzeitvolumen steigt. Dadurch ist es dem (ansonsten gesunden) Organismus möglich das Sauerstoffangebot an das Gewebe bis zu einem Absinken des Hämatokrits auf 20% ohne Einschränkungen aufrechtzuerhalten (O_2 Angebot = HZV x art. Sauerstoffgehalt).(21)

Die Indikation zur ANH ist ähnlich der präoperativen Eigenblutspende gegeben, durch die akute Senkung des Hämatokrits jedoch auf einen zu erwartenden Blutverlust von bis zu 30% limitiert. Die wesentliche Voraussetzung ist ein Hämatokrit von über 34%, bzw. ein Hämoglobinwert von über 11 g/dL.

Neben der Anämie und Hypovolämie zählen zu den Kontraindikationen schwere Gefäßstenosen im Bereich der Koronarien oder der Karotiden, eine Aortenstenose Grad III oder IV, manifeste Linksherzinsuffizienz oder schwere pulmonale Erkrankungen die mit einer Erhöhung des ZVDs einhergehen, sowie Leberfunktions- oder Blutgerinnungsstörungen.

Bei leichtgradiger kardialer Vorerkrankung besteht keine Kontraindikation, da die akute normovolämische Hämodilution die Fließeigenschaften des Blutes verbessert und somit auch die Sauerstoffversorgung des Myokards erleichtert. (21,22)

1.3.2 Hydroxyethylstärke (HES)

Die sowohl von uns zur Simulierung des ANH-Verfahrens, als auch beim perioperativen, innerklinischen Verfahren selbst häufig angewendete Infusionslösung, Hydroxyethylstärke (kurz HES, in Handelsnamen auch HAES), ist ein Kolloid, d.h. es besteht aus relativ großen Teilchen (in diesem Fall ein künstliches Polymer) das im Blutkreislauf einen hohen kolloidosmotischen Druck ausübt und so weiteres Volumen aus dem Interstitialraum rekrutieren, bzw. einen weiteren Verlust von Volumen in diesen Interstitialraum verhindern oder bremsen kann. Die Lösung dieser Polymere erfolgt in einfacher Kochsalzlösung. Nach Herstellerinformationen (für das Produkt Voluven 6%) finden sich in 1000mL jeweils 154 mmol Na^+ - und Cl^- - Ionen. Der pH-Wert liegt zwischen 4,0-5,5. Hydroxyethylstärke war lange ein Standardmittel in der Volumentherapie. Nachdem in jüngerer Zeit jedoch mehrere Studien (23,24) publiziert wurden, die aufzeigten dass HES keinen Benefit gegenüber anderen Volumenersatzprodukten aufwies und sogar mit einer

höheren Mortalität bei kardial vorbelasteten Patienten in Verbindung gebracht wurde, ist HES weitestgehend verschwunden. In der Therapie der schweren akuten Hypovolämie besitzt es jedoch immer noch einen hohen Stellenwert und wird meist in Kombination mit kristalloiden Infusionslösungen verabreicht. (9,25)

1.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch: High Performance Liquid Chromatography - HPLC, früher auch High Pressure Liquid Chromatography) handelt es sich um ein Verfahren in der chemischen Analytik, mit dem sich die Bestandteile eines Stoffgemisches identifizieren und quantifizieren lassen.

Die Stofftrennung erfolgt dadurch, dass das Gemisch zwei verschiedenen Phasen ausgesetzt wird, die gegeneinander bewegt werden. Da die verschiedenen Komponenten unterschiedlich mit den Phasen interagieren, können sie getrennt werden, indem man das Stoffgemisch in einem Laufmittel (mobile Phase) durch die stationäre Phase in Form einer Trennsäule leitet. Die einzelnen Komponenten werden die Säule aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen zeitlich versetzt passieren.

Diese Wechselwirkungen beruhen vor allem auf der unterschiedlichen Polarität der beiden Phasen. In der Direktphasenchromatographie ist die stationäre Phase polar und die mobile Phase apolar, der Trennmechanismus ist Adsorption und Verteilung. Bei der auch in dieser Arbeit verwendeten Umkehrphasenchromatographie (englisch Reversed Phase, RP) wird eine apolare stationäre und dementsprechend eine polare mobile Phase verwendet, die Trennung erfolgt durch Verteilung auf Basis der unterschiedlichen Interaktionen zwischen den Phasen unterschiedlicher Polarität.

Bei der Umkehrphasentrennung lässt sich auch noch die sogenannte isokratische Trennung mit gleichbleibender Polarität der mobilen Phase von der Gradienten-Trennung unterscheiden. Bei letzterer erfährt das Laufmittel während der Analyse eine Veränderung seiner Polarität.

Nach Verlassen der Trennsäule werden die Komponenten einem Detektor zugeführt, der dafür verantwortlich ist, die aufgetrennten Substanzen nachzuweisen und dies in ein digitales Signal umzuwandeln um es sichtbar und verwertbar zu machen.

Detektoren können Konzentrationsabhängig die Anzahl der Teilchen pro Volumen (z.B. UV/VIS-Detektor, Fluoreszenzdetektor) oder Massenstromabhängig (Massenspektrometrischer Detektor) die Gesamtzahl der Teilchen bestimmen. Das gängigste - und auch in

dieser Arbeit verwendete - Verfahren stellt die Umkehrchromatographie in Kombination mit einem UV- oder Fluoreszenzdetektor dar.

Die Identifizierung der einzelnen Substanzen erfolgt über einen Vergleich der spezifischen Retentionszeit mit einer bekannten Referenzsubstanz, dem sogenannten Standard.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Erstellung einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz und Vergleich dieser mit den Ergebnissen der Probenanalyse. (26–28)

2 Materialien und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Proben und Materialien zur Probenvorbereitung

Für jede Versuchsreihe wurden 25mL menschliches Vollblut benötigt, die von freiwilligen SpenderInnen stammten. Die Blutabnahme erfolgte in mit EDTA oder Citrat versetzten standardisierten Entnahmeröhrchen. Die Hämodilution wurde mittels Hydroxyethylstärke (HES 6% Infusionslösung) durchgeführt. Um die weitere Degradierung des verwendeten Cisatracurium (Nimbex, Hersteller GSK) während der Probenverarbeitung zu verhindern, wurde 0,5M Schwefelsäure verwendet.

Acetonitril diente zur Ausfällung der Proteine um ein Verstopfen der Analyseeinheit zu verhindern, als interner Standard wurde Verapamil verwendet.

2.1.3 Verwendete HPLC-Anlage

Die Injektion der Proben erfolgte mittels eines "Triathlon" Autosamplers (Firma Spark). Als Pumpanlage diente ein "ESA 582 solvent delivery system" (Bartelt Labor- & Datentechnik Graz, Österreich), die Durchflussgeschwindigkeit der mobilen Phase durch die Trennsäule betrug 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die Trennsäule selbst war eine 150mm lange und 3mm breite "ACE-3" C18 Umkehrphasen - Säule. Diese Säule enthält Granulat von 3 μm Partikelgröße und langen, apolaren Kohlenwasserstoffketten. Um eine Druckentlastung des Systems herbeizuführen, wurde die Säule während der Analyse auf 50°C erwärmt. Zum Substanznachweis kam ein Detektor vom Model Hitachi F-1050 zum Einsatz, der auf dem Prinzip der Fluoreszenzspektroskopie basiert. Dabei wird der Fluoreszenzeffekt ausgenutzt und Materie mit Licht energetisch angeregt. Die in Folge abgegebene Lichtstrahlung mit spezifischer (größerer) Wellenlänge ermöglicht die Detektion eines Stoffes. In unserem Fall erfolgte die Anregung mit einer Wellenlänge von 240 nm, die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 320 nm durchgeführt. Der Detektor gibt die gemessene Fluoreszenzintensität als Spannung wieder, die mittel einer speziellen Software (EZ Chrom Elite der Firma VWR, Wien, Österreich) aufgezeichnet wurde. Ein Beispiel für ein Messergebnis in Form eines Chromatogramms zeigt Abb. 9., Abb. 10 gewährt einen Blick auf einen Arbeitsplatz im HPLC-Labor des Instituts für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz.

