

**Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur
Charakterisierung der Transportvorgänge am Peritoneum**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Lisa Marie Finkler

Saarbrücken

2016

Tag des Kolloquiums:	20.03.2017
Dekan:	Prof. Dr. Guido Kickelbick
Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Speicher Prof. Dr. C.-M. Lehr
Vorsitz:	Prof. Dr. M. Schneider
Akad. Mitarbeiter:	Dr. S. Barthold

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2013 bis Oktober 2016 in der Firma Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, Standort St. Wendel, in der Abteilung GRD/PEC-SCC, Sterile Solutions/Packaging/Accessories Development (EMEA) unter der Anleitung von Herrn Dr. Robert Berlich, Herrn Dr. Thomas Schweitzer, Herrn Dr. Jens Burkhart und Herrn Dr. Alexander Piry von FMC, sowie Herrn Prof. Dr. Andreas Speicher vom Institut der Organischen Chemie an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Danksagung

In erster Hinsicht möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Speicher bedanken, der sich sofort für die Betreuung meiner Arbeit bereitgestellt hat und mir stets durch seine Ratschläge und Tipps eine sehr große Unterstützung war.

Herrn Prof. Dr. Claus Michael Lehr möchte ich für seine Bereitschaft, die Aufgabe des Zweitgutachters zu übernehmen, danken, sowie für die Anregungen und Tipps während der Promotionszeit.

Herrn Dr. Robert Berlich von Fresenius Medical Care gilt mein ganz besonderer Dank, dass ich an diesem interessanten Thema arbeiten konnte sowie meinen Betreuern Herrn Dr. Thomas Schweitzer und Herrn Dr. Jens Burkhart für die Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion. Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Paul Chamney für die zahlreichen Diskussion und Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit, sowie Herrn Dr. Alexander Piry widmen, der mich in der Endphase meiner Doktorarbeit bei Fresenius Medical Care tatkräftig unterstützt hat.

Ich bedanke mich besonders für die Unterstützung meiner Praktikantin Ursula Simon, meinen beiden Bacheloranden Marieke Welter und Stefan Gansel sowie der Diplomandin Lena Volz für die Zusammenarbeit und hervorragende Unterstützung durch ihre Arbeiten. Für die moralische Unterstützung und die Motivation stets weiter zu machen, möchte ich auch an dieser Stelle Afua Serwah, unserer ehemaligen Promotionsstudentin danken. Ein weiteres Dankeschön geht an Fabian Thum für die Konstruktionsarbeiten sowie an die Lehrwerkstatt, vor allem an Torsten Brill und Thorsten Lauer die mich in mechanischen und elektrischen Fragestellungen zu den Testsystemen stets unterstützt haben.

Während des praktischen Teils bei Fresenius Medical Care, wurde ich von der gesamten Abteilung GRD/PEC-SCC, Sterile Solutions/Packaging/Accessories Development (EMEA) sowie allen Studenten der letzten drei Jahre unterstützt. Ich möchte mich für die Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Abteilungen Biokompatibilität, Mikrobiologie, Analytik, Endkontrolle, Prozesskontrolle, Anwendungstechnik sowie Patentabteilung für die Hilfe und Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe der Organischen Chemie für die freundliche Integration in den Arbeitskreis während der Seminare und den Einblick in Synthesearbeiten bedanken. Im diesem Zusammenhang gilt ein besonderer Dank an Daniel Lamberty und Mirjam Jakob für die Synthese der Agonisten und Antagonisten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Robert Hampe und Herrn Prof. Dr. Thomas Heinze von der FSU Jena für die Synthese der Stärkederivate sowie zahlreiche Messungen und Diskussionen bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden, meinem Freund Robert und meiner gesamten Familie, meinem Bruder Christian und besonders meiner Mama danken, für das Verständnis, die stetige Unterstützung, Geduld, Ablenkung und Motivation.

Kurzfassung

Peritonealdialyse ist eine Behandlungsform des chronischen Nierenversagens. Hierbei wird dem Patienten eine Dialyselösung mit einem osmotischen Agens in den Bauchraum gefüllt und das Bauchfell des Patienten als semipermeable Membran genutzt, um Giftstoffe und überschüssiges Körperwasser zu entziehen. Die Druckdifferenz zwischen Dialyselösung und Blutplasma sowie die Porenstruktur der Blutgefäße ist verantwortlich für die Dialyseeffizienz. Die Poren der Blutgefäße werden in kleine, große Poren sowie Aquaporine unterteilt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *in vitro* Testsysteme entwickelt, um die Transportvorgänge am Peritoneum hinsichtlich Wasser- und Stofftransport zu charakterisieren. Diese wurden parallel genutzt, um den Effekt verschiedener Substanzen zu analysieren. Testsystem A erwies sich als geeignete Methode, um die Ultrafiltrationsleistung an den kleinen Poren des Peritoneums unter Verwendung verschiedener osmotischer Agenzien zu testen. Hierbei zeigten zwei neue Stärkopolymere als osmotische Agenzien eine hohe Ultrafiltrationsleistung. Testsystem B wurde als Zwischenstufe verwendet, um den Wassertransport an einer Aquaporinmembran zu analysieren. Ziel der Arbeit war die Etablierung des Testsystems C, um den Transport über alle Poren parallel zu erfassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Auswahl geeigneter Membranen getroffen und Versuche mit den osmotischen Agenzien Glucose und Icodextrin sowie einem Antagonisten an einer Aquaporinmembran durchgeführt.

Abstract

Peritoneal dialysis is a treatment option for chronic kidney failure. The dialysis solution with an osmotic agent is filled into the abdomen of the patient and the peritoneum the semipermeable membrane is used to remove toxins and water. The difference in pressure between dialysis solution and blood plasma as well as the pore structure of the blood vessels is responsible for the treatment effectiveness.

In the course of this work different *in vitro* test systems have been developed to characterize the transport processes of water and substances at the peritoneum. In parallel these test systems have been used to analyze the effect of different test substances. Test setup A proved to be an appropriate method to test the ultrafiltration performance of different osmotic agents at the small pores of the peritoneum. Two new starch derivatives have shown a high ultrafiltration performance in this evaluation. Test setup B was used as an intermediate stage to analyze the water transport through an aquaporin membrane. The main objective of this work was the establishment of test setup C to perform ultrafiltration experiments with all types of pores in parallel. In the context of this work a selection of suitable membranes has been made and experiments with glucose and Icodextrin as osmotic candidates as well as with an antagonist of aquaporins have been performed.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	7
2.1	Peritonealdialyse als Behandlungsmethode bei Nierenerkrankungen.....	7
2.1.1	Aufbau des Peritoneums.....	10
2.1.2	Transportvorgänge bei der Peritonealdialyse.....	13
2.2	Zusammensetzung einer PD Lösung	18
2.2.1	Osmotische Agenzien in der PD	22
2.2.2	Ultrafiltrationsverlauf osmotischer Agenzien	25
2.2.3	Agonisten und Antagonisten von Aquaporinen	27
2.3	Membrantransportmodelle.....	29
2.3.1	Membranmodell nach Pyle-Popovich.....	30
2.3.2	„3-Poren-Modell“ nach Bengt Rippe.....	33
2.3.3	„ <i>Distributed model</i> “ nach Michael Flessner	38
2.4	Membrantestverfahren in der Praxis am Patienten.....	39
2.4.1	Peritoneale Äquilibrationstest.....	40
2.4.2	<i>Peritoneal Dialysis Capacity</i> Test.....	42
2.4.3	<i>Peritoneal Function Test</i>	44
2.4.4	Software zur Interpretation von Membrantestverfahren	44
3	Aufgabenstellung	46
4	Experimenteller Teil <i>in vitro</i> Testsystem A	51
4.1	Materialien.....	51
4.1.1	Regenerierte Cellulosemembranen	51
4.1.2	Modellsubstanzen für <i>in vitro</i> Testsystem A.....	52
4.1.3	Alternative osmotische Agenzien von der FSU Jena	57
4.1.4	Testlösungen für Ultrafiltrationsversuche	60

4.2	Methoden	61
4.2.1	Ultrafiltrationsversuche zur Bestimmung der osmotischen Aktivität von Testsubstanzen in einem 1-Poren-Modell	61
4.2.2	Bestimmung von Konzentrationen verschiedener Substanzen über den Brechungsindex.....	66
4.2.3	Bestimmung der Osmolalität	68
4.2.4	Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes von Substanzen mittels Membranosmometrie.....	70
4.2.5	Quantitative Bestimmung der Glukosekonzentration über die enzymatische Methode	72
5	Ergebnisse und Diskussion <i>in vitro</i> Testsystem A	75
5.1	Ultrafiltrationsversuche zur Evaluierung von <i>in vitro</i> Testsystem A	75
5.1.1	Ultrafiltrationsversuche mit variierendem Füllvolumen und variierender Glucosekonzentration.....	76
5.1.2	UF-Versuche mit physiologischer Glucosekonzentration in der artifiziellen Plasmalösung und Variation der Matrixlösung	79
5.1.3	Ultrafiltrationsversuche mit variierender Porengröße der Dialysemembran	81
5.1.4	Diffusionsversuche mit variierender Porengröße der Dialysemembran	85
5.1.5	UF Versuche mit variierender Konzentration von Hydroxyethylstärke 50/0,2 im Außenmedium	87
5.1.6	Screening nach geeigneten Substanzen zur Substitution von Humanalbumin anhand deren kolloidosmotischen Druckes	89
5.1.7	Ultrafiltrationsversuche mit variierendem MWCO der Dialysemembran sowie BSA als Humanalbuminsubstituent im Außenmedium	92
5.2	Ultrafiltrationsversuche mit alternativen osmotischen Agenzien von FSU Jena	95
5.2.1	Einfluss von molarer Masse des Backbones auf die Ultrafiltration.....	95
5.2.2	Effekte von unterschiedlichem Amyloseanteil des <i>Backbones</i> auf die Ultrafiltration	98
5.2.3	Ultrafiltrationsergebnisse von Stärkepropylphosphonate mit Variation im Substitutionsgrad aus Tapioka K4484	102
5.2.4	Ultrafiltrationsergebnisse von Sulfoethylstärken mit Variation im Substitutionsgrad aus Tapioka K4484	105

5.2.5	Ultrafiltrationsergebnisse von Stärkepropylphosphonaten mit vergleichbarem Substitutionsgrad bei Variation des Stärkeursprungs.....	107
6	Experimenteller Teil <i>in vitro</i> Testsystem B	112
6.1	Material.....	112
6.1.1	Aquaporinmembran	112
6.1.2	Modellsubstanzen zum Test der osmotischen Aktivität.....	113
6.2	Methoden	114
6.2.1	Ultrafiltrationsversuche zur Bestimmung der osmotischen Aktivität von Modellsubstanzen an einer Aquaporinmembran	114
7	Ergebnisse und Diskussion <i>in vitro</i> Testsystem B	119
7.1	Einfluss der molaren Masse bei konstanter Teilchenanzahl auf die Ultrafiltrationsleistung.....	119
7.2	Ultrafiltrationsversuche mit Glucose und Polyglucose in variierender Teilchen- sowie Massenkonzentration an einer Aquaporinmembran.....	122
7.3	Einfluss von Wasser und Lösungsmatrix auf die Ultrafiltration bei Aquaporinen	124
8	Experimenteller Teil <i>in vitro</i> Testsystem C	133
8.1	Material.....	133
8.1.1	Membranen für Testsystem C.....	133
8.1.2	Modellsubstanzen	135
8.1.3	Agonisten und Antagonisten zum Testen an der Aquaporinmembran	136
8.2	Methoden	139
8.2.1	Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit von Membranen	144
8.2.2	Filtrationsversuche an Membranen mit Modellsubstanzen	149
8.2.3	Ultrafiltrationsversuche in <i>in vitro</i> Testsystem C	154
9	Ergebnisse und Diskussion <i>in vitro</i> Testsystem C	159
9.1	Ergebnisse der hydraulischen Leitfähigkeit von Membranen bei Raumtemperatur sowie 37 °C	159

9.2	Experimentelle Bestimmung einer repräsentativen Membran für kleine und große Poren	161
9.2.1	Größenbestimmung der verwendeten Modellsubstanzen mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung sowie intrinsischer Viskosität	162
9.2.2	Ergebnisse der Diffusionsexperimente von Modellsubstanzen	165
9.3	Ultrafiltrationsversuche mit Glucose und Polyglucose zur Bestimmung der osmotischen Aktivität in <i>in vitro</i> Testsystem C	173
9.3.1	Ergebnisse der Vorversuche zur Verwendung einer Aquaporinmembran in <i>in vitro</i> Testsystem C	173
9.3.2	Ergebnisse der Ultrafiltrationsversuche mit Glucose und Polyglucose	177
9.4	Effekt von Agonisten und Antagonisten an einer Aquaporinmembran auf die Ultrafiltration unter Verwendung von Glucosetestlösungen.....	182
10	Zusammenfassung.....	185
11	Ausblick	191
11.1	Automatisierung der Ultrafiltrationsversuche mit <i>in vitro</i> Testsystem A	191
11.2	Durchführung von UF-Versuchen mit Agonisten und Antagonisten an einer Aquaporinmembran.....	193
11.3	Bestimmung des spezifischen Reflektionskoeffizienten von Substanzen an Membranen.....	194
11.4	Durchführung von Membrantestverfahren unter <i>in vitro</i> Bedingungen	196
12	Literaturverzeichnis	198
13	Anhang	205
13.1	Rasterelektronenmikroskopaufnahmen.....	205

Abkürzungsverzeichnis

AcA	Acetaldehyd
AGE	<i>advanced glycation end products</i>
APD	automatisierte Peritonealdialyse
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAPD	kontinuierlich ambulante Peritonealdialyse
CCPD	kontinuierlich zyklischen Peritonealdialyse
CTA	Cellulosetriacetat
Da	Dalton
3-DG	3-Deoxyglucoson
3,4-DGE	3,4-Dideoxyglglucoson-3-ene
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	<i>degree of substitution</i>
FMC	Fresenius Medical Care
EMEA	<i>Europe Middle East Africa</i>
FoA	Formaldehyd
FSU	Friedrich Schiller Universität
GDP	<i>glucose degradation product</i>
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPC	Gelpermeationschromatographie
GRD	<i>Global Research & Development</i>
HD	Hämodialyse
HDF	Hämodiafiltration
HES	Hydroxyethylstärke

HF	Hämofiltration
5-HMF	5-Hydroxymethylfuraldehyd
HPD	<i>hydraulic pressure driven</i>
HPG	hochverzweigtes Polyglycerol
IPD	intermittierenden Peritonealdialyse
JGU	Johannes Gutenberg Universität
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
LED	<i>light emitting diode</i>
M_n	zahlenmittlere molare Masse
MTAC	Massentransferkoeffizienten
M_w	gewichtsmittlere molare Masse
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NIPD	nächtliche intermittierende Peritonealdialyse
OA	osmotisches Agens
OPD	<i>osmotic pressure driven</i>
PD	Peritonealdialyse
PDC	<i>Peritoneal Dialysis Capacity Test</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PEC	<i>Product Engineering Center</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEO	Polyethylenoxid
PES	Polyethersulfon
PET	Peritoneale Äquilibrationstest
PFT	<i>Peritoneal Function Test</i>
POL	<i>PatientOnLine</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskopaufnahmen

rpm	<i>revolutions per minute</i>
SCC	<i>Solutions Concentrates & Containers</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SES	Sulfoethylstärke
SPP	Stärkepropylphosphonat
UdS	Universität des Saarlandes
UF	Ultrafiltration

1 Einleitung

Nierenersatztherapien werden in der medizinischen Behandlung eingesetzt, um eine Reinigung des Blutes zu erzielen, sofern eine Vergiftung durch exogene oder endogene Faktoren vorliegt. Zu den Hauptaufgaben der Niere gehören die Ausscheidung toxischer Stoffwechselprodukte wie zum Beispiel Harnstoff (Urea) und Kreatinin, sowie die Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und des Säure-Base-Haushalts. Werden aufgrund einer akuten oder chronischen Nierenerkrankung diese Funktionen nicht mehr erfüllt, müssen diese durch eine Nierenersatztherapie übernommen werden.^{[1],[2]}

Man unterscheidet bei einem Nierenversagen zwischen akutem und chronischem Nierenversagen. Akutes Nierenversagen und somit ein Ausfall der exkretorischen Funktionen der Niere tritt innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen ein und ist im Normalfall eine reversible Verschlechterung der Nierenfunktion. Akutes Nierenversagen kann im Rahmen eines Multiorganversagens auftreten oder zum Beispiel nach einem Unfall durch Volumenmangel und Schockzustand. Die Ursache einer chronischen Nierenerkrankung ist meist die Folge einer entzündlichen Erkrankung der Niere. Der Krankheitsverlauf ist eher schleichend und nicht reversibel im Vergleich zum akuten Nierenversagen. Um eine Differenzierung zwischen akutem und chronischem Nierenversagen durchzuführen, müssen verschiedene klinische Untersuchungen sowie ärztliche Befragungen zum Krankheitsverlauf durchgeführt werden. Eine verkleinerte Niere, welche mittels Ultraschall überprüft wird, kann zum Beispiel ein Zeichen für eine chronische Nierenerkrankung sein. Des Weiteren werden Harnindizes wie zum Beispiel Harnosmolalität, Urin-Natrium Konzentration oder Harnstoff-Elimination hinzugezogen sowie Harnstoff und Kreatininkonzentration im Blut.^{[2],[3]}

Um eine chronische Nierenerkrankung effizient zu behandeln und somit eine Überwässerung und Vergiftung des Patienten zu vermeiden, ist es wichtig, die verschiedenen Stadien der Erkrankung zu kennen. In Tabelle 1 sind die Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach der unabhängigen Organisation „*Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*“ dargestellt.

Das Risiko an einem chronischen Nierenversagen zu erkranken steigt mit Grunderkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ II oder vaskulärer Nephropathie, eine Minderdurchblutung der Niere bedingt durch einen konstanten Bluthochdruck, stark an.^[4] Eine Klassifizierung der chronischen Nierenerkrankung findet des Weiteren anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR, das Flüssigkeitsvolumen, welches von allen Glomeruli pro Zeiteinheit filtriert wird), sowie der Albuminurie-Stadien statt (siehe Tabelle 1).^{[2],[5],[6]}

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach KDIGO.^[5]

Legende				Albuminurie-Stadien, Beschreibung, Exkretionsrate [mg/24 h]					
	Keine chronische Nierenerkrankung								
	Moderates Risiko			A1		A2	A3		
	Hohes Risiko			Normal bis leicht erhöht		Moderat erhöht	Stark erhöht		
	Sehr hohes Risiko								
				< 10	10-29	30-299	300-1999	≥ 2000	
GFR Stadien, Beschreibung, Rate [ml/min/ 1,73 m²]	G1	Normal bis leicht erhöht	> 105						
			90-104						
	G2	Mild eingeschränkt	75-89						
			60-74						
	G3a	Mild bis moderat vermindert	45-59						
	G3b	Moderat bis schwer vermindert	30-44						
	G4	Schwer eingeschränkt	15-29						
	G5	Terminales Nierenversagen	< 15						

Laut „European Best Practice Guidelines“ wird empfohlen, auf jeden Fall mit der Nierenersatztherapie zu beginnen, bevor eine GFR von 6 ml/min/1,73 m² erreicht wird.

Treten bereits Urämiesymptome vor Erreichen dieser Grenze auf, sollte die Behandlung bereits bei einer GFR von unter 15 ml/min/1,73 m² gestartet werden. Allgemein gilt die Phase 4 als Phase der aktiven Vorbereitung auf die Nierenersatztherapie.^[2]

Bei der Nierenersatztherapie wird prinzipiell zwischen zwei Methoden unterschieden:

Bei der Bauchfelldialyse oder auch Peritonealdialyse (PD), welche intrakorporal durchgeführt wird, dient das eigene Bauchfell als natürliche semipermeable Membran zur Reinigung des Blutes. In Abbildung 1 ist das Prinzip der PD schematisch dargestellt, wobei die Dialyselösung aus einem Beutel über einen Katheter in die Bauchhöhle gelangt und dort für mehrere Stunden in Kontakt mit dem stark durchbluteten Bauchfell steht. Durch die höhere Glucosekonzentration (1,5 bis 4,25%) in der Dialyselösung werden aufgrund des osmotischen Gradienten über Konvektion und Dialyse Giftstoffe und Wasser aus den Blutgefäßen in Richtung der Bauchhöhle entzogen.

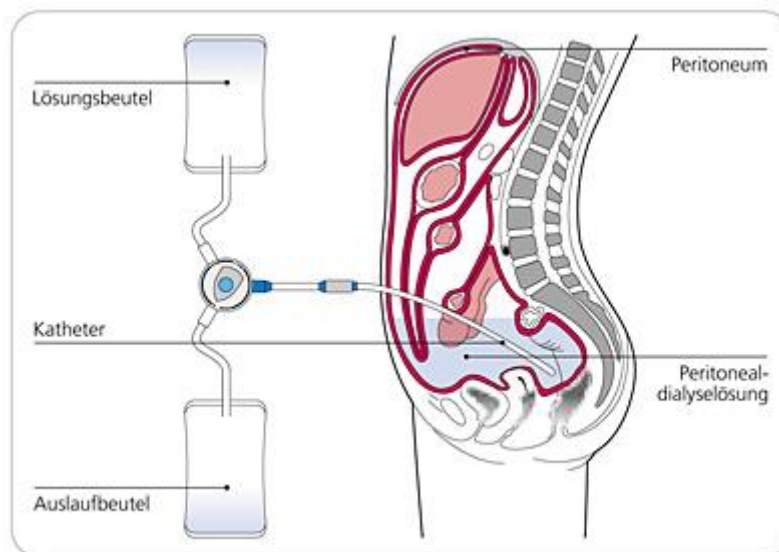


Abbildung 1: Prinzip der Peritonealdialyse.^[7]

Die andere Behandlungsmethode erfolgt extrakorporal über einen Dialysator und lässt sich in die Hämodialyse (HD), die Hämofiltration (HF) sowie die Hämodiafiltration (HDF) untergliedern.

Die Entfernung von harnpflichtigen Substanzen ist dabei abhängig vom Siebkoeffizienten der Membran. Bei der Hämodialyse wird das Blut des Patienten extrakorporal über einen Dialysator mit Hohlfasermembranen mit Hilfe einer Dialysemaschine und der darin enthaltenen Blutpumpe im Gegenstrom zur Dialysierflüssigkeit geführt (siehe Abbildung 2).

Das Blut wird dadurch von Giftstoffen und überschüssigem Körperwasser gereinigt und wieder in den Patienten zurückgeführt. Bei der Hämodialyse beruht der Stoffaustausch hauptsächlich auf Diffusion. Die Entfernung von Giftstoffen erfolgt über Diffusion aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Dialysat und ist neben dem Molekulargewicht der zu entfernenden Substanzen abhängig vom Blutfluss. Bei der Hämodialyse werden hauptsächlich niedermolekulare Substanzen entfernt.^{[2],[8],[7]}

Als weitere extrakorporale Nierenersatztherapie ist die Methode der Hämofiltration sowie Hämodiafiltration zu nennen. Bei der Hämofiltration erfolgt im Vergleich zur Hämodialyse eine stärkere Entfernung von harnpflichtigen Substanzen vor allem mit einem mittleren Molekulargewicht durch konvektiven Stofftransport aufgrund der druckgetriebenen Flüssigkeitsentfernung. Durch den Filtrationsprozess muss bei der Hämofiltration anschließend wieder Substitutionslösung zum Blutvolumen hinzugegeben werden. Die Hämodiafiltration gilt als Kombination beider Verfahren und wird angewendet, wenn eine Entfernung von kleinmolekularen sowie mittelmolekularen Substanzen benötigt wird. Somit wird bei der Hämodiafiltration eine hohe *Clearance* über den gesamten Molekulargewichtsbereich erzielt.^[8]

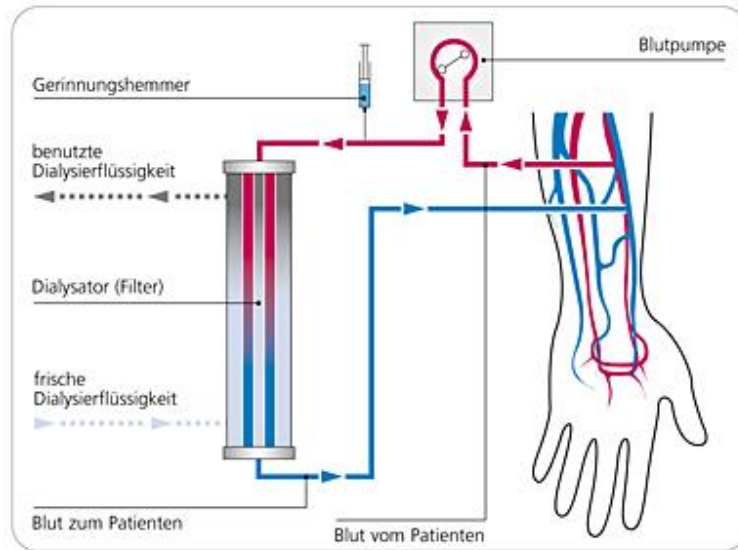


Abbildung 2: Prinzip der Hämodialyse.^[7]

Welche der beiden Behandlungsmethoden, ob Peritonealdialyse oder Hämodialyse, zum Einsatz kommt, hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Es wird bei einer chronischen Nierenerkrankung empfohlen, sofern möglich mit der Peritonealdialyse als Behandlungsmethode zu beginnen und wenn notwendig auf Hämodialyse zu wechseln. Studien belegen, dass sich dies positiv auf die Überlebensrate auswirkt.^[9] Die Vorteile der Peritonealdialyse gegenüber der Hämodialyse sind zum einen eine kontinuierliche Entgiftung und Entwässerung des Patienten und eine bessere Blutdruckeinstellung. Außerdem wird die Restnierenfunktion länger erhalten, was sich ebenfalls positiv auf die Lebenserwartung des Patienten auswirkt.^[8] Peritonealdialyse wird normalerweise Zuhause durchgeführt, im Gegensatz dazu wird Hämodialyse im Durchschnitt dreimal wöchentlich für 4-5 Stunden in Dialysezentren durchgeführt. Somit ist der Patient bei PD unabhängiger und flexibler in seinem Tagesablauf.^{[8],[10]} Die Verbreitungsform der Behandlungsmethode hängt entscheidend von den jeweiligen Vergütungsformen des Landes ab,^[11] wobei PD die kostengünstigere Behandlungsmethode darstellt und eher in sozial schwächeren Ländern und Regionen eingesetzt wird.^{[2],[12]} 2013 wurden ca. zwei Millionen Menschen mit einer chronischen Nierenerkrankung behandelt. Man rechnet außerdem weiterhin mit einem exponentiellen Wachstum der Patientenzahl.^[10]

Trotz der großen Vorteile der PD werden derzeit ca. 80% der Patienten mit Hämodialyse und nur 20% mit Peritonealdialyse behandelt. Grund hierfür ist, dass neben der Gefahr einer Bauchfellentzündung auch die Transportvorgänge durch das Bauchfell nicht vollständig verstanden werden. Derzeit beträgt die mittlere Überlebenserwartung bei einer chronischen Nierenerkrankung jedoch nur drei bis fünf Jahre,^[10] weshalb das frühzeitige Erkennen einer chronischen Nierenerkrankung und eine Verbesserung der Behandlungsform dringend notwendig ist. Bei der HD wird die Filtrationsfunktion der Niere durch ein technisches System nachgebildet. Dies erleichtert die Optimierung, da erste Schritte *in vitro* durchgeführt werden können. Bei der PD fehlt momentan ein System, mit welchem man die Stoffwechselvorgänge *in vitro* untersuchen kann. Neue innovative Substanzen zur Behandlung müssen derzeit empirisch und aufwändig mit Hilfe von *in vivo* Versuchen erprobt werden. Deshalb besteht der dringende Bedarf eines *in vitro* PD Testsystem zum Screening neuer osmotischer Substanzen und Simulation der Transportvorgänge am Peritoneum.

2 Kenntnisstand

2.1 Peritonealdialyse als Behandlungsmethode bei Nierenerkrankungen

Peritonealdialyse ist eine Behandlungsmethode bei terminaler Niereninsuffizienz, wobei das Bauchfell des Patienten als natürliche Membran zur Reinigung des Blutes verwendet wird (siehe Abbildung 1). Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, wird bei der PD die Dialyselösung über einen fest implantierten Katheter in die Bauchhöhle eingeleitet und steht dort für eine definierte Zeit mit dem Peritoneum in Kontakt. Es findet aufgrund eines höheren osmotischen Druckes in der Dialyselösung, hervorgerufen durch Glucose oder ein anderes osmotisches Agens, ein Flüssigkeitstransport und somit ein Mittransport von Urämietoxinen wie z.B. Urea oder Kreatinin in Richtung der Dialyselösung im Bauchraum statt. Nach einer definierten Zeit lässt man die Dialyselösung wieder (siehe Abbildung 1) über die Schwerkraft in den Auslaufbeutel abfließen.^{[7],[8],[13]}

Es gibt verschiedene Verfahrensarten, um die PD durchzuführen. Bei der sogenannten CAPD (kontinuierlich ambulante Peritonealdialyse, CAPD) erfolgt das Ein- und Ausleiten der Beutellösung manuell, während bei der APD (automatisierte Peritonealdialyse, APD) eine Maschine, ein sogenannter *Cycler* verwendet wird. Bei der CAPD beträgt das Volumen der Dialyselösung zwischen 1,5 und 2,5 l, welche zwischen 5 und 8 Stunden im Bauchraum verweilt. Der Wechsel findet im Durchschnitt drei bis fünfmal täglich statt. Bei der APD übernimmt der *Cycler* den Wechsel des Dialysates und kontrolliert somit Faktoren wie Einlaufmenge, Verweilzeit sowie Auslaufmenge.^{[8],[14]}

In Abbildung 3 ist eine Übersicht der verschiedenen PD-Verfahrensarten dargestellt, wobei zusätzlich zur Variante zwischen CAPD und APD die Zykluszeiten variiert werden. Unter Modus a ist die manuelle kontinuierliche ambulante PD dargestellt. Modus b und c stellen beide eine Form der kontinuierlich zyklischen Peritoneal Dialyse (CCPD), wobei hier die Peritonealhöhle durchgehend mit Dialysat gefüllt ist.

Je nach Anforderung wird der Wechsel der Dialyselösung ein (b) bis zweimal (c) täglich durchgeführt. Modus d und e stellen beides Formen der intermittierenden PD (IPD) dar, wobei dies bei d ausschließlich nachts durchgeführt wird (nächtliche intermittierende PD, NIPD).

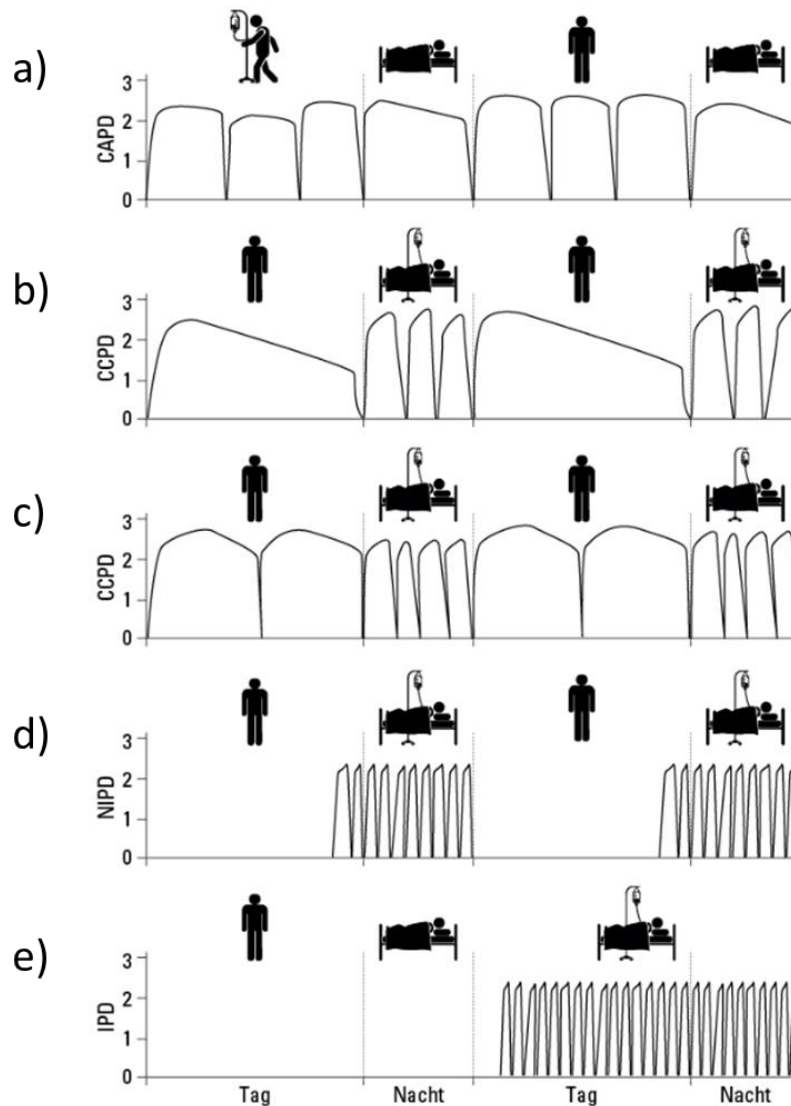


Abbildung 3: Schema verschiedener PD Verfahren.^[8]

Zusätzlich zu den hier aufgeführten Formen der PD, gibt es die Variante der Tidal-Peritoneal Dialyse. Nach dem Ebbe-Flut Prinzip (engl. *tide*) wird hier nur ein Teil des Dialysates entleert (50-80%). Nach einer gewissen Anzahl von Tidalzyklen erfolgt dann wieder eine vollständige Entleerung der Dialyselösung aus dem Bauchraum.

Durch die Tidal-PD verlängert sich die effektive Dialysezeit, da die Auslaufzeiten verringert werden. Im Allgemeinen sind die Zykluszeiten kürzer als bei konventioneller APD, sodass eine größere Dialysatmenge eingesetzt werden muss.^{[8],[14],[15]}

Zwischen APD und CAPD gibt es einige wichtige Unterschiede in Bezug auf die Entfernung von überschüssigem Körperwasser sowie Giftstoffen, da die Verweilzeiten bei den APD Verfahren in der Regel kürzer sind. Bei einer PD-Behandlung mit Glucose als osmotischem Agens ist die Ultrafiltrationsrate zu Beginn der Behandlung aufgrund des hohen osmotischen Gradienten am höchsten. Wird ein APD-Verfahren gewählt, kann durch die kürzeren Verweilzeiten die Ultrafiltrationsleistung bei gleichzeitig verminderter Glucoseresorption gesteigert werden. Die Entfernung der Giftstoffe ist zum einen abhängig vom Dialysatfluss, von der Molekülgröße sowie vom Peritoneum des Patienten. Allgemein gilt jedoch, dass die Entfernung von niedermolekularen Urämietoxinen wie Harnstoff durch eine höhere Ultrafiltrationsrate bei der APD gesteigert werden kann. Mittelgroße Moleküle wie z.B. Inulin, Vitamin B₁₂ oder β_2 -Mikroglobulin benötigen für den Konzentrationsausgleich längere Verweilzeiten der Dialyselösungen, weshalb hier die CAPD bzw. die CCPD zu bevorzugen ist.

Prof. M. Fischbach von der Universitätsklinik in Straßburg entwickelte das Konzept der sogenannten adaptierten APD. Zur Verbesserung der Ultrafiltration werden zu Beginn der Behandlung kurze Zyklen mit geringem Füllvolumen durchgeführt und anschließend längere Zyklen mit einem höheren Füllvolumen zur Verbesserung der *Clearance* Leistung (Entfernung der Giftstoffe). Die Effektivität dieses Verfahrens wurde in einer Cross-Over Studie überprüft.^[16]

Ein großer Vorteil der APD gegenüber der CAPD liegt darin, dass *Cycler* häufig mit einer Software zur Interpretation des Peritonealdialyseverlaufs ausgestattet sind. Mit Hilfe der Software kann der Behandlungsverlauf auf einer Patientenkarte gespeichert werden und umgekehrt ein Behandlungsschema auf der Karte gespeichert werden, welche dann vom *Cycler* umgesetzt wird. Somit ist eine gezielte personalisierte Behandlung möglich.^[8] Anhand von einem Vergleich mehrerer klinischer Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Anzahl der Krankenhausaufenthalte und Peritonitisinfektionen bei APD Patienten geringer ist, als bei CAPD Patienten.