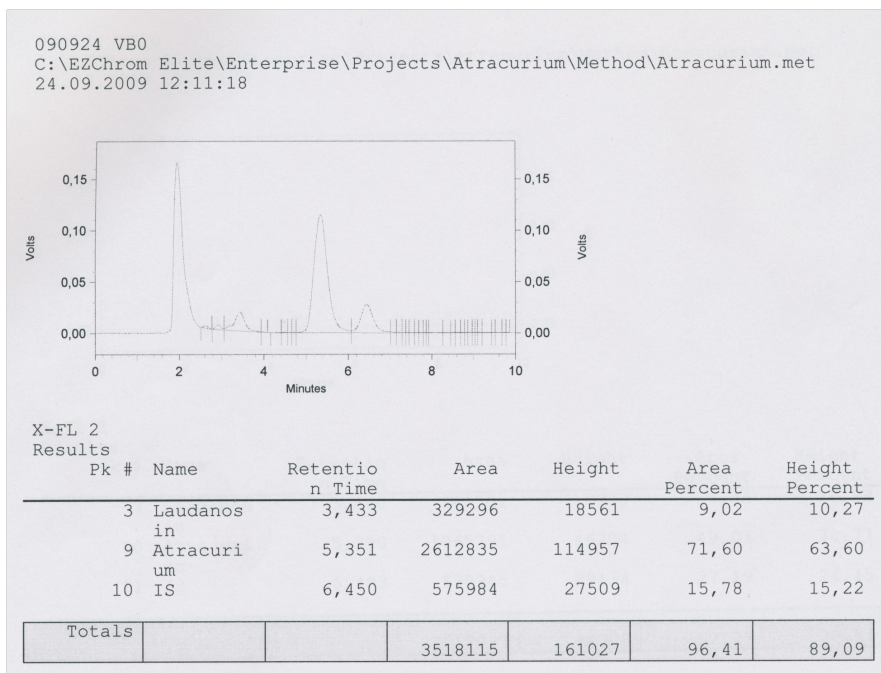


Abbildung 7: Beispiel eines Ausdrucks der Ergebnisse einer Probenanalyse mittels HPLC inklusive Chromatogramm

Da in unserem Fall die isokratische Trennung möglich war und auf eine graduelle Änderung der Polarität der mobilen Phase verzichtet werden konnte, wurde nur ein Laufmittel benötigt. Zusammengesetzt war dieses aus Acetonitril, Methanol und 0,04M Kaliumdihydrogen-phosphat (KH_2PO_4) im Mischungsverhältnis von 400 : 43 : 500 (v:v:v).



Abbildung 8: Arbeitsplatz im HPLC-Labor am Institut für Physiologische Chemie, Meduni Graz

2.2 Methodik

2.2.1 Genauer Ablauf der Probengewinnung und Verarbeitung

Für eine normale Versuchsreihe benötigten wir 25 mL Vollblut, das wir von freiwilligen Spendern - Institutsmitarbeitern und Studenten - gegen eine geringe finanzielle Entschädigung erhielten. Die Blutabnahmen wurden nach Unterzeichnung einer Einwilligungserklärung von geschultem Personal durchgeführt. Sowohl Na-Citrat als auch EDTA wurden als Antikoagulantien in den Entnahmeröhrchen verwendet.

Die Proben wurden nun in 2 Reihen gepoolt, die im Wasserbad auf 37°C gehalten wurden. Die erste Reihe stellte 12mL mit Cisatracurium versetztem Vollblut dar (120 µL Cisatracurium + 11,88 mL Vollblut), die zweite Reihe enthielt die selbe Konzentration von Cisatracurium, jedoch waren 20% des Blutvolumens durch Hydroxyethylstärke ersetzt worden (120 µL Cisatracurium + 2,4 mL HES + 9,48 mL Vollblut).

Sofort nach Zugabe des Cisatracuriums und zu sechs weiteren Messzeitpunkten (in Minuten: 10, 20, 30, 60, 90, 120), wurden 1,2 mL Probenlösung aus den beiden Reihen entnommen, auf Eis gestellt und bei 4°C mit 2500g für fünf Minuten zentrifugiert.

Vom überstehenden Plasma wurden 470 µL mittels Pipette abgehoben und in eine vorbereitetes Eppendorf-Röhrchen mit 10 µL internem Standard (IS - siehe Abschnitt 2.3.3 - Interner Standard und Standardreihe) und 20 µL 0,5M Schwefelsäure gegeben.

Dieser Schritt dient dazu, den pH-Wert der Probe zu senken um damit während der Probenverarbeitung einen weiteren Verlust von Cisatracurium durch die pH-Wert abhängige Hofmann-Elimination zu verhindern.

Von dieser Lösung wurden 400 µL entnommen und in einem weiteren Eppendorf-Röhrchen 800µL Acetonitril zugegeben. Acetonitril führt zu einer Ausfällung der Plasmaproteine, die entfernt werden müssen um ein Verstopfen der hier verwendeten und in Abschnitt 2.3 näher beschriebenen Analyseeinheit zu verhindern.

Nach weiteren 5 Minuten in der Zentrifuge bei 2500g und 4°C konnten 400 µL analysfähiges Probenmaterial gewonnen werden. Aus technischen und praktischen Gründen mussten die zu verschiedenen Messpunkten gewonnen Proben jedoch zeitgleich analysiert werden und die Proben deswegen vorerst konserviert werden. Dies erfolgte durch Verdampfung unter einem Stickstoffstrom in einer Abzugsanlage. Für die Analyse wurden diese Proben zu einem späteren Zeitpunkt in Laufmittel gelöst und dem Autosampler zugeführt.

2.2.2 Standardreihe und Interner Standard

Die Standardreihe wurde täglich noch vor Beginn der Probenabnahme hergestellt, dabei wurden Proben mit einem Volumen von jeweils 1mL hergestellt, die neben Aqua Bidest Cisatracurium in den Mengen 1000, 500 und 100 ng enthielten.

Zudem wurden alle Proben - inklusive der Standardreihe - mit einem internen Standard versetzt. In unserem Fall diente als IS Verapamil in einer Konzentration von 100 µg/mL von dem jeweils 10 µl, beziehungsweise 1000 ng den einzelnen Proben zugegeben wurde. Anhand des Verhältnisses zwischen der gemessenen Peakfläche von IS und der von Cisatracurium lässt sich mittels Regressionsanalyse jedem Verhältnis eine bestimmte Konzentration zuordnen. Aus der Berechnung des Verhältnisses zwischen untersuchter Substanz und dem internen Standard ergibt sich somit auch, dass etwaige Verluste durch eine langwierige und aufwendige Probenaufbereitung keinen Einfluss auf das Ergebnis nehmen, da die Bestandteile der Probe - inklusive internem Standard - gleichermaßen betroffen sind und sich die Verhältnisse nicht ändern.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung

Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte in Microsoft Excel. Das aus der HPLC gewonnene und zur Berechnung verwendete Messergebnis war das Peak-Höhen Verhältnis von Cisatracurium zu internem Standard. Zunächst wurde anhand der Analysedaten der mit Verapamil und Cisatracurium versetzten Standardreihe eine Kalibrationskurve ermittelt. Die aus den resultierenden Messdaten gewonnen Verhältnisse ließen sich damit einer bekannten Konzentration zuweisen.

Dafür wurden die Peakhöhenverhältnisse ermittelt und auf die x-Achse eines Diagramms übertragen, die Cisatracurium-Konzentration in ng/mL auf die y-Achse. Anschließend wurde die Ausgleichsgerade berechnet und deren Gleichung dargestellt (siehe Abb. 11). Diese Gerade entspricht den gemessenen Werten so genau wie möglich und wird auch als Trendline bezeichnet. Anhand ihr lässt sich jedem Punkt X (In diesem Fall das Peakhöhenverhältnis) ein Punkt Y (hier Konzentration von Cisatracurium) zuweisen. Die Standardgerade sollte sich im Bereich der erwarteten Konzentrationen befinden, aber auch ausreichend hohe oder niedere Werte beinhalten und die Konzentrationsberechnung so zuverlässig wie möglich zu gestalten. Wie die Abbildung zeigt, ist die Linearität und der Durchgang durch den Ursprung in hohem Maß gegeben.

Die Berechnung der Konzentrationen aus den Peakhöhenverhältnissen erfolgte in Microsoft Excel anhand der dargestellten Gleichung $y=k*x+d$. Hierbei bezeichnet k die Steigung der Geraden und d gibt den Schnittpunkt der Geraden mit der y -Achse wieder.

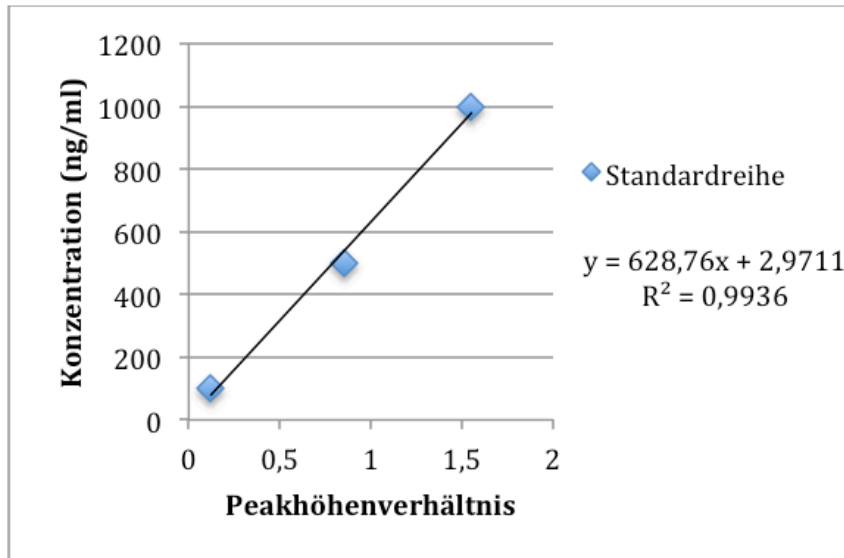


Abbildung 9: Beispiel eines Excel-Diagramms mit Standardgeraden - R^2 bezeichnet das Bestimmtheitsmaß.