Dies liegt vermutlich an der automatisierten Behandlungsmethode bei APD und somit einer geringeren Anzahl manueller Schritte wie z.B. Konnektionen, welche ein potentielles Infektionsrisiko darstellen.^[17]

2.1.1 Aufbau des Peritoneums

Voraussetzung für die Behandlung einer chronischen Nierenerkrankung mit PD ist ein intaktes Bauchfell. Dieses fungiert während der Behandlung als semipermeable Membran und besteht aus verschiedenen Anteilen. Zum einen unterscheidet man beim Peritoneum zwischen dem viszeralen Anteil, welcher mit ca. 60% die inneren Organe wie z.B. die Leber überzieht, 10% parietales Bauchfell, welches die innere Bauchwand und Zwerchfell bedeckt und 30% Mesenterium (Übergangsbereich) und Omentum.

Die anatomische Oberfläche beträgt im Durchschnitt zwischen 1,5 und 2 m², variiert jedoch stark je nach Geschlecht, Alter und Körpermaße. Am Flüssigkeits- und Stoffaustausch ist hiervon nur ein Anteil des Peritoneums beteiligt (ca. 0,5 bis 1 m² effektive Oberfläche), da hierbei Faktoren wie das Dialysatvolumen sowie Verteilung und Durchblutung (ca. 100 bis 150 ml/min) in der Peritonealmembran eine wichtige Rolle spielen.^{[8],[13]} Den höchsten Anteil an der Peritonealdialyse hat jedoch das viszerale Peritoneum, mit einer durchschnittlicher Dicke von 20 µm bei PD Patienten.^[18]

Die Peritonealmembran, der Ort des Stoff- und Flüssigkeitsaustausches, besteht nochmals aus verschiedenen Schichten bzw. Bestandteilen. In Abbildung 4 ist der Aufbau der Peritonealmembran schematisch dargestellt. In der Peritonealmembran befinden sich eingelagert im Interstitium, einer bindegewebsartigen Struktur, die Blutgefäße. Der Stofftransport während der PD findet von den Blutgefäßen über deren Endothelzellschicht sowie Basalmembran durch das Interstitium über die äußere einzellige Mesothelzellschicht in Richtung der Peritonealhöhle statt.

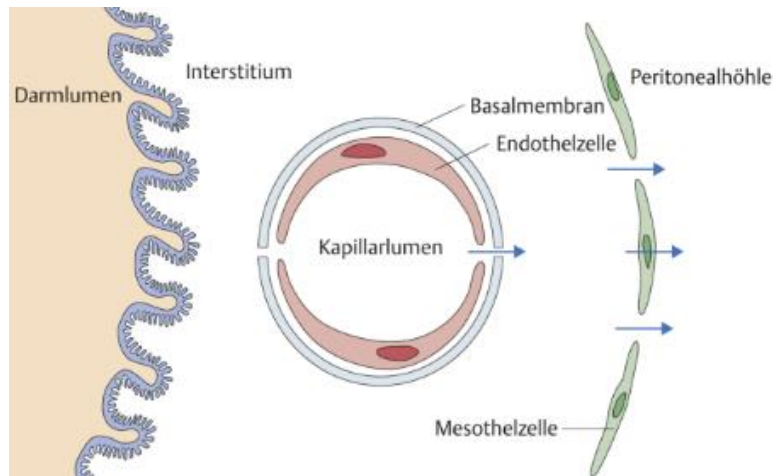


Abbildung 4: Schematische Aufbau der Peritonealmembran.^[15]

Das Interstitium enthält neben den Blutgefäßen auch Lymphgefäße, über welche eine lymphatische Absorption von Dialyselösung aus dem Bauchraum während der Behandlung stattfindet. Das Interstitium kann als 2-Phasen System mit einer kolloidreichen, wasserarmen und kolloidarmen, wasserreichen Phase beschrieben werden. In der kolloidreichen Phase, welche aus Mucopolysacchariden besteht, befinden sich zahlreiche Wasserkanäle. Der Transport von Proteinen findet hauptsächlich über die wasserreiche Phase statt. Die eigentliche Barriere stellt die Endothelzellschicht dar, jedoch wird dem Interstitium ebenso wie der Mesothelzellschicht eine geringere Bedeutung als Barriere zugeschrieben.^[13]

Ein wesentlicher Bestandteil in der Peritonealmembran für die PD sind die Blutgefäße. Aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Dialyselösung findet ein Transport von Wasser sowie Substanzen statt. Hierbei gilt die hauptsächlich kontinuierliche Endothelzellschicht der Blutgefäße als Hauptbarriere. Es befinden sich zwischen den Endothelzellen Spalten mit einem Durchmesser von 8 bis 10 nm, sowie eine geringe Anzahl von Spalten mit einem Durchmesser von ca. 50 nm. Im kontinuierlichen Endothel der Kapillaren befinden sich außerdem ultrakleine wasserselektive Kanäle (transzelluläre Poren) mit einem Durchmesser von 0,5 nm. Die bekannteste Klassifizierung dieser 3 Arten von Poren wird durch das „3-Poren-Modell“ der Peritonealmembran nach Bengt Rippe beschrieben und ist in Tabelle 2 aufgelistet.^{[8],[18]}

Tabelle 2: Die Poren der Blutgefäße im Peritoneum, "3-Poren-Modell" nach B. Rippe

Porenname	Durchmesser [nm]	Funktion
Ultrakleine Poren	0,5	Membranproteinstruktur (Aquaporin), welche eine erleichterte Diffusion von ausschließlich Wassermolekülen ermöglicht
Kleine Pore	8-10	Hauptanteil der interendothelialen Spalten (ca. 99,5%), durchlässig für Wasser, niedermolekulare Substanzen sowie Mittelmoleküle, Reflektion von Makromolekülen
Große Poren	ca. 50	Geringer Anteil (<0,5%) der Porenfläche, zusätzlich durchlässig für Makromoleküle

Aquaporine spielen bei der PD beim Einsatz von niedermolekularen osmotischen Agenzien eine bedeutende Rolle, da der Wassertransport über die Wasserkanäle abhängig von der Teilchenanzahl ist. Es wurden bisher 11 Aquaporine (AQP0-AQP11) beim Menschen identifiziert, wobei AQP1 in der Peritonealmembran, speziell in den Endothelzellen der Blutkapillare zu finden sind. AQP1 ist ein 28 kDa großes Tetramer, wobei jedes Monomer aus 6 transmembranen α -Helices aufgebaut ist und dadurch der Wasserkanal als Untereinheit, gebildet wird (siehe Abbildung 5).^{[18],[19],[20]}

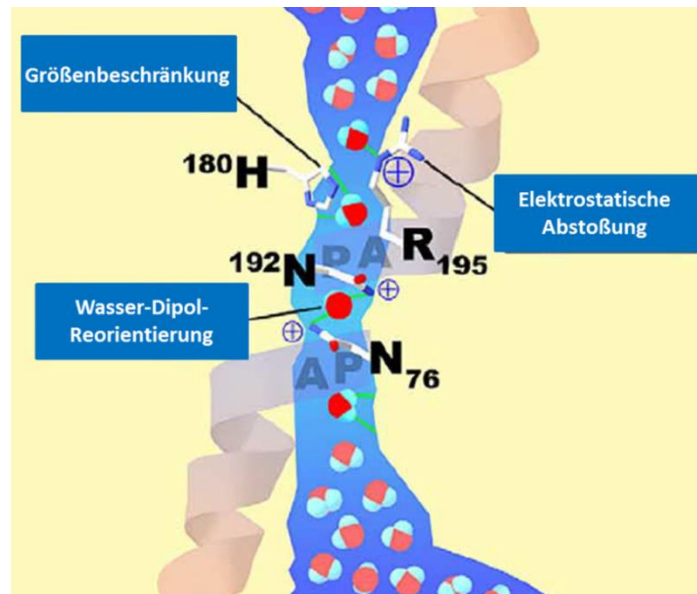


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer AQP1 Untereinheit.^[20]

Die Funktionsweise der Aquaporine ist die Folgende. Die spezielle Sequenz und räumliche Anordnung der Aminosäuren erlaubt ausschließlich Wassermolekülen die Passage des Kanals. Durch die elektrostatische Abstoßung und Größenbeschränkung werden größere Moleküle sowie Protonen abgestoßen. Durch die Aufeinanderfolge von zwei Asparagin Aminosäuren in jeweils zwei Motiven Asparagin-Prolin-Alanin (A-P-N) wird eine Dipolreorientierung der Wassermoleküle bewirkt, wodurch diese durch die Membran transportiert werden.^[20]

2.1.2 Transportvorgänge bei der Peritonealdialyse

Während der Dialysebehandlung findet ein Flüssigkeits- und Stofftransport aufgrund des Konzentrationsgefälles an der peritonealen Membran statt. Dabei muss zwischen folgenden Transportvorgängen unterschieden werden:

- Diffusion (vor allem für niedermolekulare Substanzen)
- Ultrafiltration (aufgrund von osmotischer oder hydrostatischer Druckdifferenz)
- Konvektion (abhängig von der Porengröße)

Diffusion beschreibt den Prozess der Bewegung von Molekülen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung. Liegt ein Konzentrationsgefälle vor, so findet durch die Diffusion ein Ausgleich statt, da Moleküle sich von einem Ort höherer Konzentration zu einem Ort niedriger Konzentration verteilen. Das erste Fick'sche Diffusionsgesetz beschreibt die Abhängigkeit der Diffusionsrate (mol/s) von den verschiedenen Faktoren (siehe Gleichung 1). Der Teilchenfluss J_x ist demnach proportional zur Fläche A , und abhängig von dem Konzentrationsgradient $\partial c / \partial x$.^{[21],[22]}

$$J_x = -D \cdot A \cdot \left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)$$

Gleichung 1

J_x	Teilchenfluss [mol·s ⁻¹]
D	Diffusionskoeffizient [m ² ·s ⁻¹]
A	Fläche [m ²]
∂c	Konzentrationsdifferenz [mol·m ⁻³]
∂x	Diffusionsstrecke [m]

Durch die Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich der Diffusionskoeffizient berechnen (siehe Gleichung 2). Demnach steigt der Diffusionskoeffizient mit steigender Temperatur T und verringert sich mit steigendem Molekülradius r sowie zunehmender Viskosität des Lösungsmittels η .^{[21],[22]}

$$D = \frac{R \cdot T}{N_A \cdot (6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta)}$$

Gleichung 2

R	allgemeine Gaskonstante ($8,3144 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
T	absolute Temperatur [K]
N_A	Avogadrokonstante ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
π	Pi (3,14159)
η	Viskosität des Lösungsmittels [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]
r	hydrodynamischer Radius der diffundierenden Teilchen [m]

Bei der Peritonealdialyse wird der Vorgang der Diffusion genutzt, um Urämietoxine aus dem Blut des Patienten zu entfernen. Allerdings findet eine selektive Diffusion statt, da aufgrund der semipermeablen Membran nicht alle Substanzen frei diffundieren können. Es herrscht eine höhere Konzentration von Urämietoxinen im Blut vor der Behandlung, welche über das Peritoneum in das Dialysat diffundieren. Gleichzeitig diffundiert aber auch bei Verwendung von Glucose als osmotisches Agens diese aus dem Dialysat in Richtung der Blutkapillare.^{[8],[14]}

Um während der Dialysebehandlung überschüssiges Körperwasser aus dem Patienten zu entfernen, nutzt man das Prinzip der Ultrafiltration. Ultrafiltration, der Prozess des Flüssigkeitstransportes über eine Membran tritt im Allgemeinen auf, wenn ein osmotischer oder hydrostatischer Druckgradient herrscht. Der effektive osmotische Druckgradient ($\Delta\pi$) an einer Membran wird anhand von Gleichung 3 (Beziehung nach van't Hoff` und Stavermann) deutlich. Die osmotische Druckdifferenz zwischen zwei Kompartimenten, welche durch eine semipermeable Membran getrennt sind, ist abhängig von der Temperatur T und der Konzentrationsdifferenz Δc sowie vom Reflektionskoeffizienten σ jedes einzelnen Teilchens i. Der Reflektionskoeffizient ist eine Kenngröße eines Stoffes, von einer Membran reflektiert zu werden. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei ein Wert von 1 bedeuten würde, dass die Substanz komplett von der Membran zurückgehalten bzw. reflektiert wird.^{[21],[23]}

$$\Delta\pi = R \cdot T \cdot \sum (\sigma_i \cdot \Delta c_i)$$

Gleichung 3

$\Delta\pi$	osmotische Druckdifferenz [Pa]
σ	Reflektionskoeffizient [-]
Δc	Konzentrationsdifferenz osmotisch wirksamer Teilchen [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$]

Wird die Ultrafiltration, der Transport von Wasser und niedermolekularer Substanzen, durch eine hydrostatische Druckdifferenz (ΔP) erzeugt, so wird dieser Prozess als Filtration bezeichnet. Die Richtung des Stofftransportes an den Kapillaren ist abhängig von der herrschenden Druckdifferenz. Der mittlere hydrostatische Druck in den Kapillaren im menschlichen Körper beträgt 25 mmHg (3,3 kPa). Außerhalb der Kapillare im Interstitium ist der hydrostatische Druck normalerweise vernachlässigbar gering. Dem hydrostatischen Druckgradienten entgegen gerichtet, ist der osmotische Druckgradient, vor allem erzeugt durch Plasmaproteine wie Albumin, weshalb dieser Druck auch als kolloidosmotischer Druck bezeichnet wird.^[24]

Nach dem Starling-Gesetz hängt der effektive Filtrationsdruck P_{eff} [Pa] von den hydrostatischen und osmotischen Drücken innerhalb (i) und außerhalb (o) der Gefäße ab (siehe Gleichung 4).^[24]

$$P_{\text{eff}} = \Delta P \cdot \sigma \cdot \Delta \pi = (P_i - P_o) - \sigma \cdot (\pi_i - \pi_o)$$

Gleichung 4

P_{eff}	effektive Filtrationsdruck [Pa]
ΔP	hydrostatische Druckdifferenz [Pa]
P_i	hydrostatische Druck innerhalb der Kapillare [Pa]
P_o	hydrostatische Druck außerhalb der Kapillare [Pa]
π_i	osmotischer Druck innerhalb der Kapillare [Pa]
π_o	osmotischer Druck außerhalb der Kapillare [Pa]

Der Volumenfluss über die Membran ist außerdem abhängig von der Filtrationsfläche (A) sowie der hydraulischen Leitfähigkeit der Membran (L_p). In der Literatur werden diese beiden Faktoren häufig zu einem Filtrationskoeffizienten (K_f) zusammengefasst. Die hydraulische Leitfähigkeit (L_p) gehört zur Gruppe der Membrankoeffizienten und gibt somit einen charakteristischen Kennwert von Membranen an. Die hydraulische Leitfähigkeit berechnet sich aus dem Fluss über eine definierte Membranfläche bei definierter Druckdifferenz [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$]. Somit kann der Volumenfluss (J_v) über eine Membran in Abhängigkeit von Filtrationsfläche, hydrostatischer und osmotischer Druckdifferenz dargestellt werden (siehe Gleichung 5).^{[21],[23]}

$$J_v = L_p \cdot A \cdot (\Delta p - \sigma \cdot \Delta \Pi)$$

Gleichung 5

J_v	Volumenfluss [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$]
A	Filtrationsfläche [m^2]
L_p	hydraulische Leitfähigkeit [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$]

Bei der Peritonealdialyse wird ein osmotischer Druckgradient durch ein osmotisches Agens in der Dialyselösung erzeugt, z.B. durch Glucose, wodurch ein Volumenfluss über die Membran erzeugt wird.^[8]

Unter Konvektion versteht man den Vorgang, bei welchem gelöste Substanzen mit dem Volumenstrom über eine Membran mittransportiert werden. Dabei ist die Konvektion abhängig von dem Volumenstrom, der Konzentration der gelösten Substanz sowie dem sogenannten Siebkoeffizienten (S). Dieser Prozess wird in der Literatur als „*solvent drag*“ bezeichnet. Der Siebkoeffizient ist ein Maß für die Fähigkeit des Stoffes, die Membran zu passieren und lässt sich mathematisch beschreiben als Quotient aus der Konzentration eines Stoffes im Ultrafiltrat zur Konzentration im Plasma und kann somit Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

Hierbei würde ein Wert von 1 bedeuten, dass die Substanz die Membran ungehindert passiert. Der konvektive Stofftransport (Stoffmenge/Zeit) einer Substanz i mit dem Lösungsmittel s kann nach Gleichung 6 dargestellt werden.^[23]

$$J_i^s = S_i \cdot J_v \cdot c_i$$

Gleichung 6

J_i^s	Stofftransport einer Substanz i mit dem Lösungsmittel s [$\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$]
S_i	Siebkoeffizient für Substanz i [-]
J_v	Volumenfluss pro Zeit [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$]
c	Stoffkonzentration [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$]

Dieser Effekt wird bei der Peritonealdialyse vor allem für die Entfernung von niedermolekularen Urämietoxinen wie z.B. Harnstoff oder Kreatinin genutzt. Wird Glucose als osmotisches Agens verwendet, besteht zu Beginn der Behandlung eine hohe Ultrafiltrationsrate, wodurch die nieder- und mittelmolekularen Verbindungen mit dem Volumenstrom mittransportiert werden (Konvektion). Die Entfernung von toxischen Stoffwechselprodukten durch den konvektiven Transport aber auch durch Diffusion wird als *Clearance* bezeichnet.^{[8],[21]}

2.2 Zusammensetzung einer PD Lösung

Während der PD-Behandlung soll der Patient von überschüssigem Wasser und Giftstoffen befreit werden. Zu den weiteren Aufgaben der Behandlung zählen je nach Krankheitsbild auch ein Ausgleich des Säure-Base-Haushaltes sowie der Elektrolytkonzentration im Patienten.

Aus diesem Grund muss die benötigte Dialyselösung eine spezielle Zusammensetzung besitzen. Zu den Bestandteilen einer Dialyselösung zählen folgende Komponenten:

- Elektrolyte (Natrium, Calcium, Magnesium, Chlorid)
- Puffer (Laktat, Hydrogencarbonat)
- Osmotisch wirksame Substanz (Glucose, Polyglucose, Aminosäuren)

In Tabelle 3 ist eine Übersicht der PD-Lösungen von FMC dargestellt und als Vergleich der Konzentrationsbereich der entsprechenden Bestandteile im Blutplasma. Die Zusammensetzung der Dialyselösungen ist im Allgemeinen angepasst an die Zusammensetzung des Blutplasmas, sodass die Elektrolyte nicht dem Körper entzogen werden. Wie man anhand von Tabelle 3 sehen kann, variieren die Dialyselösungen hauptsächlich in ihrer Glucosekonzentration. Glucose wird in den Dialyselösungen von Fresenius Medical Care (FMC) als osmotisches Agens eingesetzt, um durch die osmotische Druckdifferenz zwischen Blutplasma und Dialyselösung eine Ultrafiltration mit der damit verbundenen Entfernung von Giftstoffen zu erzielen.^{[15],[25]}

Die 3 Produktgruppen (siehe Tabelle 3) unterscheiden sich hinsichtlich des verwendeten Puffers. Bei den beiden 2-Kammer Produkten *bicaVera*® und *Balance* hat die gebrauchsfertige Mischlösung einen neutralen pH Wert, während beim 1-Kammer CAPD Standardprodukt ein leicht saurer pH Wert eingestellt ist

Tabelle 3: Zusammensetzung der PD-Lösungen bei Fresenius Medical Care sowie Referenzbereich im Blutplasma.^{[25], [26], [27]}

Arzneilich wirksame Bestandteile [mmol/l]	bicaVera®	Balance	CAPD-Lösung (1-Kammer)	Blutplasma Referenzbereich
Natrium (Na ⁺)	134	134	134	135-150
Calcium (Ca ²⁺)	1,75	1,25/1,75	1,25	1,1-1,3 (ionisiert)
Magnesium (Mg ²⁺)	0,5	0,5	0,5	0,7-1,6 (ionisiert)
Chlorid (Cl ⁻)	104,5	100,5/101,5	102,5	98-112
Kalium (K)	-	-	-	3,5-4,5
Hydrogencarbonat (HCO ₃ ⁻)	34	-	-	22-26
Laktat	-	35	35	-
Glucose	83,25/126,1/235,9	83,2/126,1/235,8	83,2/126,1/235,8	3,05-6,1

In den derzeitigen Dialyselösungen von Fresenius Medical Care liegt hinsichtlich der Elektrolytkonzentration lediglich eine geringe Variation in der Calciumkonzentration vor. Eine Dialyselösung mit einer niedrigeren Calciumkonzentration als im Blutplasma wird vor allem dann verwendet, wenn der Patient Phosphatbinder auf Calciumbasis erhält. Es gilt während der Behandlung die Calciumkonzentration im Patient konstant zu halten, da während der PD Calcium aus dem Patienten entfernt wird.^{[8],[15]}

Hinsichtlich der Natriumkonzentration gibt es neue Ansätze, die Konzentration in der PD-Lösung zu verringern, um somit einen positiven Effekt hinsichtlich des Blutdruckes und der Überwässerung zu erzielen (sogenannte „Low-Natrium-Lösungen“).^[15] In aktuellen Studien bei Verwendung einer PD-Lösung mit 125 mmol/l Natrium im Vergleich zur Standardlösung mit 134 mmol/l konnten diese Vermutungen bestätigt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass dies auf die *Clearance* von Harnstoff keine negativen Auswirkungen hat.^[28]

Als Standardpuffersystem im Einkammerbeutel mit PD-Lösung wird Laktat eingesetzt, wobei der pH-Wert im Bereich von 5,5 liegt, um somit eine Entstehung von Glucoseabbauprodukten (GDP, *glucose degradation product*) während der Sterilisation zu verringern, da diese schädigend auf die Peritonealmembran wirken.

In Studien wurde gezeigt, dass die Bildung der GDPs zunimmt, je höher der pH Wert der zu sterilisierenden Lösung ist.^[29] Zur Gruppe der GDPs zählen unter anderem 3-Deoxyglucoson (3-DG), 3,4-Dideoxyglglucoson-3-ene (3,4-DGE), 5-Hydroxymethylfuraldehyd (5-HMF), Formaldehyd (FoA), Acetaldehyd (AcA), Methylglyoxal, Glyoxal und Fructose. 3,4-DGE und 3-DG sind hauptsächlich für die Bildung von sogenannten „*advanced glycation end products*“ (AGEs) verantwortlich, welche sich in den Gefäßen des Peritoneums ablagern und eine mögliche Ursache für die Zunahme der peritonealen Permeabilität und somit für ein langfristiges Ultrafiltrationsversagen darstellen.^{[8],[29],[30]}

Die pH Absenkung stellt im 1-Kammerbeutel ein Kompromiss dar, da auch der niedrige pH Wert sowie die hohe Laktatkonzentration langfristig sich negativ auf die Peritonealmembran auswirkt, weshalb es Lösungen in einem Zweikammerbeutelsystem gibt. Hierbei unterscheidet man nochmal zwischen den laktatgepufferten und hydrogencarbonatgepufferten Systemen. Bei diesen PD-Lösungen wird Hydrogencarbonat, als physiologischer Puffer eingesetzt, die Glucose befindet sich in einer separaten Kammer, mit einem pH-Wert von ca. 3,0, sodass die GDP-Bildung während dem Sterilisieren minimiert wird. Hydrogencarbonat sowie die Salze Magnesium und Calcium müssen ebenfalls getrennt vorliegen, sodass es zu keiner Fällungsreaktion kommt. Mit steigendem pH Wert der Lösung liegen Hydrogencarbonationen (HCO_3^-) als Carbonationen (CO_3^{2-}) in der Lösung vor. Diese reagieren mit in der Lösung vorliegenden Calciumionen (Ca^{2+}) zu Calciumcarbonat (CaCO_3), welches bei einem höheren pH Wert als 7 ausfällt.^[31] Somit werden erst vor Verwendung die beiden Teillösungen vermischt, sodass der pH-Wert im neutralen Bereich liegt und die Ausfällungsproblematik verhindert wird. Die Lösung wird somit als biokompatibler eingestuft, als die von Einkammersystemen, was in der sogenannten „Euro-Balance Studie“ gezeigt wurde.^{[8],[15], [32]}

2.2.1 Osmotische Agenzien in der PD

Um einen osmotischen Druckgradienten zwischen Blutplasma und Dialyselösung zu erhalten, ist es notwendig, dass in der Dialyselösung ein osmotisches Agens enthalten ist. Dieses bewirkt einen Entzug von überschüssigem Wasser sowie Giftstoffe aus dem Körper des Patienten.

In den Dialyselösungen von FMC sowie von anderen Herstellern (z.B. Baxter) ist Glucose als osmotisches Agens enthalten, des Weiteren sind PD-Lösungen mit einem Glucosepolymer (Icodextrin, Extraneal®, Baxter) sowie Aminosäuren (Nutrineal®, Baxter) auf dem Markt.^[33]

Glucose besitzt eine molare Masse von 180,16 g/mol und gehört zur Gruppe der Monosaccharide. Sie liegt in wässriger Lösung zu nahezu 100% als Ringform vor. Der Anteil der α -D-Glucose liegt hierbei bei ca. 36%, der offenen Aldehydform bei ca. 0,02% und der β -D-Glucose bei ca. 64% (siehe Abbildung 6).^[34]

Mit der Verwendung von Glucose als osmotisches Agens ergeben sich verschiedene Vor- und Nachteile für die PD. Glucose ist ein körperebkannter Baustein und kann vom Organismus nach Aufnahme vollständig zu H_2O und CO_2 metabolisiert werden. Glucose kann durch saure Hydrolyse oder enzymatisch aus Stärke hergestellt werden und ist ein kostengünstiger Rohstoff.^[35]

Aufgrund der geringen Molekülgröße findet während der PD allerdings eine schnelle Resorption über die Blutgefäße statt, sodass der osmotische Gradient über die Zeit der Behandlung abnimmt. Somit sinkt die Ultrafiltrationsrate über die Behandlungsdauer je nach Patient schnell ab. Besonders für Diabetiker stellt die zusätzliche kalorische Belastung ein Problem dar. Des Weiteren wirken sich eine dauerhaft hohe Glucosebelastung, die GDPs und dadurch entstehenden AGEs negativ auf das Peritoneum aus, wodurch es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen kommt. Dabei findet eine Abtragung der Mesothelzellschicht statt, welche für Abwehrmechanismen verantwortlich ist und als zusätzliche Barriere agiert.

Weitere Folgen sind die Ausbildung von fibrotischem Gewebe, wodurch sich ebenfalls die Barriereigenschaften über die Zeit verändern sowie eine Gefäßneubildung. Durch die Vaskularisation erhöht sich der Anteil an Gesamtporenoberfläche, wodurch die Glucose schneller aufgenommen wird und somit der osmotische Druck noch schneller abnimmt.^{[13],[36],[37]}

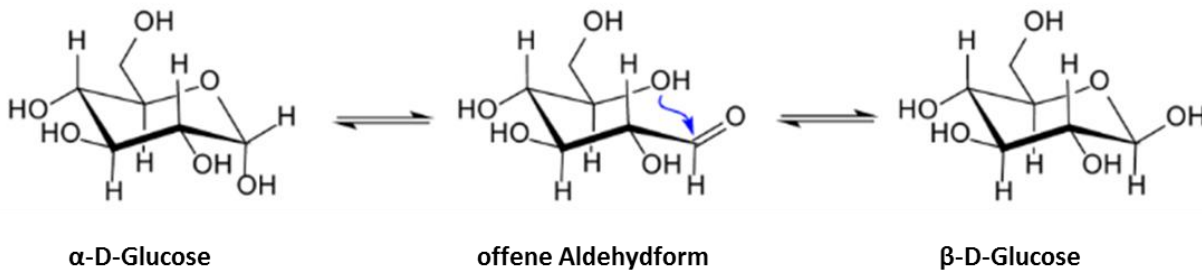


Abbildung 6: Strukturformel Glucose (Sesselkonformation).^[38]

Glucose erzeugt während der PD einen osmotischen Gradienten, als treibende Kraft für die Ultrafiltration. Glucose bewirkt eine schnelle aber durch die hohe Resorption eine kurz andauernde Ultrafiltration. Der Wasserentzug über die Poren findet bei Glucose ca. zur Hälfte über die kleinen Poren und zur Hälfte über die Aquaporine der Blutgefäße statt.^[36] Durch schnelle Resorption ist Glucose eher für kurze Verweilzeiten geeignet, es findet zu Beginn durch den schnellen Wasserentzug eine konvektive Entfernung der Giftstoffe statt.^[8]

Als alternatives osmotisches Agens wird ein Glucosepolymer (Icodextrin) von der Firma Baxter eingesetzt. Icodextrin ist ein Polymer und besteht aus einer Mischung aus Polysacchariden mit einer Kettenlänge von 4-250 Glucoseeinheiten, welche α -1,4 und α -1,6 glycosidisch miteinander verknüpft sind. Die zahlenmittlere molare Masse des Glucosepolymers liegt bei ca. 5000 bis 6500 g/mol, die gewichtsmittlere molare Masse bei ca. 13000 bis 19000 g/mol. Icodextrin wird technisch durch Fraktionierung von hydrolysierten Maisstärke hergestellt.^[39] In Abbildung 7 ist die Strukturformel von Icodextrin dargestellt.

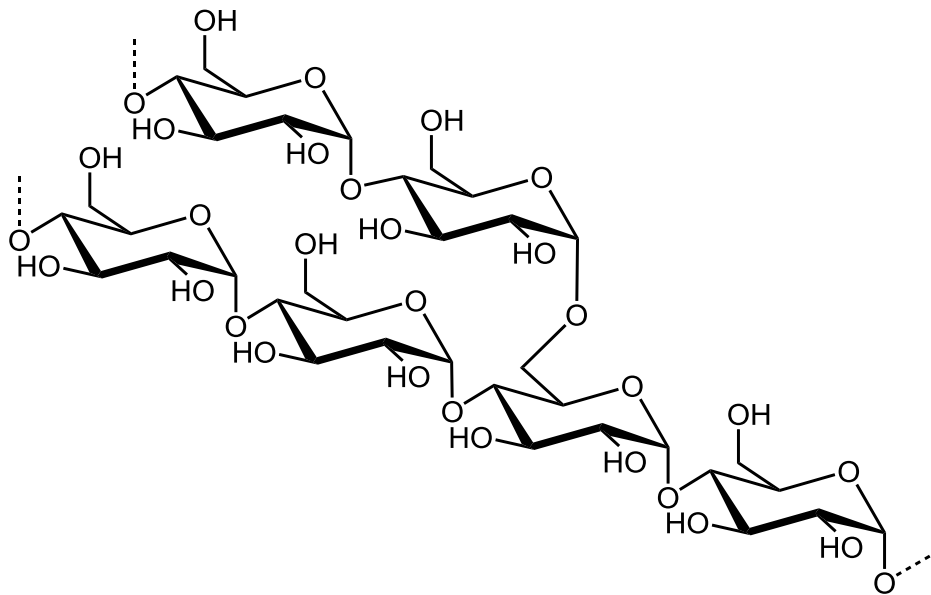


Abbildung 7: Strukturformel von Polyglucose (Icodextrin).

Icodextrin wird aufgrund der geringeren Resorption für den langfristigen Wasserentzug während eines längeren Zyklus eingesetzt, sowie bei Patienten, welche als sogenannte „*fast transporter*“ eingruppiert werden. Bei „*fast transporter*“ Patienten findet eine besonders schnelle Resorption der Glucose statt, wodurch der osmotische Gradient und damit die UF-Rate sehr schnell abnehmen. Polyglucose wird vom Körper über das lymphatische System aufgenommen und zu dem Disaccharid Maltose abgebaut. Durch die Aufnahme von Icodextrin kann es zu einer Akkumulation im Gewebe kommen, wodurch allergische Reaktionen auftreten können. Aus diesem Grund wird eine Dialysebehandlung mit Icodextrin nur einmal pro Tag beim Patienten durchgeführt. Eine weitere Problematik in der Vergangenheit war das Auftreten steriler Peritonidien, verursacht durch Peptidoglycanverunreinigungen in der Ausgangssubstanz Polyglucose. Peptidoglycane sind Bestandteile der grampositiven Zellwand und können aufgrund des Herstellungsprozesses, durch den enzymatischen Abbau der Stärke, im Rohmaterial Icodextrin vorhanden sein.^{[8],[13]}

Als dritte Variante besteht die Möglichkeit, aminosäurehaltige PD-Lösungen einzusetzen. Durch den Einsatz solcher Lösungen kann die Glucosebelastung verringert werden und gleichzeitig der häufig auftretenden Mangelernährung und dem Proteinabbau von Patienten entgegen gewirkt werden. Dem Patienten darf jedoch nur ein Beutel pro Tag zur Dialysebehandlung verabreicht werden, da sonst die Stickstoffbelastung überschritten wird.

In der Vergangenheit wurden verschiedenste Substanzen wie z.B. Gelatine, Xylitol, Sorbitol, Mannitol, Fructose, Dextrane und Glycerol als osmotische Agenzien in klinischen Studien und Experimenten untersucht, wobei sich keine dieser Substanzen etabliert hat.^[8]

2.2.2 Ultrafiltrationsverlauf osmotischer Agenzien

In Abbildung 8 ist der Ultrafiltrationsverlauf von einer 7,5%igen Icodextrinlösung, als Vertreter für höhermolekulare Substanzen, sowie der Ultrafiltrationsverlauf von einer 3,86%igen Glucoselösung, als Vertreter für niedermolekulare Substanzen dargestellt.