2.2.4 Bestimmung der Halbwertszeit

Aus den publizierten Arbeiten zum in vitro Abbau von Cisatracurium geht hervor, dass dieser nach einer Kinetik erster Ordnung erfolgt. (16,17) Daher war es sinnvoll, die Halbwertszeit für diesen Abbau als entscheidende Variable zu ermitteln. Die Überprüfung, ob denn der Abbau einer Exponentialfunktion folgt (Kinetik erster Ordnung) und die Bestimmung der Halbwertszeit erfolgte durch eine Linearisierung des Verlaufs der Konzentration von Cisatracurium gegen die Zeit, indem man $\ln[c]$ gegen die Zeit aufträgt. In Excel wurde ein Diagramm erstellt (Abb. 12), die Ausgleichsgerade ermittelt und die Geradengleichung dargestellt. Der Graph und das Bestimmtheitsmaß der Geraden zeigen, dass der ursprüngliche Kurvenverlauf sehr gut einer Exponentialfunktion

$$c = c_0 * e^{-\lambda t}$$

entspricht, wobei c_0 die Konzentration zu Beginn und λ die Zerfallskonstante sind. Anhand der Steigungen der Geraden (=Zerfallskonstanten) konnten die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) nach

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

berechnet werden.

Im Beispiel in Abbildung 12 beträgt die Steigung k $-0,0143$. Die Zerfallskonstante λ für Cisatracurium beträgt in diesem fall also $0,0143$. Daraus berechnet sich die Halbwertszeit nach der oben genannten Formel: $\ln(2) / 0,0143 = 48,5$ Minuten.

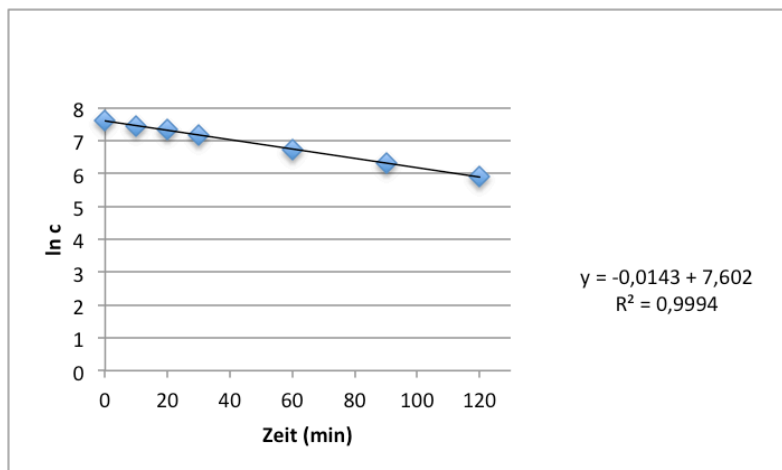


Abbildung 10: Beispiel einer logarithmisch ermittelten Regressionsgeraden zur Bestimmung der Halbwertszeit - R^2 bezeichnet das Bestimmtheitsmaß, darüber findet sich die Geradengleichung.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte am Computer mittels SPSS 22 und wurde in Form eines Student-t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Der Student-t-Test, beruht auf der Student-T-Wahrscheinlichkeitsverteilung, welche auf William Gosset zurückzuführen ist, der Anfang des 20. Jahrhunderts als Chemiker bei der Guinness-Brauerei in Dublin angestellt war. Da ihm sein Arbeitsgeber die Publikation seiner Ergebnisse untersagte, veröffentlichte er sie unter dem Pseudonym "Student". (29)

Im Laufe der Zeit haben sich unterschiedliche Formen des t-Tests gebildet, ihnen allen gemein ist die Berechnung eines t-Wertes und Vergleichs dessen mit der t-Verteilung.

In dieser Arbeit wurde ein t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Dieser Test wird angewendet um die Mittelwerte zweier Stichproben miteinander zu vergleichen und zu überprüfen, ob eventuell bestehende Unterschiede signifikant sind. Dies geschieht indem zunächst ein t-Wert berechnet und dieser mit der oben bereits erwähnten t-Verteilung verglichen wird. Ähneln sich die Ergebnisse der beiden Gruppen, zeigt sich dies als mathematische Bestätigung der Nullhypothese: dass zwischen den

Grundgesamtheiten kein Unterschied von statistischer Signifikanz besteht.

Ein gepaarter t-Test wurde deshalb verwendet, weil die Blutproben der Hämodilutions- und Kontroll-Reihen aus den selben Individuen gewonnen wurden.

Das Ergebnis dieses Vergleiches stellt die von SPSS ermittelte Signifikanz dar. Liegt sie oberhalb des Signifikanzniveaus (in unserem Fall 0,05), so kann man die Nullhypothese als bestätigt ansehen - liegt sie jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus, so muss man von der Alternativhypothese ausgehen, in unserem Fall dass ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen besteht.

3 Ergebnisse

2.1 Entwicklung der Methode

Ziel dieser Arbeit war es ein Verfahren zur laborchemischen Bestimmung der Konzentration von Cisatracurium in humanem Vollblut zu finden, um damit die Basis für in weiterer Folge am Institut für Physiologische Chemie der Meduni Graz durchgeführte Arbeiten zur Pharmakodynamik und Pharmakokinetik des Wirkstoffes zu stellen (z.B. Dahaba et al. - 2013 (30)).

Nach Literaturrecherche und Ausarbeitung eines Konzeptes erfolgte die Durchführung mehrerer praktischer Testreihen und anschließender Probenanalysen über mehrere Monate hinweg im HPLC-Labor des Instituts für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz.

Die erste Orientierung erfolgte anhand der reichlich vorhandenen Literatur zur HPLC-Analyse von Atracurium und auch Cisatracurium, wenn auch im Rahmen anderer Fragestellungen. Atracurium, die Vorgängersubstanz von Cisatracurium, ist seit 1983 auf dem Markt und die HPLC ein vielfach eingesetztes Werkzeug zur chemischen Analytik. Neill und Jones (31) berichteten bereits 1983 über erste erfolgreiche Konzentrationsbestimmungen von Atracurium in menschlichem Plasma. Kurz darauf, 1985 publizierten Stiller et al. (32) ihre Methode. 1998 untersuchten Welch et al. (16) den in vitro Zerfall von Cisatracurium in humanem Plasma und Rattenplasma mit ähnlichen Methoden wie in dieser Arbeit beschrieben. Die Verwendung einer C18-Trennsäule in diesem Versuch geht mitunter auf zuletzt genannte Publikation zurück, auch die Zusammensetzung unseres Laufmittel basiert zum Teil auf den Erfahrungen, die die Forschungsgruppe um Welch machte. Ebenfalls wichtig für die Entwicklung der hier präsentierten Methode war die Arbeit von Farenc et al. (1999) die bei der Wahl der Wellenlängen für die Fluoreszenzspektroskopie und der Erstellung von Kalibrierungskurven mittels Standardreihen sehr hilfreich war. (18)

Verschiedenste Schritte mussten praktisch erarbeitet und getestet werden. So konnten die Proben nicht einzeln unmittelbar nach ihrer Entnahme analysiert werden, sondern mussten erst konserviert werden um zu einem späteren Zeitpunkt gemeinsam untersucht zu werden. Dafür wurden zunächst Proben nach erfolgter Vorbereitung, aber noch vor der Analyse aufgrund der pH-Wert und Temperatur-Abhängigkeit der Hoffmann-Eliminierung angesäuert auf Eis gelagert. Später erfolgte die Konservierung bis zur Analyse durch zusätzliches Verdampfen unter einem konstanten Stickstoffstrom in einer Abzugsanlage.

Für die Analyse wurden diese Proben zu einem späteren Zeitpunkt in 500 mL Aqua Bidest gelöst.

Auch die bei der HPLC-Analyse verwendete Trennsäule wurde erst nach mehreren Testreihen mit insgesamt drei verschiedenen Säulen ermittelt. Zwar waren alle verwendeten Säulen für die Umkehrchromatografie bestimmte C18-Säulen, jedoch von unterschiedlichem Fabrikat und Alter. Die Chromatogramme der zuerst verwendeten Säule waren von niedriger Qualität (Abb. 13).

Die Genauigkeit der erfolgten Stofftrennung und damit Peak-Trennung und Darstellung im Chromatogramm ist ausschlaggebend für das Messergebnis. Bei Betrachtung des Chromatogramms stellt sie sich in der Regelmäßigkeit der auf- und absteigenden Schenkel einer Peak-Kurve dar. Nur solche regelmäßigen Ergebnisse sprechen für eine ordentlich erfolgte Separation der im Laufmittel gelösten Stoffe - Die zweite verwendete Säule zeigte eine höhere Peak-Schärfe bei Testläufen mit Cisatracurium und Internem Standard in wässriger Lösung (Abb. 14), Versuche mit Plasma lieferten jedoch wieder keine zufriedenstellende Ergebnisse (Abb. 15). Erst durch einen Wechsel zur dritten Trennsäule vom Fabrikat ACE-3 konnten verwertbare Chromatogramme gewonnen werden (Abb. 16).

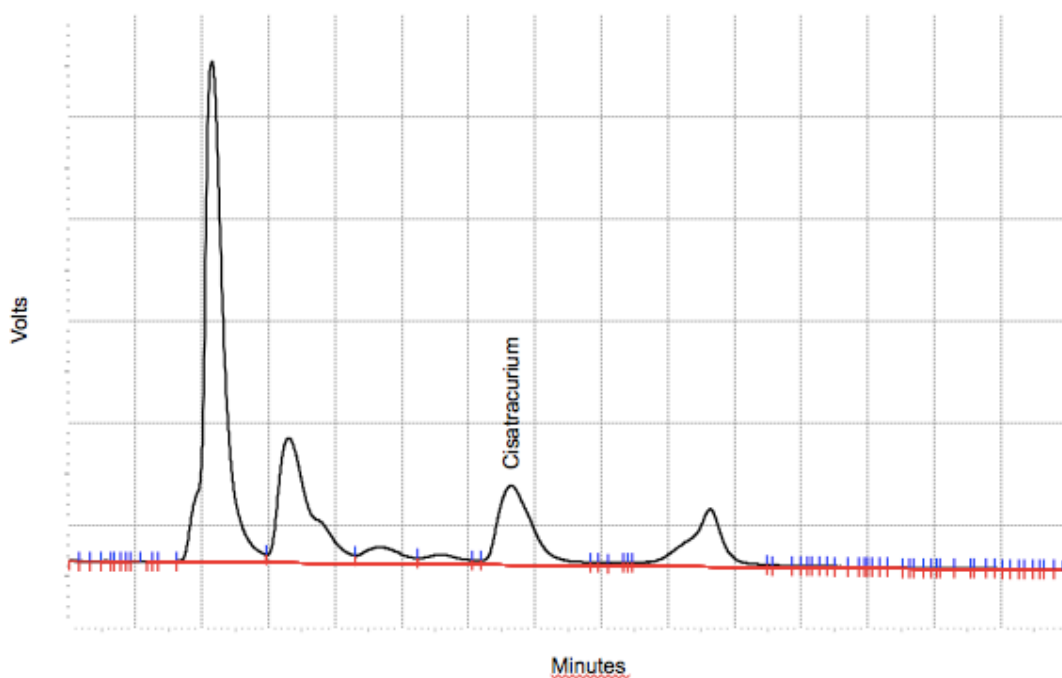


Abbildung 11: Chromatogramm mit geringer Peakschärfe aus einer Versuchsreihe mit der ersten Trennsäule

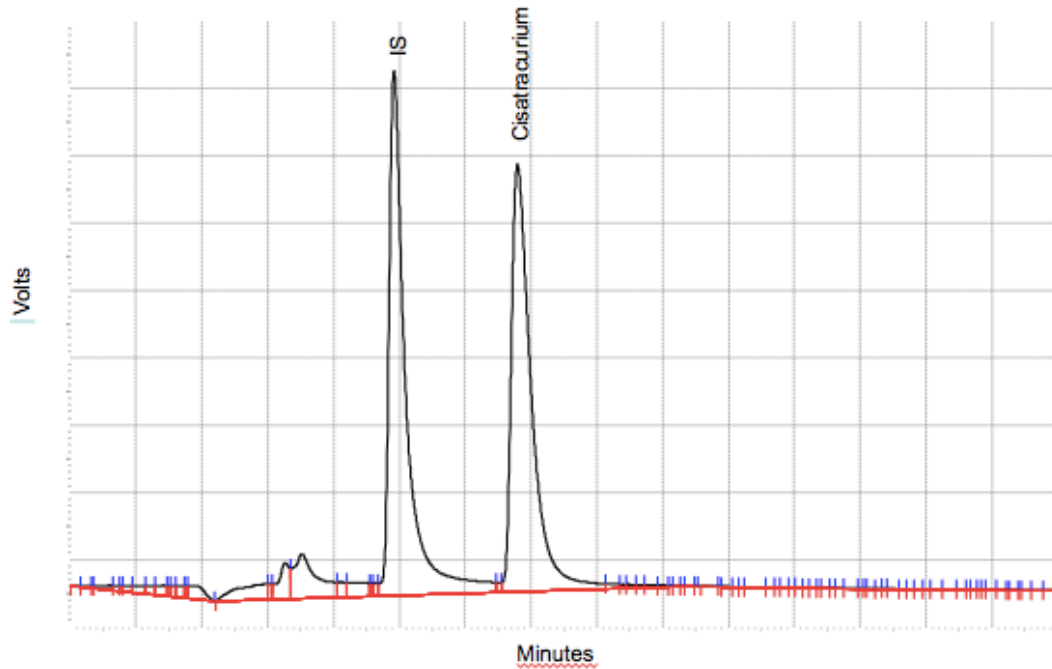


Abbildung 12: Chromatogramm von Cisatracurium und Internem Standard in wässriger Lösung, zweite verwendete Trennsäule - Die deutlich bessere Trennleistung und sauberen Peaks gegenüber Abb. 13 sind auf den ersten Blick erkennbar.

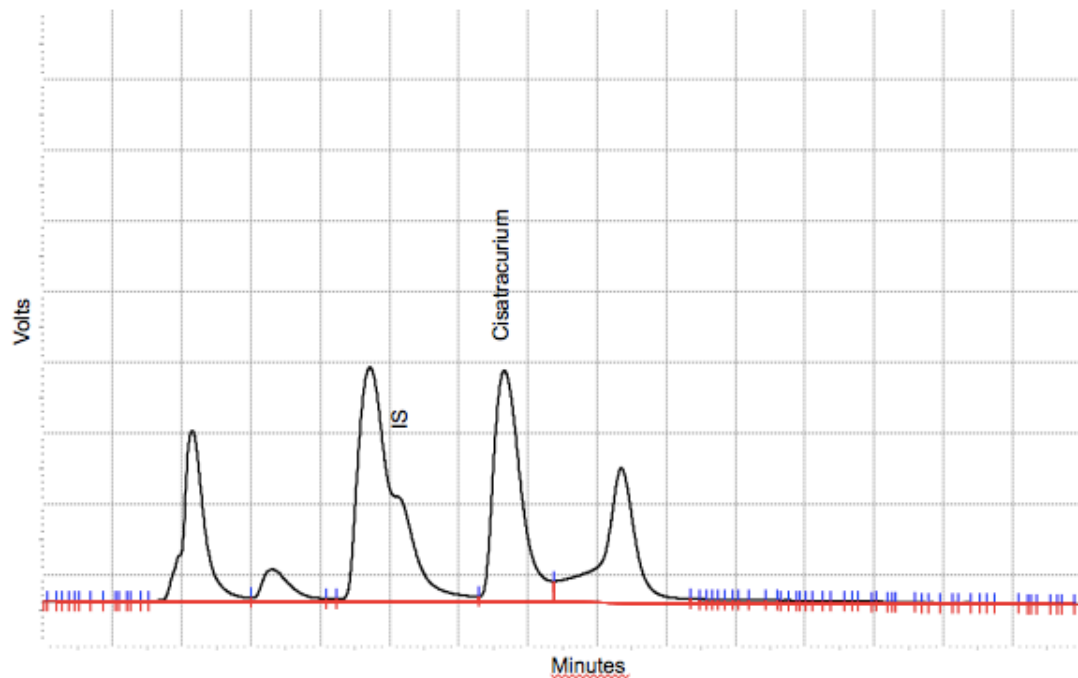


Abbildung 13: Chromatogramm von Cisatracurium in menschlichem Plasma - Weiteres Beispiel aus einer Versuchsreihe mit der zweiten Trennsäule. Das Chromatogramm zeigt eine unzufriedenstellende Abgrenzung der einzelnen Peaks.