Die Ultrafiltrationsverläufe basieren auf einer Computersimulation, dessen Grundlage das 3-Poren Modell von B. Rippe ist. Es ist jeweils die Nettoultrafiltration [ml] gegen die Zeit [min] dargestellt. Anhand von Abbildung 8 kann man die typischen Eigenschaften der beiden osmotischen Agenzien erkennen.^[40]

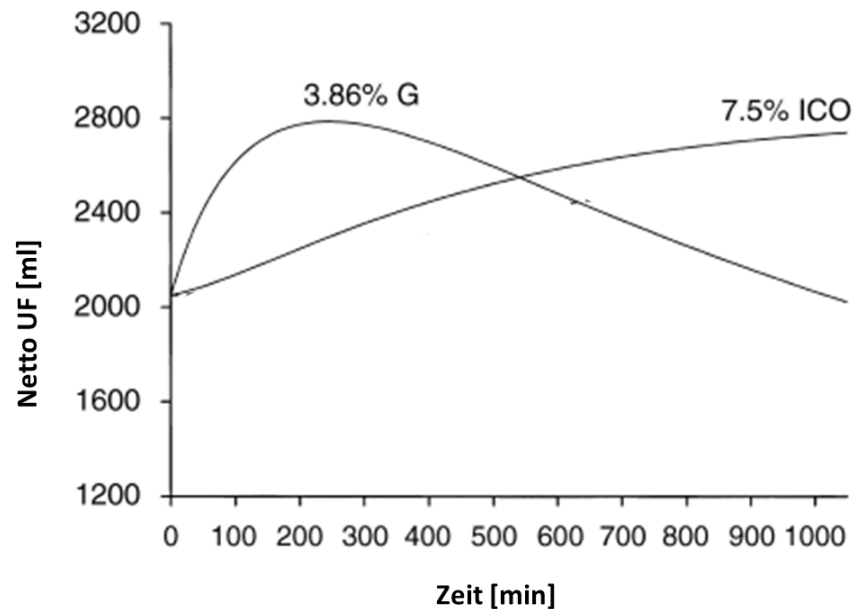


Abbildung 8: Ultrafiltrationsverläufe für 7,5% Icodextrin sowie 3,86% Glucose als osmotisches Agens nach.^[40]

Glucose als osmotisches Agens (OA) erzeugt eine schnelle aber nur kurzzeitig wirkende Ultrafiltration, da Glucose vom Körper aufgenommen wird und somit der osmotische Druck schnell abnimmt. Glucose ist somit für eher kürzere Verweilzeiten (*short dwell*) geeignet, ca. ein bis sechs Stunden. Findet kein Wechsel der Dialyselösung statt, wird wieder Wasser vom Körper aufgenommen. Glucosehaltige Lösungen erzeugen eine gute *Clearance* von Urämietoxinen, da diese durch die schnelle Ultrafiltration, den guten *short dwell* Effekt, mitentfernt werden. Durch Glucose als osmotisches Agens wird außerdem der sogenannte „*sodium sieving*“ Effekt (siehe Abbildung 9) erzeugt. In der Abbildung ist die Natriumkonzentration im Dialysat gegen die Zeit bei Glucose und Icodextrin dargestellt. Man kann erkennen, dass bei Verwendung von Glucose, die Natriumkonzentration im Dialysat von ca. 135 mmol/l auf ca. 125 mmol/l abfällt. Dieser Effekt lässt sich dadurch begründen, dass unter Verwendung von Glucose ca. die Hälfte der Ultrafiltration über die Aquaporine stattfindet und dadurch eine Verdünnung der Dialyselösung erfolgt. Im Gegensatz dazu kann dieser Effekt bei Verwendung von Icodextrin-haltigen Lösungen nicht beobachtet werden.^[40]

icodextrinhaltige Lösungen zeigen ein langsam ansteigendes aber langanhaltendes Ultrafiltrationsprofil und sind somit für längere Verweilzeiten von länger als 8 Stunden besonders geeignet (*long dwell*). Aufgrund der Molekülgröße wird Icodextrin nur geringfügig über die Lymphe oder großen Poren der Blutgefäße resorbiert, wodurch die osmotische Druckdifferenz länger erhalten bleibt. Icodextrinlösungen erzeugen jedoch keine schnelle Ultrafiltration, wodurch die Urämietoxine nicht über den konvektiven Stofftransport entfernt werden. Icodextrinhaltige Lösungen erzeugen über längere Verweilzeiten eine Entfernung von Körperwasser und zeigen somit einen guten *long dwell* Effekt.^{[13],[40]}

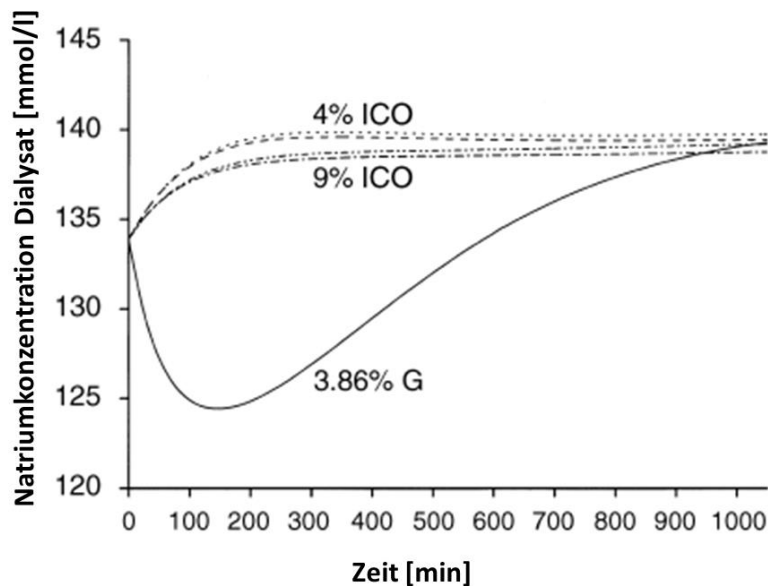


Abbildung 9: Sodium sieving Profil bei Icodextrin und Glucose als osmotische Agenzien.^[40]

2.2.3 Agonisten und Antagonisten von Aquaporinen

In der Pharmazie werden Substanzen als Agonisten bzw. Antagonisten bezeichnet, wenn diese spezifisch an Rezeptoren binden und dadurch deren Aktivität steigern oder senken. Derzeit sind in der Literatur verschiedene Agonisten und Antagonisten für Aquaporine beschrieben. Sie bewirken, unter der Voraussetzung eines osmotischen Gradienten, eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Wassertransportrate.

Allgemein sind solche Substanzen für den pharmazeutischen Einsatz interessant, um bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. bei Ödembildung eingesetzt zu werden.^[41] Metallionen, wie z.B. Blei, Silber oder Gold, Tetraethylammoniumion (TEA^+) sowie Acetazolamid sind in der Literatur bereits als Antagonisten beschrieben, können aufgrund ihrer Toxizität und unspezifischen Wirkung, da sie auch andere Membrankanäle blockieren, nicht medizinisch eingesetzt werden.^[19]

Für Aquaporin-1 (AQP1), welches in den Blutkapillaren im Peritoneum vorhanden ist, sind bekannte Antagonisten Furosemid und Bumetanid sowie das Derivat AqB013 (siehe Abbildung 10), welches an AQP1 und AQP4 spezifisch bindet und dadurch die Porenstruktur verschließt.^{[42],[43]}

Mit Hilfe computerbasierter 3-D-Modellierung wurden drei potentielle Bindungsstellen an AQP4 identifiziert, zwei liegen hierbei intrazellulär und eine extrazellulär. Die in der Literatur beschriebenen Antagonisten interagieren mit der Aquaporinstruktur, indem Wasserstoffbrückenbindung, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden.^[42]

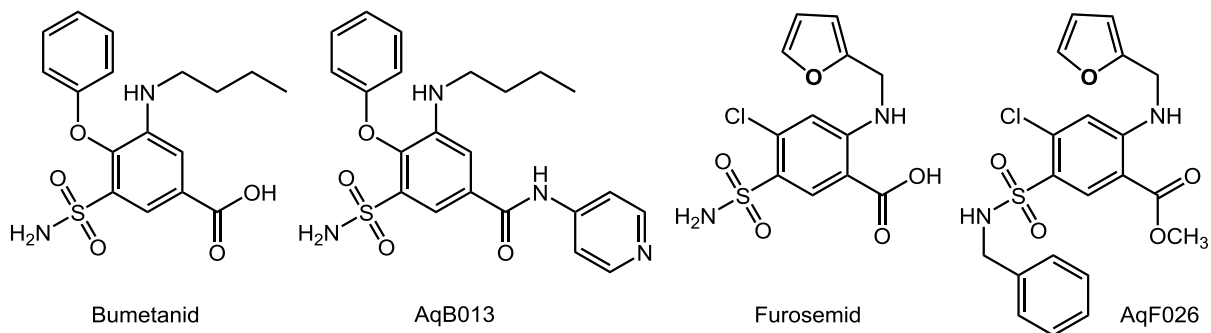


Abbildung 10: Agonisten und Antagonisten an Aquaporinen.^[44]

Als spezifischer Agonist an AQP1 erwies sich das Derivat des Schleifendiuretikums Furosemid AqF026 (siehe Abbildung 10).^[43] Mit Hilfe von Mausmodellen und *Xenopus-Laevis*-Oocyten-Expressionsmodellen wurde gezeigt, dass AqF026 spezifisch an AQP1 bindet und dadurch den Wasserkanal in einer offenen Struktur hält.

Die Bindungsposition liegt hierbei intrazellulär in der sogenannten D-Schleife des AQP1, wobei die Aminosäure Arginin 159 mit dem aromatischen Ring sowie der daran angehängten Sulfonamidgruppe wechselwirkt.^[43]

Während der Behandlung einer chronischen Nierenerkrankung mittels Dialyse ist eine der Hauptaufgaben die Entwässerung des Patienten. Aus diesem Grund sind Agonisten von AQP1 potentiell für den Einsatz in Dialyselösungen bzw. bei der Durchführung einer PD-Behandlung als Zusatz zum osmotischen Agens interessant.

2.3 Membrantransportmodelle

Um den Patienten möglichst lange und effizient mit einer Nierenersatztherapie zu behandeln, ist es wichtig, dass die Behandlung an den Patienten angepasst ist und die notwendige Ultrafiltrationleistung sowie Entfernung der Giftstoffe durch die PD erzielt werden. Besonders im Rahmen der APD kann durch Variation der Konzentration des osmotischen Agens, Behandlungszyklus und Füllvolumen im Bauchraum mit Hilfe eines *Cyclers* die Behandlung speziell an den Patienten angepasst werden. Dabei werden von Mediziner*innen verschiedene standardisierte PD-Tests durchgeführt, um verschiedene Parameter zu bestimmen. Diese werden dann in speziellen Programmen, welche als Verschreibungshilfen eingesetzt werden, verwendet.^[45] Mit Hilfe einer Software können Transportvorgänge an der Membran berechnet werden, sodass der Patient nicht verschiedene Behandlungsvarianten aktiv testen muss. Die Grundlagen solcher Software sind verschiedene Membrantransportmodelle, welche sich in ihrer Komplexität stark unterscheiden. Auf dem Markt gibt es verschiedene Anbieter von kinetischer Modelling-Software, wie z.B. PD Adequest® von Baxter Healthcare Corporation, PACK PD von Fresenius USA, PatientOnLine (POL) von Fresenius Germany oder PDC™ von Gambro AB.^[46] Jedes dieser Programme basiert auf einer Variante von verschiedenen Membranmodellen.^[45] Die drei bekanntesten Modelle in Bezug auf den Transport an der Peritonealmembran sind das Pyle-Popovich Modell, das 3-Poren Modell sowie das Transportmodell nach Flessner. In den derzeit verfügbaren Programmen werden allerdings nur Varianten der ersten beiden Membranmodelle verwendet.^[47]

2.3.1 Membranmodell nach Pyle-Popovich

Das Membranmodell nach Pyle und Popovich war das erste Modell, welches auf den Stofftransport an einer Peritonealmembran angewendet wurde. Das Modell ist eine vereinfachte Darstellung der natürlichen Prozesse mit der Annahme, dass zwei ideal durchmischte Kompartimente (Dialysat und Blut) von einer semipermeablen Membran getrennt sind. Eine schematische Darstellung des Membranmodells nach Pyle-Popovich ist in Abbildung 11 dargestellt.^{[47],[48]}

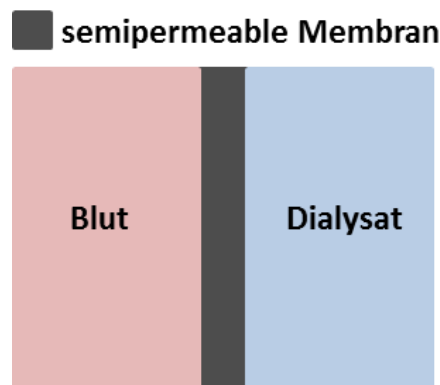


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Membranmodells nach Pyle-Popovich.

Im Folgenden sind die mathematischen Beziehungen der Volumenänderung im Dialysat ($d(V_D)$) und Stoffstromänderung ($d(V_D \cdot c_D)$) mathematisch dargestellt.

Die Volumenänderung im Dialysat nach der Zeit ist proportional zur hydraulischen Leitfähigkeit L_P , zur Fläche A sowie zur osmotischen Druckdifferenz zwischen Dialysatlösung und Blutplasma abzüglich der Absorption von Flüssigkeit Q_A (siehe Gleichung 7). Die Nettoultrafiltrationsrate Q_U ergibt sich somit aus der Ultrafiltrationsrate (Q_V) abzüglich der Absorption (Q_A) (siehe Gleichung 8).^{[47],[49]}

$$Q_U = L_p \cdot A \cdot \sigma \cdot (\pi_D - \pi_B) - Q_A$$

Gleichung 7

$$Q_U = Q_V - Q_A$$

Gleichung 8

Q_U	Nettoultrafiltration [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$]
L_p	hydraulische Leitfähigkeit [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$]
A	Fläche [m^2]
σ	Reflektionskoeffizient [-]
Π_D	osmotischer Druck im Dialysat [Pa]
Π_B	osmotischer Druck im Blut [Pa]
Q_A	Absorption von Flüssigkeit [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$]
Q_V	Ultrafiltration von Blut nach Dialysat [$\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$]

Die Konzentrationsänderung im Dialysat nach der Zeit ist abhängig von dem Massentransferkoeffizienten MTAC, der Konzentrationsdifferenz zwischen Dialysatlösung und Blut (diffusiver Anteil Massentransport) sowie von der Ultrafiltrationsrate über die Membran, dem substanzspezifischen Siebkoeffizienten und der mittleren Konzentration (konvektiver Anteil Massentransport) (siehe Gleichung 9).

Der MTAC ist proportional zur Diffusionskonstante und Fläche und verhält sich umgekehrt proportional zur Membrandicke (siehe Gleichung 10).^{[49],[31]}

$$\frac{d(V_D \cdot c_D)}{dt} = MTAC \cdot (c_B - c_D) + Q_U \cdot S \cdot \bar{c}$$

Gleichung 9

$$MTAC = \frac{D_f}{\Delta x} \cdot A$$

Gleichung 10

$d(V_D \cdot c_D)/dt$	Konzentrationsänderung im Dialysat nach der Zeit [mmol/s]
MTAC	mass transfer area coefficient [ml/s]
c_B	Konzentration im Blut [mmol/ml]
c_D	Konzentration im Dialysat [mmol/ml]
Q_U	Nettoultrafiltration [ml/s]
S	Siebkoeffizient [-]
$\bar{c}$	mittlere Konzentration [mmol/ml] $((c_D + c_B)/2)$
D_f	Diffusionskoeffizient [ml/s]
Δx	Membrandicke [m]
A	Membranfläche [m ²]

Das Modell nach Pyle-Popovich kann separat für die Berechnung des Transportes von niedermolekularen Substanzen angewendet werden und zeigt eine gute Annäherung an klinische Daten. Hinsichtlich des Transportes von makromolekularen Substanzen zeigt das Modell jedoch eine geringe Übereinstimmung.

Mit Hilfe des Modells können außerdem nur passive Transportmechanismen über eine semipermeable Membran dargestellt werden.

Das Modell lässt sich somit auf den Transport über die kleinen Poren der Blutgefäße beziehen, jedoch nicht auf den Transport von Wasser über die Aquaporine sowie Transport von Makromolekülen über die großen Poren.^{[47],[49]} In der Literatur findet man die Ausführung des Pyle-Popovich Modells, zusätzlich noch um die hydrostatische Druckdifferenz (ΔP) erweitert, zur Beschreibung des Flüssigkeitstransportes, wodurch eine Annäherung an die Realität erzielt wurde (siehe Gleichung 11).^[49]

$$Q_U = L_p \cdot A \cdot (\Delta P - \sigma \cdot (\pi_D - \pi_B)) - Q_A$$

Gleichung 11

ΔP hydrostatische Druckdifferenz [Pa]

2.3.2 „3-Poren-Modell“ nach Bengt Rippe

Das 3-Poren-Modell nach Bengt Rippe beschreibt den Flüssigkeits- und Stofftransport am Peritoneum. Hierbei wird die Membran nicht als homoporöse Membran betrachtet, sondern die Poren der Blutgefäße in drei verschiedene Porenarten unterteilt. Im klassischen 3-Poren-Modell wird das Blutgefäß als einzige Barriere betrachtet, welche zwei Kompartimente, Blut und Dialysat voneinander trennen. Nach dem Modell befinden sich auf den Blutgefäßen ca. 1-2% Aquaporine (Radius von 2-4 Å), ca. 5% große Poren (Radius ca. 200-300 Å) und ca. 90-95% kleine Poren (Radius ca. 40-60 Å).^[49]

Nach diesem Modell verlaufen die 3 verschiedenen Arten von Poren parallel und haben eine zylindrische Form. In Abbildung 12 ist eine schematische Darstellung des Modells sowie der erweiterten Form des Modells dargestellt. In der erweiterten Form wird das Gewebe als zusätzliche Barriere berücksichtigt. Der Flüssigkeitstransport über die 3 Porenarten wird mathematisch genauso dargestellt, wie durch das Pyle-Popovich Modell.^[47]

Der Flüssigkeitstransport ist abhängig von der hydraulischen Leitfähigkeit der Membran, der osmotischen Druckdifferenz, der hydrostatischen Druckdifferenz sowie von den Reflektionskoeffizienten. Der Unterschied zwischen dem Pyle-Popovich Modell und dem 3-Poren Modell besteht darin, dass die Reflektionskoeffizienten für die 3 Arten von Poren spezifisch in das Modell eingehen und je nach prozentualem Porenanteil gewichtet in dem Modell berücksichtigt werden.^[49]

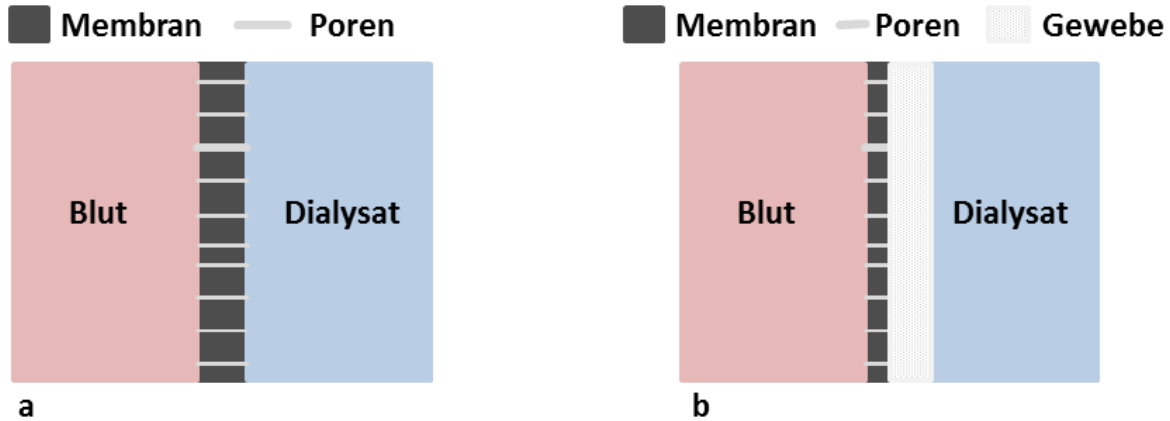


Abbildung 12: Schematische Darstellung des 3-Poren-Modells (a) und erweiterten 3-Poren-Modells (b).