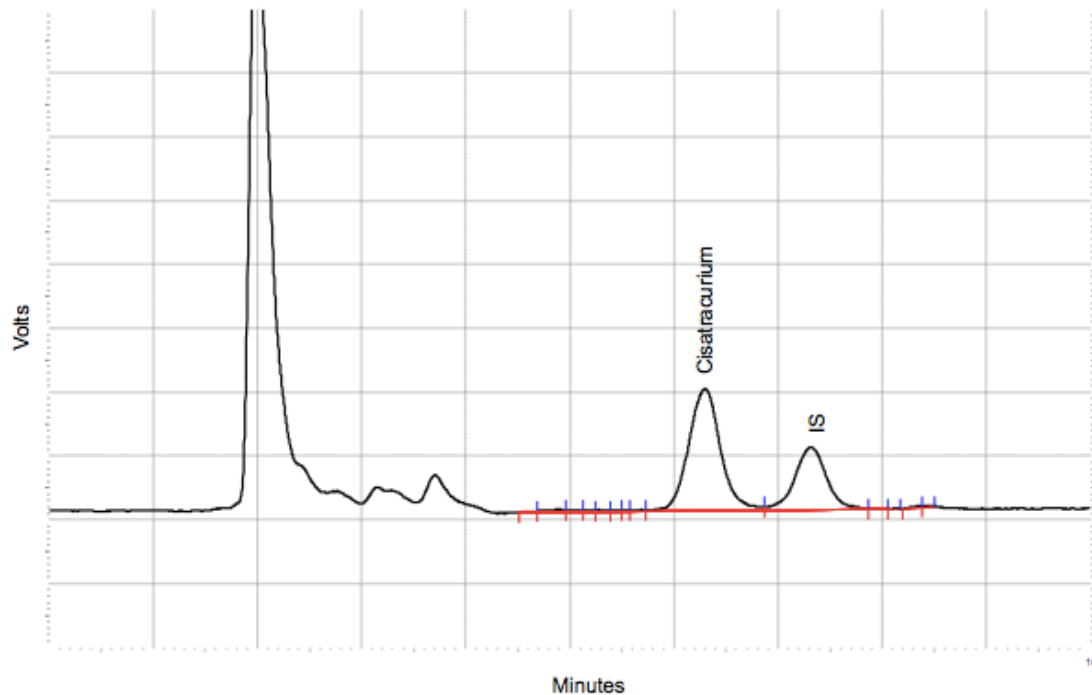


Abbildung 14: Chromatogramm der für die Analysen verwendeten Trennsäule - Die Peaks sind scharf voneinander abgrenzbar, die Kurven ähneln einer Gauß-Glocke und wurden in dieser Abbildung bereits Stoffen zugeordnet (siehe Beschriftung), IS bezeichnet den Internen Standard. Da es sich hierbei um einen frühen Messzeitpunkt handelt, ist ein Laudanosin-Peak (Abbauprodukt) entsprechend der niedrigen Konzentration noch nicht ausgeprägt.

Aufgrund des Ausblickes auf die Durchführung einer klinischen Studie wurden zudem sowohl mit Na-Citrat, als auch mit EDTA versehene Blutabnahmeröhrchen getestet. Bei den hier präsentierten Ergebnissen handelt es sich um EDTA-Reihen, in der klinischen Studie von Dahaba et al. wurde Na-Citrat verwendet, das analytische Verfahren wurde dadurch nicht beeinflusst.

3.2 Anwendung der Methode

Für die hier präsentierte Arbeit wurden Blutproben von fünf freiwilligen ProbandInnen verwendet, beide Geschlechter sind mehrfach vertreten, es wurde jedoch kein Augenmerk auf ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis gelegt, gendermedizinische Überlegungen spielten in dieser Arbeit keine Rolle.

Aus jeder Blutprobe wurde jeweils eine Versuchsreihe für die Kontrollgruppe und die damit zu vergleichende Hämodilutions-Gruppe gewonnen.

Aus den gewonnenen Messdaten wurden die Cisatracurium-Konzentrationen berechnet (Abbildung 17, Tabelle 1). Abb. 17 zeigt exemplarisch typische Verläufe der Cisatracurium-Konzentration in Vollblut bzw. verdünntem Vollblut während der

Inkubation auf 37°C. Die Kurven sind exponentielle Trendlinien. In Tab. 1 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen von Cisatracurium zu den verschiedenen Messpunkten angeführt.

Wie oben beschrieben wurden aus den gemessenen Zeitverläufen in den 5 Blutproben die Halbwertszeiten berechnet. Diese sind in Tabelle 2 angegeben. Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Halbwertszeiten und den p-Wert des gepaarten t-Tests.

Der Vergleich der für jede Probe ermittelten Halbwertszeiten ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der in vitro Degradation von Cisatracurium in menschlichem Vollblut und in mit kolloidaler Infusionslösung verdünntem Blut.

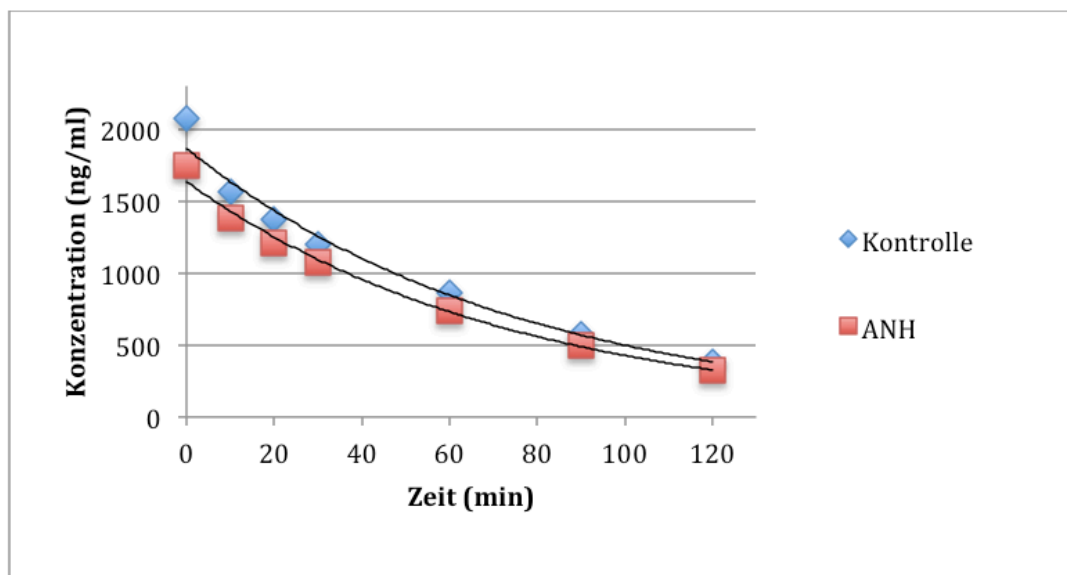


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Konzentrationsabnahme der ANH- und Kontrollgruppen unter Verwendung der Mittelwerte

Tabelle 1: Plasmakonzentrationen im zeitlichen Verlauf in Kontroll- und ANH-Gruppe. Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie p-Werte des gepaarten t-Tests.

Zeit (min)	Plasmakonzentration (ng/mL)				p-Wert
	Kontrolle		ANH		
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung	
0	2250,0	163,1	1905,4	140,7	0,000
10	1914,4	161,8	1656,4	91,0	0,002
20	1688,3	137,8	1455,8	88,7	0,005
30	1437,2	82,4	1284,2	95,0	0,000
60	937,8	100,7	815,4	68,4	0,003
90	614,6	47,5	550,4	51,2	0,001
120	404,6	40,5	367,6	33,1	0,001

Tabelle 2: Ermittelte Halbwertszeiten für den Abbau von Cisatracurium in 5 gepaarten Proben aus Vollblut (Kontrolle) und verdünntem Vollblut (ANH).

Halbwertszeiten (min)		
#	Kontrolle	ANH
1	53,3	52,9
2	48,5	51,0
3	45,0	46,8
4	48,1	50,2
5	48,5	50,6

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Halbwertszeiten des Cisatracurium-Abbaus, Ergebnis des t-Tests für gepaarte Stichproben.

	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler Mittelwert	p-Wert
Kontrolle	48,6	2,9	1,3	0.035
ANH	50,3	2,2	1	

4 Diskussion

4.1 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit gibt die, meines besten Wissens nach, erste Auseinandersetzung mit dem Einfluss der Hämodilution auf den Abbau von Cisatracurium in einem *in vitro*-Setting wieder. Sie zielte jedoch nicht darauf ab eigenständig nachzuweisen, ob die *in vivo* Pharmakokinetik von Cisatracurium durch das Verfahren der akuten normovolämischen Hämodilution beeinflusst wird - vielmehr sollte ein Verfahren der chemischen Analytik gefunden und getestet werden, mit dem dieser Nachweis im Rahmen einer klinischen Studie erbracht werden könnte - und später auch wurde. Das für die präsentierten Ergebnisse in dieser Arbeit angewendete Verfahren wurde von Dahaba et al. für die Analyse ihrer Proben am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz verwendet. (30)

Es konnte eine praktikable Probenvorbereitung zur Messung der Konzentration von Cisatracurium in Vollblut gefunden werden. HPLC-Trennung, Sensitivität und interne Standardisierung sind geeignet, Cisatracurium in den relevanten Konzentrationen (wie sie auch *in vivo* auftreten) zu quantifizieren. Die Linearisierung der Abbaukurven zeigt, dass – wie erwartet - von einer Kinetik erster Ordnung ausgegangen werden kann. Anhand der im Zuge dieser Arbeit etablierten Methode konnte gezeigt werden, dass durch eine normovolämische Hämodilution die Halbwertszeit von Cisatracurium gegenüber Vollblut signifikant verlängert wird.

4.2 Vergleich der Ergebnisse mit *in vitro* Studien

Im Verlauf einer klinischen Studie führten Dahaba et al. auch *in vitro* Versuchsreihen mit Vollblut und verdünntem Vollblut durch. In den von ihnen publizierten Ergebnissen stellen sie *in vitro* ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Cisatracurium-Konzentrationen beider Gruppen fest. Auch eine Verlängerung der Halbwertszeiten war bemerkbar, im Gegensatz zu den in der vorliegenden Studie präsentierten Ergebnissen war diese jedoch nicht statistisch signifikant. Die Messungen von Dahaba et al. ergaben Halbwertszeiten von 46,2 min in der Kontroll- und 49,5 min in der Hämodilutions-Gruppe. Die Ursache ist in der unterschiedlichen statistischen Auswertung zu suchen. Die Differenzen der Halbwertszeiten in der vorliegenden Studie sind ebenfalls nicht statistisch signifikant, wenn man mit einem ungepaarten t-Test auswertet ($p = 0,357$)

Wie in Tab. 1 ersichtlich, ist die Plasmakonzentration von Cisatracurium unter dem Einfluss der akuten normovolämischen Hämodilution erniedrigt. Die von Beginn an unterschiedlichen Plasmakonzentrationen erklären sich durch die unterschiedlichen Verteilungsvolumina aufgrund des erniedrigten Hämatokrits der Hämodilutions-Gruppe. Beim Vergleich der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass Dahaba et al. einen direkteren Vergleich mit in vivo Ergebnissen anstrebten und in vitro den pH-Wert der Proben konstant hielten. Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit gepaarte Proben verwendet, da die Probenpärchen vom selben Individuum stammten.

Die fehlende Steuerung des pH-Wertes der inkubierten Blutproben, aus denen die Messproben entnommen wurden, muss bei der Gegenüberstellung der hier präsentierten Methode und Ergebnisse mit ähnlichen in vitro Untersuchungen kritisch erwähnt werden. Die Änderungen der pH-Werte, die in anschließenden Messungen neuerlicher Blutproben für die normovolämische Hämodilution (20% Volumenersatz mit 6% HES in NaCl) beobachtet wurden, sind diskussionswürdig.

Die in vitro-Hämodilutions-Probe zeigte einen höheren (7,59) pH-Wert als die Kontrollgruppe (7,50). Der genaue Mechanismus der Alkalisierung durch die Hämodilution ist nicht eindeutig ersichtlich. Für in vitro Untersuchungen finden sich keine direkt vergleichbaren Ergebnisse. Nur in vivo wurden nach großzügiger Volumensubstitution mit NaCl-Lösungen Dilutionsazidosen beschrieben, die durch Verdünnungseffekte und NaCl-Substitution hervorgerufenen Veränderungen der Plasmazusammensetzung erklärt werden (siehe Abschnitt 4.4) - Faktoren die auch in einem in vitro Experiment Einfluss nehmen können.

Konzentrationsänderungen wichtiger Puffer wie Albumin und Hämoglobin können zu Verschiebungen des pH-Wertes führen. HCO_3^- ist essentiell für die Hoffman-Elimination im menschlichen Körper und anfällig für die Verdünnungseffekte. Genauso sind Elektrolyte am Säuren und Basengleichgewicht des menschlichen Körpers beteiligt. Auch das Enzym Carboanhydrase ist als Bestandteil der Erythrozyten von dem Verdünnungseffekt betroffen. Die Carboanhydrase katalysiert die Reaktion:



und bildet somit eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des pH-Wertes - Auswirkungen auf die Homöostase des Säuren-Basen-Haushaltes durch einen Konzentrationsabfall des Enzyms infolge einer Hämodilution sind anzunehmen.

In Folge des Gesetzes von Henry, nach dem sich die Partialdrücke von in Flüssigkeit gelösten Gasen den Verhältnissen in der Luftsäule über der Flüssigkeit anpassen, gibt die in vitro Blutprobe CO₂ (ca. 40mmHg Partialdruck) an die Atmosphäre (CO₂-Partialdruck ca. 0,3 mmHg) ab. Der CO₂-Verlust könnte theoretisch bei gefallener Carboanhydrase-Konzentration und somit gehemmter Umwandlung von Bikarbonat einen Basenüberschuss mit steigendem pH-Wert verstärken.

Einen Einfluss der Hämodilution auf die Pufferwirkung der Carboanhydrase vermuten auch Welch et al. bei ihrer Untersuchung des Cisatracurium-Abbaus in menschlichem Plasma und dem von Ratten (ohne Hämodilution). Welch und sein Team inkubierten Plasma sowie verschiedene Pufferlösungen und beobachteten dabei auch, dass der pH-Wert von Plasma in vitro kontinuierlich zunahm (bis hin zu Werten von 7,6 - 8,0). Die von ihnen gefundenen Cisatracuriums-Halbwertszeiten lagen im Bereich von 29.2 ± 3.8 Minuten. (16)

Welch stellte in seinen Untersuchungen an Plasma einen mit der Zeit ansteigenden pH-Wert fest. Im Unterschied zu der hier präsentierten Arbeit, bei der mit Vollblut gearbeitet wurde, verwendete Welch jedoch zellfreies Plasma. Im Rahmen dieser Arbeit gesondert durchgeführte ergaben nach 120 Minuten bei 37°C sowohl im Vollblut, als auch in der verdünnten Probe einen erniedrigten pH-Wert.

Dass die Halbwertszeiten für die Hämodilutions-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe bei alkalischerem pH-Wert dennoch verlängert sind, ist mit der Arbeit von Weindlmayr-Goettel et al. vereinbar. Sie zeigten, dass die Basenkonzentration in der Flüssigkeit ausschlaggebend für die Reaktionsgeschwindigkeit der Hofmann-Elimination ist.(17) Ein verdünnungsbedingtes Absinken der Bikarbonat-Konzentration könnte die Hoffmann-Eliminierung negativ beeinflussen, obwohl ein relativer Basenüberschuss besteht.

4.3 Vergleich der Ergebnisse mit Tiermodellen

Der direkte Vergleich der hier präsentierten Arbeit mit tierexperimentellen Modellen ist nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher Fragestellungen nur eingeschränkt möglich. Zumindest zwei Untersuchungen sind in Zusammenhang mit der Thematik dieser Arbeit dennoch erwähnenswert.

Almac et al. beschreiben in Tierversuchen zur Volumentherapie des hämorrhagischen Schocks hyperchlorämische Azidosen in Ratten. Die Versuchstiere erhielten bei einem

mittleren arteriellen Druck von 30mmHg nach Aderlass eine massive Infusionstherapie mit NaCl oder dem von uns verwendeten Voluven. Bei Tieren denen Hydroxyethylstärke in einer anderen Trägerlösung (Ringer-Acetat) infundiert wurde, fand sich keine Azidose. (33)

Die Azidose steht im Widerspruch zu der von mir in vitro festgestellten Alkalose nach Hämodilution mit 6% HES in NaCl, deckt sich jedoch mit an späterer Stelle genauer besprochenen klinischen Beobachtungen an menschlichen Patienten.(34)

Teloh et al. fanden in ihrer Arbeit zur Hämodilution an Ratten hingegen einen pH-Anstieg von 7,28 auf 7,4 in der HES 6%-Gruppe, dabei wurde der Hämatokrit schrittweise auf 10% gesenkt. Diese Gruppe vermutet die Ursache jedoch in einer Veränderung der Nierenfunktion, die durch die HES-Polymere hervorgerufen werden soll. (35)

Da die akute normovolämische Hämodilution sowohl in vivo als auch in vitro zu einer Vergrößerung des Plasmavolumens führt, wirken auch auf den Wirkstoff Dilutionseffekte und könnten über einen relativen Konzentrationsabfall die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen. Chen et al. wiesen an Hunden eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung für Cisatracurium anhand mehrerer pharmakokinetischer Parameter nach, die Halbwertszeiten blieben konstant.(36) Dies bestätigt die Rolle des Hofmann-Zerfalls als hauptverantwortlichen Weg für den Cisatracurium-Abbau: Der lineare Zusammenhang und die konstanten Halbwertszeiten sind Ausdruck eines Abbaus 1. Ordnung (der Hofmann-Elimination), der (unter den richtigen Voraussetzungen) unabhängig von Enzymen oder der Beteiligung weiterer Stoffe rein in Abhängigkeit von der Substrats-Konzentration erfolgt. Eine Beeinflussung der Halbwertszeit durch Dilutionseffekte auf Cisatracurium ist damit auszuschließen.