Für den Volumenfluss zwischen Dialysat und Blutgefäßen lassen sich somit folgende Gleichungen definieren (Gleichung 12 bis Gleichung 14), wobei die Summe der prozentualen Anteile immer eins ergeben (Gleichung 15).

Der Volumenfluss über die ultrakleinen Poren (Q_{VC}) ist abhängig vom prozentualen Anteil α_C , der hydraulischen Leitfähigkeit und Fläche sowie von der hydrostatischen und osmotischen Druckdifferenz. Der Reflektionskoeffizient beträgt an den ultrakleinen Poren für alle Substanzen eins, da nur Wasser durch die Poren diffundieren kann.

$$Q_{VC}(t) = \alpha_C \cdot L_P \cdot A \cdot (\Delta P - \sum_{i=1}^m (\pi_{D,i} - \pi_{B,i})) \quad \sigma_C = 1$$

Gleichung 12

Der Volumenfluss über die kleinen Poren (Q_{VS}) ist abhängig vom prozentualen Anteil α_S , der hydraulischen Leitfähigkeit und Fläche sowie von der hydrostatischen und osmotischen Druckdifferenz und den spezifischen Reflektionskoeffizienten ($\sigma_{S,i}$).

$$Q_{VS}(t) = \alpha_S \cdot L_P \cdot A \cdot (\Delta P - \sum_{i=1}^m \sigma_{S,i} \cdot (\pi_{D,i} - \pi_{B,i}))$$

Gleichung 13

Der Volumenfluss über die großen Poren (Q_{VL}) ist abhängig vom prozentualen Anteil α_L , der hydraulischen Leitfähigkeit und Fläche sowie von der hydrostatischen und osmotischen Druckdifferenz und den spezifischen Reflektionskoeffizienten ($\sigma_{L,i}$), wobei dieser für niedermolekulare Substanzen gegen 0 geht. Da für den Fluss über die großen Poren hauptsächlich die hydrostatische Druckdifferenz und kolloidosmotische Druckdifferenz einen Einfluss ausüben, kann zur Vereinfachung die kristalloidosmotische Druckdifferenz vernachlässigt werden.^[49]

$$Q_{VL}(t) = \alpha_L \cdot L_P \cdot A \cdot (\Delta P - \sum_{i=1}^m \sigma_{L,i} \cdot (\pi_{D,i} - \pi_{B,i})) \cong \alpha_L \cdot L_P \cdot A \cdot \Delta P \quad \sigma_L \rightarrow 0$$

Gleichung 14

$$\alpha_c + \alpha_S + \alpha_L = 1$$

Gleichung 15

$\alpha_c, \alpha_S, \alpha_L$ Anteil der ultrakleinen (C), kleinen (S) und großen Poren [%]

Nach dem 3-Poren Modell findet der Transport von gelösten Molekülen nur über kleine und große Poren der Blutgefäße statt. Über die kleinen Poren findet der Transport einer Substanz sowohl diffusiv aufgrund des Konzentrationsgefälles zwischen Blut und Dialysat als auch durch den konvektiven Stofftransport statt (siehe Gleichung 16). Im Gegensatz dazu findet der Transport von Makromolekülen hauptsächlich durch Konvektion über die großen Poren statt (siehe Gleichung 17).

Unter der Annahme, dass die Blutkonzentration über die Zeit konstant bleibt und keine Absorption von Substanz über die Lymphgefäße stattfindet, kann der Fluss mit Hilfe folgender Gleichungen beschrieben werden.^[49]

$$J_S = MTAC_s \cdot (c_B - c_D) + Q_{VS} \cdot (1 - \sigma_s) \cdot \bar{c}$$

Gleichung 16

J_S Konzentrationsänderung über die kleinen Poren nach der Zeit [mmol/s]

$$J_L = Q_{VL} \cdot (1 - \sigma_L) \cdot c_B$$

Gleichung 17

J_L Konzentrationsänderung über die großen Poren nach der Zeit [mmol/s]

Allgemein gilt, dass der Reflektionskoeffizient σ abhängig von der Porengröße und der Molekülgröße ist und im Rahmen des 3-Poren Modells nach Gleichung 18 berechnet wird.

$$\sigma_{P/S} = 1 - \frac{(1 - \lambda)^s [2 - (1 - \lambda)^2] \cdot \left(1 - \frac{\lambda}{3}\right)}{1 - \frac{\lambda}{3} + \frac{2}{3} \cdot \lambda^2}$$

Gleichung 18

$\sigma_{P/S}$ Reflektionskoeffizient (*solute/pore*) [-]

$\lambda = \alpha_e / r_{\text{Pore}}$ Verhältnis von Molekülradius (α_e) zu Porenradius (r_{Pore}) [-]

Der Massentransferkoeffizient wird auch als „*permeability surface area*“ oder „*diffusive permeability*“ im 3-Poren Modell bezeichnet und wird nach Gleichung 19 berechnet.

$$MTAC_{P/S} = D_{solute} \cdot \left(\frac{A_0}{\Delta x} \right)_{pore} \cdot \left(\frac{A_{eff}}{A_0} \right)_{solute, pore} \cdot 60$$

Gleichung 19

$MTAC_{P/S}$	mass transfer area coefficient (solute/pore) [ml/min]
D_{solute}	Diffusionskoeffizient einer Substanz in Wasser [cm ² /s]
A_0	uneingeschränkte Porenfläche [cm ²]
Δx	Diffusionsweglänge [cm]
A_{eff}	effektive Porenoberfläche [cm ²]

Das Verhältnis zwischen $A_0/\Delta x$ wird als „*unrestricted*“ uneingeschränkte Porenfläche zur Diffusionsweglänge bezeichnet. D_{solute} ist der Diffusionskoeffizient einer Substanz in Wasser [cm²/s]. Das Verhältnis zwischen effektiver Porenoberfläche zu nominalen Porenoberfläche wird auch als „*restriction factor for diffusion*“ bezeichnet und wird nach Gleichung 20 berechnet.

$$\left(\frac{A_{eff}}{A_0} \right)_{solute/ pore} = \frac{(1 - \lambda)^{4,5}}{1 - 0,3956 \cdot \lambda + 1,0616 \cdot \lambda^2}$$

Gleichung 20

Vergleicht man die beiden Modelle hinsichtlich der Effektivität, den Volumenfluss und die Änderung der Konzentration an Substanz vorherzusagen, zeigt sich, dass das 3-Poren Modell weitaus näher an der Realität ist, als das Membranmodell nach Pyle-Popovich und auch den Stofftransport für größere Moleküle genauer vorhersagt. Vor allem bei dem Einsatz von Glucosepolymeren oder alternativen osmotischen Agenzien kann durch das homopore Membranmodell keine gute Annäherung an klinische Daten erzeugt werden.^[49] Derzeit werden die beiden Membrantransportmodelle zur Berechnung der Transportvorgänge am Peritoneum in Programmen verwendet. Beide Modelle sind eindimensionale Modelle und berücksichtigen nicht die Verteilung der Blutgefäße und den Effekt einer zusätzlichen Barriere der Mesothelzellschicht oder des Interstitiums.

2.3.3 „*Distributed model*“ nach Michael Flessner

Das „*Distributed model*“ nach Michael Flessner ist ein zweidimensionales Modell zur Beschreibung der Transportvorgänge an der peritonealen Membran.

Das Modell berücksichtigt im Gegensatz zum Modell nach Pyle-Popovich und 3-Poren Modell die Verteilung der Blutgefäße im Interstitium (siehe Abbildung 13). Nach dem Modell nimmt die osmotische Druckdifferenz, erzeugt durch Glucoselösungen, exponentiell mit der Entfernung zwischen Dialyselösung und Blutgefäß in der Gewebsschicht ab.^{[47],[50]}

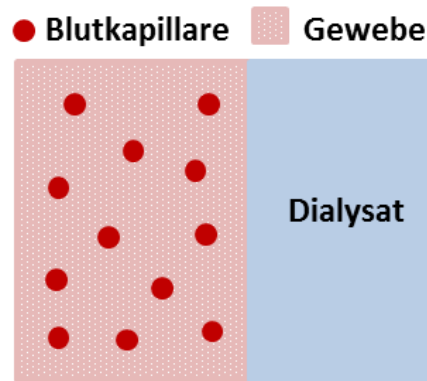


Abbildung 13: Membranmodell nach Flessner.

Wird ein Patient über längere Zeit mit Hilfe von Peritonealdialyse behandelt, kann es zu strukturellen Änderungen des Peritoneums kommen, wie z.B. eine Verdickung des submesothelialen Bereiches, einer vermehrten Gefäßbildung oder einer Abtragung der Mesothelzellschicht, wodurch es zu einer erhöhten Permeabilität kommt. Diese Effekte können bei dem Modell von Flessner miteinbezogen werden, aufgrund der Komplexität ist das Modell jedoch nicht für die praktische Anwendung sondern für den Forschungsbereich geeignet.^[50]

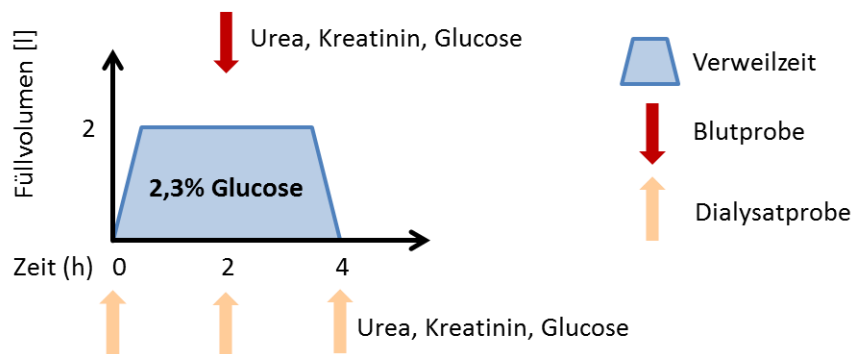
2.4 Membrantestverfahren in der Praxis am Patienten

In der Praxis werden verschiedene Membrantestverfahren eingesetzt, um zum einen direkt eine Aussage über die Transporterkategorie des Patienten treffen zu können oder in Kombination mit Programmen Membranparameter zu berechnen, welche wiederum in die Modelle miteinbezogen werden. Im Folgenden werden einige für diese Arbeit relevanten Testverfahren vorgestellt.

2.4.1 Peritoneale Äquilibrationstest

Der Peritoneale Äquilibrationstest (PET) war das erste Testverfahren zur Beurteilung der Ultrafiltrationsleistung und peritonealem Transport von niedermolekularen Substanzen eines Patienten und wurde 1987 von Twardowski veröffentlicht. Der PET wird derzeit in der Praxis immer noch am häufigsten durchgeführt, da auch zur Interpretation der Ergebnisse nur einfache Berechnungen notwendig sind.

In Abbildung 14 ist schematisch die Durchführung des „Standard-PET“ mit einer 2,3%igen Glucoselösung dargestellt. Es wird ein Volumen von 2 Litern in den Patienten überführt, Dialysatproben zum Zeitpunkt 0, 2 und 4 Stunden sowie eine Blutprobe nach 2 Stunden dem Patienten entnommen. Außerdem wird nach 4 Stunden das Gewicht des verbrauchten Dialysates bestimmt, um Rückschlüsse auf die Ultrafiltrationsleistung zu ziehen.^{[15],[51]}



PET Test

- Glucose D/D_0
- Urea D/P
- Kreatinin D/P
- Ultrafiltrationsvolumen nach 4 h

Abbildung 14: Schema zur Durchführung des PET.

In der Auswertung der Daten wird das Verhältnis der Konzentration zwischen Dialysat zu Plasma (D/P) von den beiden Indikatorsubstanzen Urea und Kreatinin bestimmt, um eine Aussage bezüglich *Clearance* treffen zu können. In der Literatur wird auch beschrieben, dass das Verhältnis D/P von Natrium im PET bestimmt wird.^[51] Von Glucose wird das Verhältnis zwischen Dialysat zu Dialysatausgangskonzentration bestimmt, um Rückschlüsse auf die Glucoseabsorption zu ziehen (siehe Abbildung 15).

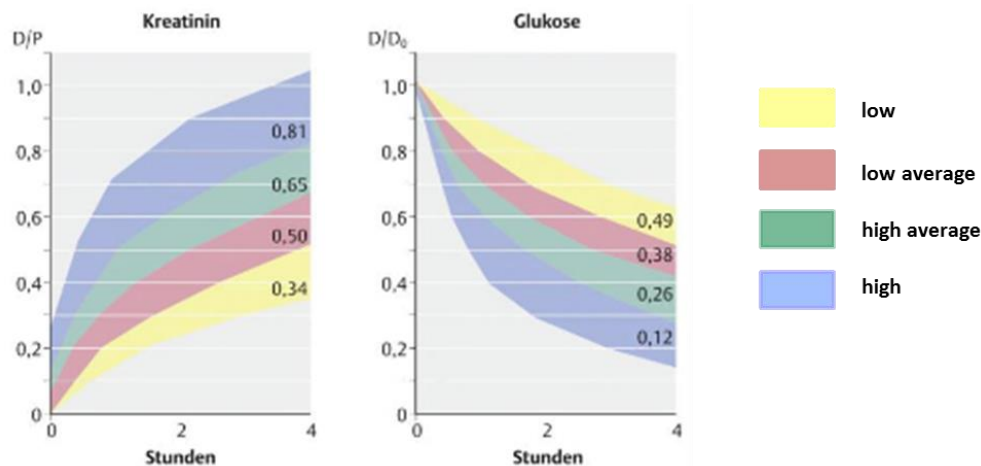


Abbildung 15: Exemplarische Auswertung des PET.^[15]

Die Ergebnisse werden dann entsprechend der Einteilung von Twardowski ausgewertet, sodass eine Aussage über das Transporterverhalten der PD Membran des Patienten getroffen werden kann. Man kann anhand der Abbildung erkennen, dass bei einem schnellen Transportertyp das Verhältnis D/P von Kreatinin schneller zunimmt und Glucose schneller absorbiert wird. Durch die schnelle Absorption von Glucose bei schnellen Transportern ergibt sich meist eine mäßige bis schlechte Ultrafiltration. In Abbildung 15 ist schematisch die Kategorisierung anhand von Kreatinin und Glucose dargestellt, wobei man zwischen langsamen (gelb), mäßig langsamen (rot), mäßig schnellen (grün) und schnellen Transportertypen (blau) unterscheidet.^[52] Die Gründe für einen schnellen Transportertyp können zum einen anatomische Ursachen haben, wie z.B. eine erhöhte effektive Austauschfläche des Peritoneums oder auch auf eine Entzündung des Bauchfells hindeuten.

Mit Hilfe des PET kann jedoch zwischen den unterschiedlichen Ursachen im Gegensatz zum *Peritoneal Dialysis Capacity* Test nicht unterschieden werden.^[53]

2.4.2 *Peritoneal Dialysis Capacity* Test

Der *Peritoneal Dialysis Capacity* Test (PDC) Test beruht auf dem 3-Poren Modell von B. Rippe und gilt als zuverlässiges Modell zur Beschreibung der Transportvorgänge am Peritoneum.

Der PDC Test wurde von Haraldsson entwickelt und wird über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt, um spezifische Membranparameter zu detektieren. In Abbildung 16 ist das Schema zur Durchführung des PDC Tests dargestellt. Wie anhand der Abbildung zu erkennen, werden unterschiedliche Zyklen (*short, middle, long*) mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben sowie Dialysatproben gezogen. Außerdem wird jeweils das Gewicht der frischen und verbrauchten Dialyselösungen bestimmt, um die Ultrafiltrationsleistung zu bestimmen. In die Auswertung fließen außerdem die über 24 Stunden gesammelten Urinproben und auch die exakte Uhrzeit von Ein- und Auslauf der Dialyselösungen ein.^{[54],[55]}

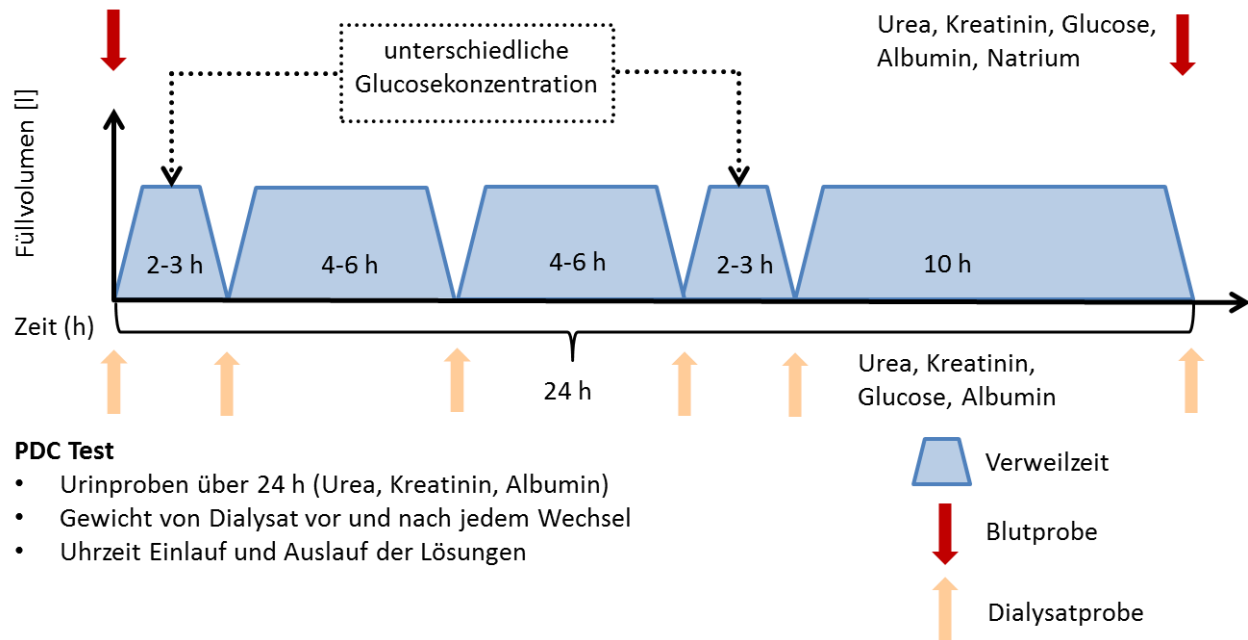


Abbildung 16: Schema zur Durchführung des PDC Tests.

Mit Hilfe der Software und der Ergebnisse des PDC Tests werden anschließend spezifische Membranparameter berechnet. Zu den Membranparametern zählen:

- Effektive peritoneale Oberfläche (Verhältnis von freier Porenfläche zur Diffusionsstrecke, $A_0/\Delta x$); dieser Wert korrespondiert zur Diffusionsfähigkeit von Substanzen und ist vergleichbar zum D/P Verhältnis im PET
- Die finale Reabsorptionsrate von Flüssigkeit von der Dialysatseite in Richtung Blutgefäße und Lymphgefäße, sobald kein Glukosegradient mehr vorhanden ist
- Flüssigkeitstransport über die großen Poren und somit Verlust von Proteinen aus dem Blutplasma in Richtung Dialysat

Ein erhöhter Flüssigkeitstransport über die großen Poren im Vergleich zur Gesamtporenoberfläche ist z.B. ein Indiz für einen entzündlichen Zustand des Peritoneums. Im Vergleich zum PET ermöglicht der PDC Test eine genauere Aussage über den Zustand des Peritoneums sowie die Transportmechanismen, wodurch eine angepasste Behandlung an den Patienten ermöglicht wird.^{[54],[55]}

2.4.3 Peritoneal Function Test

Der *Peritoneal Function Test* (PFT) ist ein Membrantestverfahren, welches in das alltägliche Behandlungsschema (CAPD oder APD) integriert wird. Das Testverfahren findet über einen Zeitraum von 24 Stunden sowie einen zusätzlichen Zyklus von 2 bis 4 Stunden am darauffolgenden Morgen statt. Von jedem einzelnen Zyklus wird die Einfüllzeit, Zykluszeit, Glucosekonzentration und verbrauchte Menge an Dialysatvolumen notiert. Urinproben sowie Effluentproben werden über den kompletten Verlauf gesammelt. Der letzte Zyklus am Morgen wird auch als „*quality assurance*“, Qualitätssicherung bezeichnet. Eine Blutprobe wird nach dem kompletten Testverfahren zur Bestimmung von Urea, Kreatinin, Glucose, Albumin und Gesamtprotein benötigt. Von den verschiedenen Effluentproben wird die Konzentration an Urea, Kreatinin, Glucose und Gesamtprotein bestimmt. Von den Urinproben wird die Konzentration an Urea und Kreatinin bestimmt. Zusätzlich wird vom Patienten noch Größe und Gewicht (ohne Dialyselösung) bestimmt und mit allen ermittelten Daten in die Software PatientOnLine (POL) oder PACK PD integriert, um die Membranparameter zu bestimmen.^{[46],[51]}

2.4.4 Software zur Interpretation von Membrantestverfahren

Derzeit werden in der Praxis verschiedene Programme mit verschiedenen Membrantransportmodellen verwendet, Varianten oder Kombinationen des Pyle-Popovich Modells oder 3-Poren Modells. Jede dieser Softwaremodule, PD Adequest®, PatientOnLine (POL), PACK PD oder PDC™ benötigt Ergebnisse aus praktischen Membrantestverfahren, um die spezifischen Membranparameter in die Modelle zu integrieren. Die ersten Varianten von PD Adequest basierten auf dem Modell nach Pyle-Popovich, wobei inzwischen das 3-Poren Modell miteinbezogen wurde. Somit sind Parameter wie der MTAC, welcher abhängig vom Füllvolumen und Behandlungszeit ist, der substanzspezifische Reflektionskoeffizient und die lymphatische Absorption in der Software integriert.

PD Adequest 2.0 berechnet aus den Ergebnissen des PET Tests spezifische MTAC, welche wieder in die Software miteinfließen. Hinter der Software PDC™ von Haraldsson ist das klassische 3-Poren Modell von Rippe hinterlegt. Das Programm benötigt Ergebnisse des PDC Tests, wodurch spezifische Membranparameter für das Modell berechnet werden. Hierzu zählen die effektive peritoneale Oberfläche, der Volumenfluss über die großen Poren sowie die Nettoultrafiltration. Als Eingabeparameter für die Software PACK PD sowie für POL ist es notwendig, den PFT Test durchzuführen. PACK PD basiert auf einer vereinfachten Modellvariante des Pyle-Popovich Modells und POL auf einer erweiterten Variante.^{[49],[56]} Die Bestimmung des Nettoultrafiltrationsvolumens kann durch einfaches Wiegen oder mit Hilfe des *Cyclers* nach jeder Behandlung durchgeführt werden. Zur Ermittlung der *Clearance* von Urämietoxinen ist es jedoch notwendig, Parameter in Blutplasma und Dialysat zu bestimmen. Da eine Realisierung in der Routineanwendung nur schwer möglich ist, ist es notwendig, eine angepasste Behandlung mit Hilfe von Membranmodellen und Software zu realisieren.^[49]

3 Aufgabenstellung

Um die Peritonealdialyse als Nierenersatzverfahren durchzuführen, ist es notwendig, die Zusammensetzung der Dialyselösung sowie das Behandlungsverfahren auf den Patienten abzustimmen. Die Entfernung von Giftstoffen und überschüssigem Wasser aus dem Patienten wird durch den Einsatz von osmotischen Agenzien in der Praxis realisiert. Die derzeit am häufigsten verwendeten osmotischen Agenzien Glucose und das Glucosepolymer Icodextrin haben verschiedene Vor- aber auch einige Nachteile mit sich (siehe Kapitel 2.2.1). Aus diesem Grund ist der Bereich Forschung und Entwicklung von neuen alternativen osmotischen Agenzien für die Peritonealdialyse sowie deren Einsatzverfahren entscheidend. Dabei werden an neue osmotische Substanzen verschiedene Anforderungen gestellt:

- Schnelle und langanhaltende Ultrafiltrationsleistung
- geringe Absorption des osmotischen Agens durch Blut- sowie Lymphgefäße
- keine toxischen, allergisierenden, metabolischen Auswirkungen
- bei Aufnahme idealerweise vollständige Metabolisierung
- Stabilität gegen Temperatur im Rahmen der notwendigen Hitzesterilisation

Um solche osmotischen Agenzien hinsichtlich ihrer Ultrafiltrations- und Clearanceleistung zu beurteilen, werden in der Praxis Tierversuche oder Computersimulationen eingesetzt. Bei Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, Standort St. Wendel, in der Abteilung GRD/PEC-SCC, Sterile Solutions/Packaging/Accessories Development (EMEA) wurden bereits in früheren Arbeiten ein sogenanntes „*in vitro* 1-Poren-Modell“ verwendet, um die osmotische Aktivität verschiedener Substanzen unter Laborbedingungen experimentell zu testen.^[57] Das Testsystem ist eine robuste Methode und liefert reproduzierbare Ergebnisse.

In Abbildung 17 sind die experimentellen Ergebnisse beim Einsatz der OA Glucose und Icodextrin im *in vitro* 1-Poren Modell unter Verwendung einer 1 kDa Membran dargestellt.

Es ist jeweils die Volumenzunahme im Testsystem über die Zeit repräsentativ für die UF-Leistung im Patienten dargestellt. Man kann erkennen, dass Glucose eine schnelle aber nur kurze Ultrafiltration zeigt und Icodextrin einen langsamen aber dafür langanhaltenden Wasserentzug.

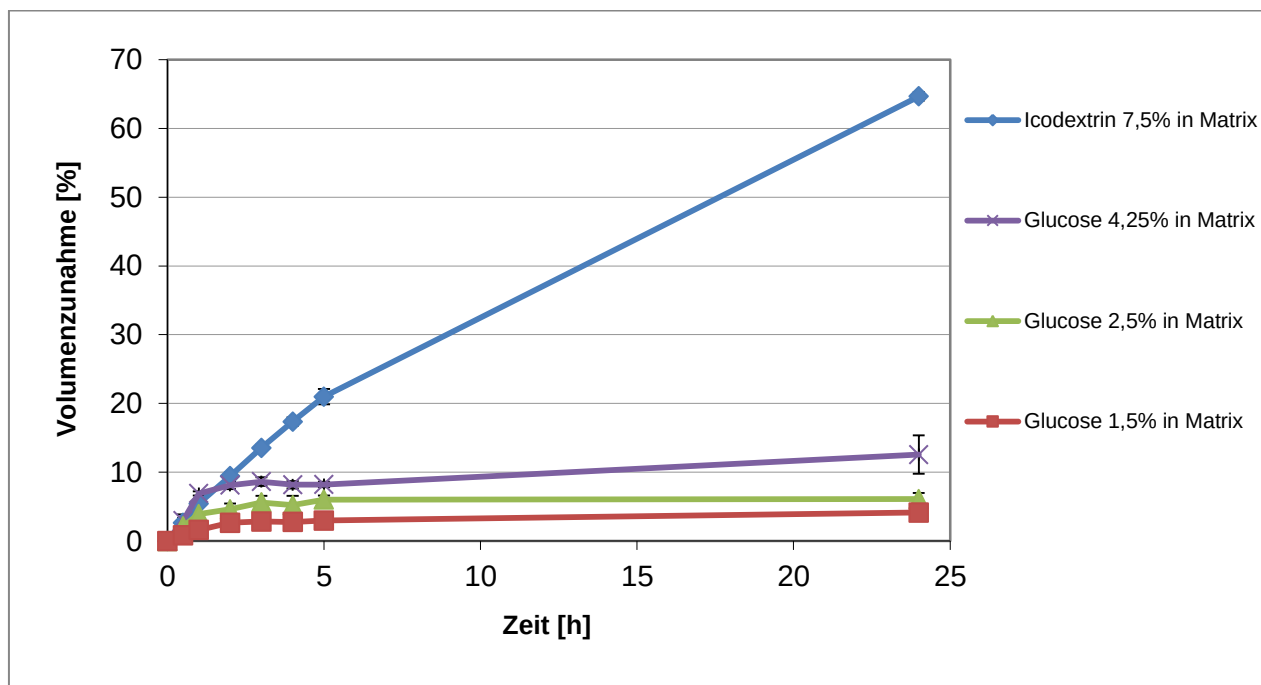


Abbildung 17: Experimentelle Ergebnisse der UF-Leistung von Glucose und Icodextrin im *in vitro* 1 Poren Modell unter Verwendung einer 1 kDa Membran.

Der Nachteil des 1-Poren Modells liegt darin, dass nicht alle beteiligten Transportwege (Aquaporine, große und kleine Poren) während der PD berücksichtigt und simuliert werden können. In Abbildung 18 ist eine Computersimulation der Ultrafiltrationswege über die Peritonealmembran für eine 3,86%ige Glucoselösung dargestellt.

Anhand der Abbildung 18 wird ersichtlich, dass ein weiterer entscheidender Transportweg für den Entzug von Wasser die Aquaporine auf den Blutgefäßen im Peritoneum darstellen. Dies ist besonders wichtig beim Einsatz von niedermolekularen Substanzen wie Glucose, da hier ca. die Hälfte des Flüssigkeitstransportes über die Aquaporinkanäle verläuft.

Es wird anhand der Computersimulation außerdem gezeigt, dass beim Einsatz von Glucose als osmotisches Agens eine Resorption von Flüssigkeit nach ca. 4 Stunden eintritt. Die großen Poren spielen für den Flüssigkeitstransport eine eher untergeordnete Rolle, müssen aber hinsichtlich des Stofftransportes vor allem von Makromolekülen berücksichtigt werden.

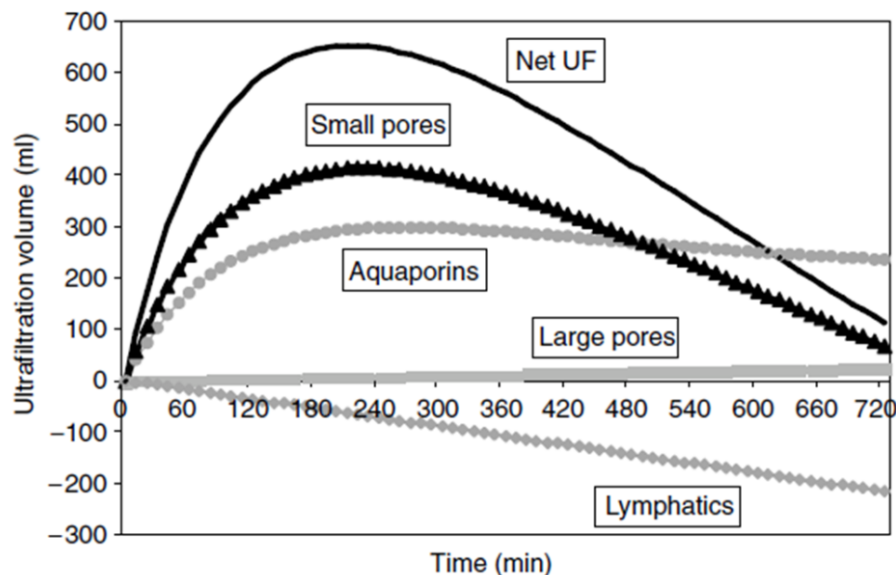


Abbildung 18: Computersimulation der Ultrafiltrationswege über die Peritonealmembran für eine 3,86%ige Glucoselösung.^[58]

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst das vorhandene 1-Poren Modell (*in vitro* Testsystem A) genutzt werden, um alternative osmotische Agenzien auf ihre Ultrafiltrationsleistung zu untersuchen (siehe Abbildung 19) und die Ursache der Resorption von Flüssigkeit (*backfiltration*) bei Verwendung von Glucose als OA zu analysieren.

Des Weiteren sollen neue *in vitro* Testsysteme im Labormaßstab entwickelt werden, um die Transportvorgänge an den drei verschiedenen Arten von Poren (Aquaporine, kleine und große Poren) am Blutgefäß (siehe Kapitel 2.1.1) während einer Peritonealdialysebehandlung nachzustellen und zu analysieren. Anhand von Abbildung 18 wird deutlich, dass die Aquaporine eine entscheidende Rolle während der PD spielen. Somit ist der Aufbau eines *in vitro* Testsystems B zur Simulation des Wassertransportes über Aquaporine bei Verwendung verschiedener OA notwendig.

Der Transport von Wassermolekülen über Aquaporine findet über erleichterte Diffusion statt (siehe Kapitel 2.1.1, Abbildung 5). Aus diesem Grund wird für den Aufbau von *in vitro* Testsystem B eine spezielle Membran von der Firma Aquaporin A/S (Dänemark) verwendet, in welcher Aquaporinvesikel integriert sind (siehe Kapitel 6.1.1). Um schließlich den Transport über alle Arten der beteiligten Poren gleichzeitig unter Laborbedingungen zu simulieren, ist die Entwicklung eines Messsystems mit verschiedenen Membranen zentrale Aufgabe dieser Arbeit (*in vitro* Testsystem C, 3-Poren Modell).

In Abbildung 19 ist der Einsatz und Nutzen von *in vitro* Testsystemen für die PD dargestellt. *In vitro* Testsysteme können zum einen genutzt werden, um neuartige osmotische Agenzien oder Dialyselösungen hinsichtlich ihrer osmotischen Aktivität an den verschiedenen Arten von Poren am Peritoneum zu untersuchen. Ein weiterer Einsatz solcher Testsysteme und weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit ist es, spezifische Membranparameter experimentell zu ermitteln und diese als Eingabegrößen für Computermodele zu verwenden. Ziel einer solchen Parameterermittlung ist eine Optimierung der Software, welche zur Simulation der Peritonealdialysebehandlung in der Praxis eingesetzt wird.

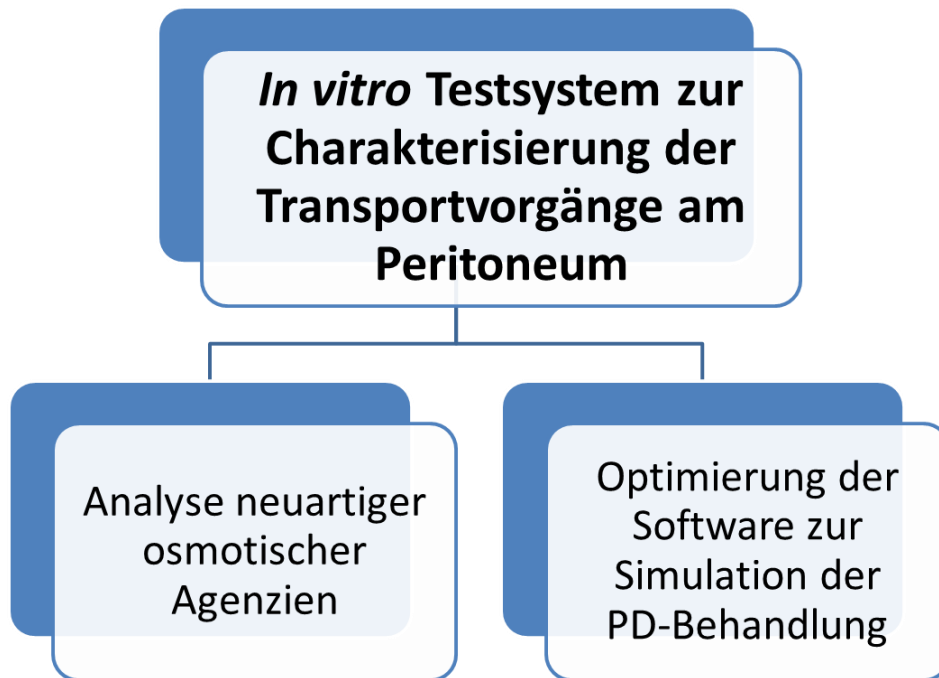


Abbildung 19: Übersicht zum Einsatz von *in vitro* Testsystemen für die Peritonealdialyse.

Als langfristiges Ziel kann ein solches *in vitro* 3-Poren Testsystem eingesetzt werden, um ein Membrantestverfahren zu entwickeln, mit welchem eine an den Patienten angepasste Behandlungsmethode hinsichtlich Konzentration und Art des osmotischen Agens, des Füllvolumens und der Behandlungszyklen realisiert werden kann.