4.4 Vergleich der Ergebnisse mit klinischen Studien

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen einen geringen, aber signifikanten Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationen und Halbwertszeiten von Cisatracurium in der Hämodilutions- und der Kontroll-Gruppe (Tab. 3). Diese Ergebnisse wurden in einer inzwischen veröffentlichten klinischen Studie zur Pharmakokinetik von Cisatracurium unter dem Einfluss der akuten normovolämischen Hämodilution nur teilweise bestätigt. Dahaba et al. konnten klinisch zwar ebenfalls signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen und verlängerte Halbwertszeiten in der Hämodilutions-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe feststellen, letztere erwiesen sich jedoch als statistisch

nicht signifikant.

Die von Dahaba et al. ermittelten Halbwertszeiten betragen $26,76 \pm 9,83$ Minuten in der Kontrollgruppe und $37,24 \pm 20,94$ in der ANH-Gruppe.(30) Demgegenüber stehen die in vitro Werte der vorliegenden Studie von $48,68 \pm 2,97$ bzw. $50,3 \pm 2,2$ Minuten.

Der Vergleich der in vitro gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit mit klinischen Studien ist Einschränkungen unterworfen. In einem lebenden Organismus herrschen andere Bedingungen als im Laborsetting, wo die Wechselwirkungen vieler komplexer physiologischer Vorgänge nicht greifen.

Einer dieser Vorgänge ist die Verteilung pharmakologischer Wirkstoffe im Körper. Diese bezeichnet die unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Teilvolumina des Körpers. Wichtige Kompartimente sind das intravasale, interstitielle und intrazelluläre. In Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften (Molekülgröße, Polarität) des Stoffes wird die Diffusion in die und die Anreicherung in den verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich ausgeprägt sein, während die Körperkonstitution die vorhandenen Volumina beeinflusst. Nicht zuletzt ist auch die Durchblutung der einzelnen Gewebekomponenten von Bedeutung. Ein lipophiler Stoff wird sich besonders gut in Fettgewebe anreichern und die effektive Plasmakonzentration mit einer Zunahme der Lipophilie des Stoffes und/oder des Volumens des vorhandenen Fettgewebes sinken. Die Umverteilung lipophober, hydrophiler Stoffe wie des Cisatracurium findet vor allem in den Interstitialraum statt. In jedem Fall aber resultiert die Umverteilung in vivo in einem starken initialen Abfall der Plasmakonzentration (Abb. 18) im Vergleich zu in vitro Messungen. (1)

Aber selbst unter in vivo Bedingungen war die Konzentration von Cisatracurium in der ANH-Gruppe kleiner als in der Kontrollgruppe.

In vitro fehlt zunächst die metabolische Komponente des Körpers, es fallen keine, beziehungsweise nur sehr wenige saure Metaboliten, etwa Lactat aus Erythrozyten an. Andererseits kann ein vermehrter Zelluntergang zur vermehrten Freisetzung von Stoffen führen. Da in diesem Fall unter atmosphärischen Bedingungen gearbeitet wurde, kam es nach dem Gesetz von Henry auch zu einem starken CO_2 -Verlust an die Atmosphäre. Ein physiologisches Gleichgewicht des Säuren- und Basenhaushaltes darf also für unser in vitro Setting nicht einmal theoretisch angenommen werden, wie die Alkalisierung von Blutproben durch Hämodilution mit 6% HES in NaCl in den auf die Versuchsreihe folgenden pH-Messungen auch bestätigen.

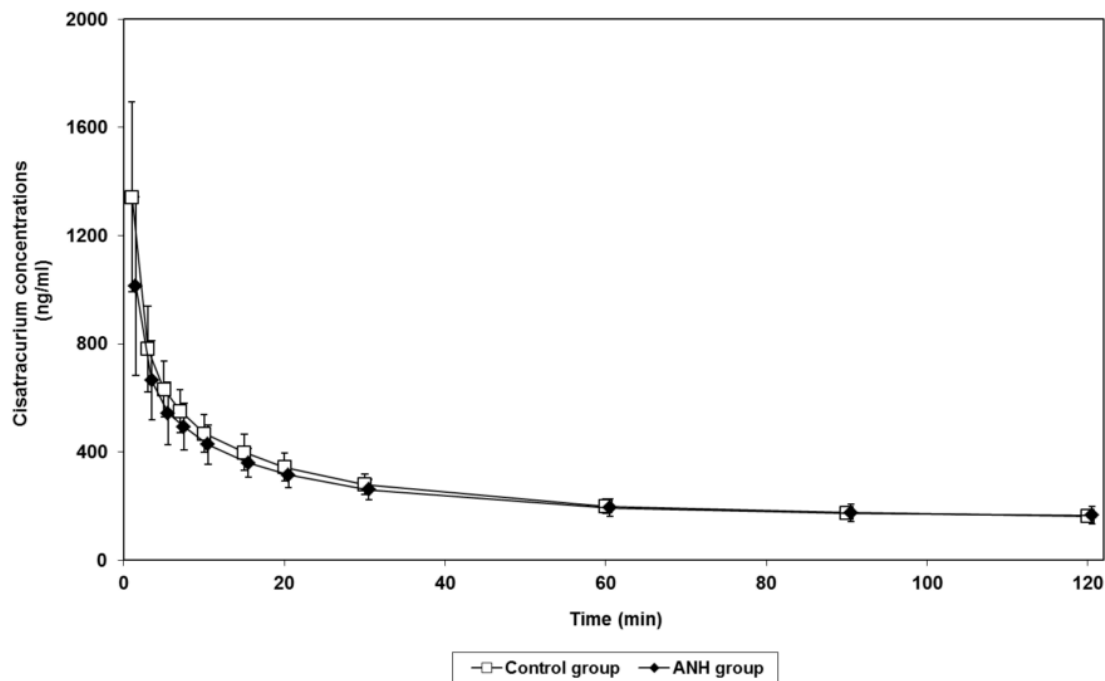


Abbildung 16: Grafische Darstellung der abnehmenden Cisatracurium-Konzentration in vivo (30) - Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kontroll- und ANH-Gruppe.

Im Gegensatz zu der in vitro Alkalisierung stehen in vivo die Ergebnisse von Rehm et al. Sie untersuchten 20 Patientinnen, bei denen eine akute normovolämische Hämodilution im Rahmen von gynäkologischen Eingriffen mit Albumin-Lösungen oder Hydroxyethylstärke durchgeführt wurde. Trägerlösung war in beiden Fällen NaCl und bei beiden Gruppen wurde eine hyperchlorämische Azidose festgestellt. Als mögliche Ursachen werden relativer Bikarbonat-Verlust durch Verdünnung, Änderungen der Albumin-Konzentration oder der Elektrolyt-Zusammensetzung genannt. (34)

Der Vollständigkeit halber muss auch der organabhängige Abbau von Cisatracurium erwähnt werden, dessen Einfluss in einem in vitro Setting völlig ausgeschaltet wird. 23% des Abbaus erfolgen nach Literaturangaben organabhängig über Leber und Nieren. (37) De Wolf et al. verglichen pharmakokinetische Parameter von Cisatracurium in Patienten mit schweren Lebererkrankungen mit Lebergesunden, konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied der Eliminations-Halbwertszeit feststellen. (8)

4.5 Abschließende zusammenfassende Bemerkungen

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden eine Methode zur Probenvorbereitung von Vollblut und eine anschließende HPLC-Messung zur Quantifizierung von Cisatracurium etabliert. Diese Methode wurde auf Ihre Eignung getestet, indem anhand von 5 Probenpärchen der Einfluss einer Hämodilution mit HES untersucht wurde. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass der Abbau von Cisatracurium in verdünntem humanem Blut *in vitro* geringfügig, aber signifikant langsamer verläuft als in Vollblut.

Der zugrundeliegende Mechanismus dafür ließ sich Anhand des Versuchsaufbaus nicht bestimmen - dies war jedoch auch nicht das Ziel dieser Arbeit.

Dass die Ergebnisse *in vivo* die Ergebnisse unserer Messungen nicht bestätigten, ist primär auf die unterschiedlichen Bedingungen, die *in vivo* im Vergleich zu unserem *in vitro*-Setting herrschen, zurückzuführen.

Da sich - aufgrund der unterschiedlichen Versuchsanordnungen - auch die statistischen Tests in den beiden Untersuchungen unterscheiden, ist auch ein Einfluss dieser Mittel auf die Auswertung der Messungen nicht völlig auszuschließen.

5 Quellen- und Literaturverzeichnis

1. Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. ed. München: Elsevier; 2005.
2. Jiao J, Huang S, Chen Y, Liu H, Xie Y. Comparison of intubation conditions and apnea time after anesthesia induction with propofol/remifentanyl combined with or without small dose of succinylcholine. *Int J Clin Exp Med* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 May 25];7(2):393–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3931593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Suxamethonium - Wikipedia [Internet]. [cited 2015 Apr 11]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Suxamethonium>
4. Cisatracurium besilate - Wikipedia [Internet]. [cited 2015 Apr 11]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Cisatracurium_besilate
5. Vecuronium - Wikipedia [Internet]. [cited 2015 Apr 11]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Vecuronium>
6. Atracurium - Wikipedia [Internet]. [cited 2015 Apr 11]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Atracurium>
7. Silbernagl, Despopoulos. Taschenatlas Physiologie. 7. ed. Stuttgart: Thieme; 2007.
8. De Wolf AM, Freeman JA, Scott VL, Tullock W, Smith DA, Kisor DF, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium in patients with end-stage liver disease undergoing liver transplantation. *Br J Anaesth* [Internet]. 1996 May [cited 2014 Jan 9];76(5):624–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8688259>
9. Schneider, Richling. Checkliste Arzneimittel A-Z. Digital. Stuttgart: Thieme; 2014.
10. Bryson HM, Faulds D. Cisatracurium besilate. A review of its pharmacology and clinical potential in anaesthetic practice. *Drugs* [Internet]. 1997 May [cited 2014 Jan 7];53(5):848–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129870>
11. Sparr HJ, Beaufort TM, Fuchs-Buder T. Newer neuromuscular blocking agents: how do they compare with established agents? *Drugs* [Internet]. 2001 Jan [cited 2014 Jan 7];61(7):919–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434449>
12. Wastila WB, Maehr RB, Turner GL, Hill DA, Savarese JJ. Comparative pharmacology of cisatracurium (51W89), atracurium, and five isomers in cats. *Anesthesiology* [Internet]. 1996 Jul [cited 2014 Jan 7];85(1):169–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8694363>

13. Fodale V, Santamaria LB. Laudanosine, an atracurium and cisatracurium metabolite. *Eur J Anaesthesiol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2014 May 25];19(7):466–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12113608>
14. Kisor DF, Schmith VD, Wargin WA, Lien CA, Ornstein E, Cook DR. Importance of the organ-independent elimination of cisatracurium. *Anesth Analg* [Internet]. 1996 Nov [cited 2014 Jan 7];83(5):1065–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895287>
15. Weindlmayr-Goettel M, Gilly H, Kress HG. Does ester hydrolysis change the in vitro degradation rate of cisatracurium and atracurium? *Br J Anaesth* [Internet]. 2002 Apr [cited 2014 Jan 7];88(4):555–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12066733>
16. Welch RM, Brown A, Ravitch J, Dahl R. The in vitro degradation of cisatracurium, the R, cis-R'-isomer of atracurium, in human and rat plasma. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1995 Aug [cited 2014 Jan 7];58(2):132–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648763>
17. Weindlmayr-Goettel M, Kress HG, Hammerschmidt F, Nigrovic V. In vitro degradation of atracurium and cisatracurium at pH 7.4 and 37 degrees C depends on the composition of the incubating solutions. *Br J Anaesth* [Internet]. 1998 Sep [cited 2014 Jan 9];81(3):409–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861132>
18. Farenc C, Audran M, Lefrant JY, Mazerm I, Bressolle F. High-performance liquid chromatographic method for the determination of atracurium and laudanosine in human plasma. Application to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* [Internet]. 1999 Mar 5 [cited 2014 Jan 7];724(1):117–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10202964>
19. Stehling L, Zauder H. Acute normovolemic hemodilution. *Transfusion* [Internet]. 1991 Nov [cited 2015 Apr 11];31(9):857–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1537-2995.1991.31992094675.x>
20. Santos AA dos, Silva JP da, Silva L da F da, Sousa AG de, Piotto RF, Baumgratz JF. Therapeutic Options to Minimize Allogeneic Blood Transfusions and Their Adverse Effects in Cardiac Surgery: A Systematic Review. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Apr 11];29(4):606–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714216>
21. Larsen. *Anästhesie*. 8. ed. München: Elsevier; 2006.
22. Nobahar MR, Chegini A, Behnaz F. Pre-operative blood donation versus acute normovolemic hemodilution in cardiac surgery. *Saudi J Anaesth* [Internet]. 2014 Jul [cited 2015 Apr 11];8(3):342–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4141381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Perner A, Haase N, Winkel P, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, et al. Long-term outcomes in patients with severe sepsis randomised to resuscitation with

- hydroxyethyl starch 130/0.42 or Ringer's acetate. *Intensive Care Med* [Internet]. 2014 Jul [cited 2015 Apr 14];40(7):927–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807084>
24. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, Billot L, Cass A, Gattas D, et al. Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Nov 15 [cited 2015 Feb 21];367(20):1901–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075127>
 25. Hydroxyethylstärke - Wikipedia [Internet]. [cited 2015 Apr 12]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Hydroxyethylstärke>
 26. Corradini D. *Handbook of HPLC, Second Edition*. 2nd ed. Corradini D, editor. CRC Press. CRC Press; 2010.
 27. Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Chemgapedia [Internet]. [cited 2015 Apr 11]. Available from: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu.html
 28. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - Wikipedia [Internet]. [cited 2015 Apr 11]. Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Hochleistungsflüssigkeitschromatographie>
 29. Student's t-Test [Internet]. [cited 2015 May 16]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Student's_t-test#History
 30. Dahaba AA, Suljevic I, Oetl K, Xiao Z, Dong H, Xiong L, et al. Influence of acute normovolemic hemodilution on the pharmacokinetics of Cisatracurium Besylate. *Minerva Anesthesiol* [Internet]. 2013 Nov [cited 2014 Jan 9];79(11):1238–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23698546>
 31. Neill EA, Jones CR. Determination of atracurium besylate in human plasma. *J Chromatogr* [Internet]. 1983 May 13 [cited 2015 Apr 13];274:409–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6688255>
 32. Stiller RL, Cook D, Chakravorti S. In vitro degradation of Atracurium in Human Plasma. *BJA Br J Anaesth* [Internet]. 1985 Nov [cited 2014 May 25];57(11):1085–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3840382>
 33. Almac E, Aksu U, Bezemer R, Jong W, Kandil A, Yuruk K, et al. The acute effects of acetate-balanced colloid and crystalloid resuscitation on renal oxygenation in a rat model of hemorrhagic shock. *Resuscitation* [Internet]. 2012 Sep [cited 2015 Apr 15];83(9):1166–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353638>
 34. Rehm M, Orth V, Scheingraber S, Kreimeier U, Brechtelsbauer H, Finsterer U. Acid-base changes caused by 5% albumin versus 6% hydroxyethyl starch solution in patients undergoing acute normovolemic hemodilution: a randomized prospective study. *Anesthesiology* [Internet]. 2000 Nov [cited 2015 Apr 15];93(5):1174–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046202>

35. Teloh JK, Ferenz KB, Petrat F, Mayer C, de Groot H. Acid-base and electrolyte status during normovolemic hemodilution with succinylated gelatin or HES-containing volume replacement solutions in rats. PLoS One [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Apr 15];8(9):e72848. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3759408&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Chen C, Yamaguchi N, Varin F. Dose-dependency of pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters after intravenous bolus doses of cisatracurium. Br J Anaesth [Internet]. 2008 Dec [cited 2014 Jan 7];101(6):788–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18974056>
37. Kisor DF, Schmith VD. Clinical pharmacokinetics of cisatracurium besilate. Clin Pharmacokinet [Internet]. 1999 Jan [cited 2013 Jul 25];36(1):27–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989341>

ANHANG

Datenblatt der verwendeten Messergebnisse:

Kontrollgruppe	Messzeitpunkt (min)	Konzentrationen (ng/mL)						Mittelwert
		Probe 1 (23.11.)	Probe 2 (24.11.)	Probe 3 (30.11.)	Probe 4 (1.12.)	Probe 5 (9.12.)		
Hämodilutions- gruppe	0	2143	2385	2294	2404	2024	2307	
	10	1806	2083	1955	2034	1694	1970	
	20		1847	1632	1745	1529	1741	
	30	1409	1526	1436	1499	1316	1468	
	60	947	1075	846	987	834	964	
	90	636	658	569	652	558	629	
	120	453	427	362	418	363	415	
	0	1921	2024	1921	1994	1667	1965	
	10	1634	1758	1683	1693	1514	1692	
	20		1544	1465	1481	1333	1497	
	30	1253	1379	1240	1384	1165	1314	
	60	809	894	784	868	722	839	
90	552	614	493	586	507	561		
120	406	391	335	374	332	377		