4 Experimenteller Teil *in vitro* Testsystem A

In diesem Teil werden die verwendeten Materialien und Methoden für die Experimente von Testsystem A (1-Poren Modell) genauer beschrieben. Im Methodenteil werden die Ultrafiltrationsversuche zur Bestimmung der osmotischen Aktivität von verschiedenen Substanzen genauer erläutert. Des Weiteren werden die Methoden beschrieben zur Bestimmung der verschiedenen chemisch-physikalischen Parameter der Versuchslösungen.

4.1 Materialien

Bei den Ultrafiltrationsversuchen werden als Dialysemembran regenerierte Cellulosemembranen eingesetzt, welche im Folgenden genauer beschrieben werden. Darüber hinaus sind die verschiedenen Modellsubstanzen aufgeführt, um die osmotische Aktivität jener Substanzen zu testen sowie weitere Modellsubstanzen, die dazu dienen, den kolloidosmotischen Druck von Albumin im Blutplasma zu simulieren.

4.1.1 Regenerierte Cellulosemembranen

Die Dialysemembranen für die Ultrafiltrationsversuche werden von der Firma Carl Roth bezogen und gehören zur ZelluTrans/Roth V-Serie. Sie bestehen aus regenerierter Cellulose und sind als Dialyseschlauchmembran in einer Länge von 50 cm und einer Breite von 4,5 cm erhältlich. Die Dialysemembranen werden entsprechend ihrem *Molecular Weight Cut Off* (MWCO, Molekulargewicht-Abtrennungsgrenze) unterschieden. Die Angabe erfolgt in Dalton (Da) und gibt somit eine Trenngrenze der Membran an. Für die Ultrafiltrationsversuche werden Membranen mit einem MWCO von 1000 und 25000 Dalton verwendet, was im Bereich von Ultrafiltrationsmembranen liegt.

Für die Definition dieses MWCOs gibt es allerdings keine allgemein gültigen Vorschriften. Die Bestimmung kann mittels Markerproteinen erfolgen sowie mit inerten Partikeln wie z.B. polydisperssem Dextran. Der MWCO beschreibt die Größe der Moleküle, die zu 90% von der Membran zurückgehalten werden. Bedingt durch den Herstellungsprozess, dem Pressen des fädigen Cellulosematerials, entstehen unregelmäßige Spalten und Öffnungen in der Membran, sodass man trotz allem verfahrensbedingt keine absolut einheitlichen Poren, sondern eine Porengrößenverteilung erhält. Der Stoffdurchgang der Modellsubstanzen ist außerdem anhängig von der Struktur der Modellsubstanzen in Lösungen, ihrer Ladung sowie der Hydrathülle.^{[59],[60]}

4.1.2 Modellsubstanzen für *in vitro* Testsystem A

Zur experimentellen Bestimmung der Ultrafiltrationsleistung bei den Versuchen für das 1-Poren-Modell werden verschiedene Modellsubstanzen eingesetzt. Um den Ultrafiltrationsverlauf zwischen *in vitro*-Testsystem und realen Daten bzw. Computersimulationen zu vergleichen, werden die beiden kommerziell verfügbaren osmotischen Agenzien Glucose und das Glucosepolymer Icodextrin verwendet. Darüber hinaus werden verschiedenen Dextrane in unterschiedlichen molaren Massen als osmotische Agenzien eingesetzt, um den Effekt der molaren Masse auf das UF-Verhalten zu analysieren. Osmotische Agenzien, deren zahlenmittlere molare Massen M_n und gewichtsmittlere molare Massen M_w , Polydispersitätsindex (PDI), sowie Hersteller sind Tabelle 4 zu entnehmen. Das „T“ in der Bezeichnung der Dextrane in Tabelle 4 steht für die technische Qualität, die Zahl gibt Aufschluss über das Molekulargewicht.

Die Bestimmung der molaren Massen mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) von Icodextrin und den aufgeführten Dextranen wurde an der FSU Jena durchgeführt. Als Kalibrierungsstandard wurde für die Dextrane Dextran, für Icodextrin Pullulan verwendet. Die Messung erfolgte in Wasser/ NaNO_3 / NaN_3 .

Die verwendeten Dextrane wurden bezüglich ihrer gewichtsmittleren molarer Masse so gewählt, dass sie einen großen Bereich von 1200 bis 66000 g/mol abdecken, in dem auch das Icodextrin (16600 g/mol) zu finden ist

Tabelle 4: Modellsubstanzen (osmotische Agenzien) für UF-Versuche im 1-Poren-Modell

Substanz	M _n [g/mol]	M _w [g/mol]	PDI	Hersteller
Glucose	180	180	1	Roquette GmbH
Icodextrin	6142	16626	2,71	Roquette GmbH
Dextran T1	884	1166	1,32	Pharmacosmos A/S
Dextran T3.5	2300	3973	1,73	Pharmacosmos A/S
Dextran T5	3307	4887	1,48	Pharmacosmos A/S
Dextran T10	6469	10227	1,58	Pharmacosmos A/S
Dextran T60	41537	66328	1,60	Pharmacosmos A/S

Die verwendeten Dextrane von Pharmacosmos A/S sind verzweigte Polysaccharide, welche fermentativ mit Hilfe des Bakterienstammes *Leuconostoc mesenteroides* B512F aus saccharosehaltigem Medium hergestellt werden. 95% der Glucosemoleküle sind über α -1,6-Bindungen miteinander verknüpft, 5% über α -1,3-Bindungen, wobei die Verzweigung eine bis zwei Glucoseeinheiten lang sein kann (siehe Abbildung 20). Durch eine säurehydrolytische Behandlung sowie anschließender Fraktionierung und Reinigung können die gewünschten Molmassen hergestellt werden.^{[61],[62]}

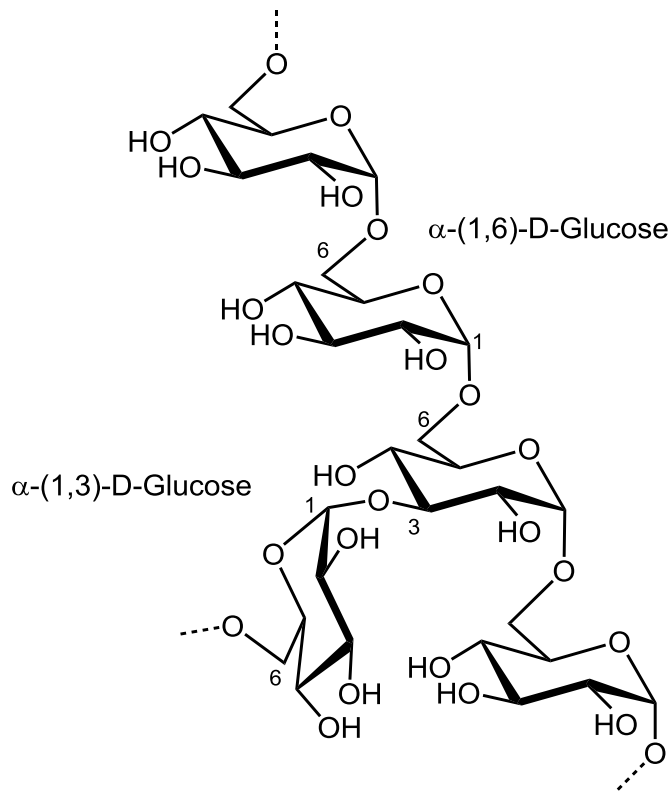


Abbildung 20: Ausschnitt der chemischen Struktur von Dextranen

Dextrane werden als biokompatibel eingestuft und sind wasserlöslich, wobei die Löslichkeit mit steigender molarer Masse abnimmt. Sie werden unter anderem in kolloidalen Infusionslösungen eingesetzt. Man unterscheidet bei kolloidalen Infusionslösungen zwischen Plasmaexpander und Plasmaersatzmittel. Bei Plasmaersatzmitteln entspricht der kolloidosmotische Druck der Infusionslösung dem des Plasmas. Bei Plasmaexpander, wozu auch die eingesetzten Dextrane (molare Masse von 40000 g/mol bzw. 70000 g/mol) gehören, ist der kolloidosmotische Druck höher als im Blutplasma, wodurch Flüssigkeit aus dem Extrazellulärraum in die Blutgefäße aufgenommen wird. Je nach molarer Masse besitzen Dextrane unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften. Dextrane werden im menschlichen Organismus von Dextranasen abgebaut, sodass die Verweilzeit mit steigender molarer Masse zunimmt.^[63]

Außerdem werden neben den alternativen osmotischen Agenzien noch weitere Modellsubstanzen, kolloidosmotische Substanzen eingesetzt. Kolloidosmotische Substanzen sind in den Experimenten im Außenmedium notwendig, um den kolloidosmotischen Druck im Blutplasma zu simulieren.

Neben höhermolekularen Dextranen werden hier Hydroxyethylstärke (HES) sowie Bovines Serum Albumin (BSA, Rinderalbumin) verwendet.

Die kolloidosmotische Substanzen, deren zahlenmittlere bzw. gewichtsmittlere molare Massen M_n bzw. M_w und deren Polydispersitätsindex (PDI), sowie Hersteller sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die Bestimmung der molaren Massen von Hydroxyethylstärke wurde mittels GPC an der FSU Jena durchgeführt. Als Kalibrierungsstandard wurde Dextran verwendet. Die Messung erfolgte in Wasser/ NaNO_3 / NaN_3 .

Tabelle 5: Modellsubstanzen (kolloidosmotische Substanzen) für UF-Versuche im 1-Poren-Modell

Substanz	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	PDI [-]	Hersteller
HES (50/0,2)	17281	37172	2,15	Fresenius Kabi AG
Dextran T60	41537	66328	1,60	Pharmacosmos A/S
Albumin Fraction V	66463	66463	1	Carl Roth

Hydroxyethylstärken werden ebenfalls als kolloidale Volumenersatzmittel eingesetzt. Sie werden hauptsächlich aus Kartoffel- oder Getreidestärke gewonnen und besitzen somit von Natur aus einen hohen Gehalt an Amylopektin, die Glukosemoleküle sind also über α -1,4-Bindungen miteinander verknüpft (siehe Abbildung 21). Es erfolgt eine Salzsäurehydrolyse, um die Stärke auf die gewünschte molare Masse zu spalten sowie eine Hydroxyethylierung. Die Hydroxyethylierung erhöht die Wasserlöslichkeit des Polymers und verhindert den schnellen Abbau durch körpereigene Amylasen. Die Abkürzung bei der verwendeten Substanz HES (50/0,2) bedeutet, dass die molare Masse bei ca. 50 kDa liegt und der durchschnittliche Substitutionsgrad bei ca. 20%.^{[63],[64],[65]}

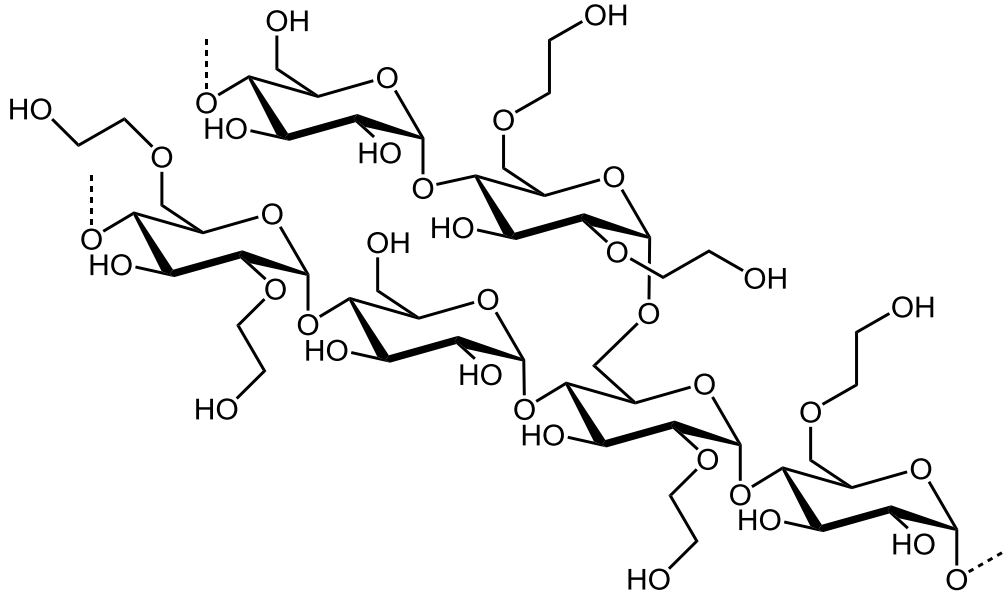


Abbildung 21 Ausschnitt der chemischen Struktur von HES mit variablen Substitutionsmuster

Um den kolloidosmotischen Druck in den UF-Versuchen im Außenmedium zu simulieren, wurde des Weiteren BSA (bovine serum albumin, Rinderalbumin, Fraction V) von Carl Roth verwendet. BSA wird im Labor häufig als Proteinstandard verwendet. BSA besitzt wie Humanalbumin eine molare Masse von 66,5 kDa. Albumin gehört zur Gruppe der Plasmaproteine und verfügt über die folgenden biologischen Funktionen. Es erzeugt ca. zwei Drittel des kolloidosmotischen Druckes im Blutplasma, trägt zur Pufferkapazität aufgrund seines ampholytischen Charakters bei und wirkt beim Transport von verschiedenen Substanzen wie z.B. Fettsäuren, Hormonen oder Pharmaka mit.^[66]

Albuminhaltige Lösung wird, wie dextranhaltige oder hydroxyethylhaltige Lösung, in der Medizin als kolloidale Plasmaersatzlösung eingesetzt.^[67] Das in dieser Arbeit verwendete BSA wird aus frischem Rinderplasma nach der Cohn-Fraktionierung hergestellt. Hierbei wird in der Plasmalösung schrittweise bei niedriger Temperatur die Ethanolkonzentration erhöht und dadurch die verschiedenen Blutplasmae Proteine abgetrennt. In der letzten Fraktion bei diesem Verfahren wird Albumin abgetrennt und anschließend aufgereinigt.^[68]

4.1.3 Alternative osmotische Agenzien von der FSU Jena

Mit Hilfe des *in vitro* Testsystems A (1-Poren Modell) werden des Weiteren verschiedene stärkebasierte Glukosepolymere bezüglich ihres UF-Verhalten getestet. Die Testsubstanzen stammen aus einer Kooperation zwischen der Friedrich Schiller Universität (FSU) Jena, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Th. Heinze sowie dem Doktoranden Herrn Dipl.-Chem. R. Hampe (RH). Die Kooperation über das Forschungsprojekt „Entwicklung von Wirkstoffen auf Basis von Polysacchariden für pharmazeutische Lösungen“ wurde zwischen FMC D GmbH und FSU Jena im Jahre 2011 gestartet.

Polysaccharide können sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes, ihrer molekularen Struktur sowie dem Verzweigungsgrad unterscheiden. Das Glukosepolymer Icodextrin, welches bereits in Peritonealdialyselösungen eingesetzt wird, ist ein stärkebasiertes Polymer. Die Verknüpfung der Glukosemoleküle erfolgt im Gegensatz zu den Dextranen über α -1,4 und α -1,6 Bindungen. Der Fokus der Kooperation mit der FSU Jena liegt ebenfalls auf stärkebasierten Polymeren, wobei verschiedene Eigenschaften der Stärken und Stärkederivaten variiert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Stärken auf das UF-Verhalten analysiert, welche sich hinsichtlich ihrer molarer Masse, ihres Stärkeursprung somit auch Amylosegehaltes und ihrer Derivatisierung unterscheiden.

Für die UF-Versuche wurden Stärken mit unterschiedlichem Ursprung zur Verfügung gestellt, dazu zählen zwei industriell abgebaute Tapiokastärken (K4484 und Crystal Tex 626), Markerbensenstärke, Kartoffelstärke, Maisstärke, amylosereiche Stärke Hylon VII sowie amylosearme Stärke Amiocapowder.

Verschiedene Stärkederivate wurden bereits in früheren Arbeiten auf ihre UF-Leistung getestet, hierzu zählen Stärkeacetat, Stärkepropionat, Stärkebutyrat, Stärkemethylcarbonat, Stärkeethylcarbonat, Stärke-4-(N,N,N-trimethyl-ammonium)-butyrat-chlorid und Stärkepropylphosphonat.

Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Derivatisierung die Löslichkeit der Stärken erhöht und dass das anionische Stärkepropylphosphonat eine erhöhte UF-Leistung besitzt.^[69]

Die Stärken und Stärkederivate, welche in dieser Arbeit auf das UF-Verhalten analysiert werden, besitzen einen unterschiedlichen Stärkeursprung und somit ein unterschiedliches Verhältnis zwischen Amylose- und Amylopektin und unterscheiden sich außerdem in ihrer molaren Masse. Des Weiteren werden Stärkepropylphosphonate und eine weitere anionische Stärke, Sulfoethylstärke mit unterschiedlichem Stärkeursprung und variierendem Substitutionsgrad getestet.^[69]

Tabelle 6 beinhaltet eine Übersicht, über die verschiedenen Proben, die von Robert Hampe (RH) von der FSU Jena zur Verfügung gestellt wurden. Der Tabelle ist die jeweilige Substanz sowie deren Ausgangsstärke, Substitutionsgrad (*degree of substitution*, DS), M_n und M_w sowie der daraus resultierende Polydispersitätsindex (PDI) aufgeführt. Der Substitutionsgrad der Stärkederivate wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie bestimmt und die molare Massenverteilung sowie M_n und M_w mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie in 0,1 M NaNO_3 /0,05% NaN_3 .

Tabelle 6: Übersicht über Stärken und Stärkederivate von FSU Jena.

Probe	Substanz	Ausgangsstärke	DS	M _n [g/mol]	M _w [g/mol]	PDI [-]
K4484	Stärke	Tapioka K4484	-	3321	9302	2,80
Crystal Tex 626	Stärke	Tapioka Crystal Tex 626	-	4898	16460	3,36
RH71	Abgebaute Stärke	Kartoffelstärke	-	2746	4858	1,77
RH120	Abgebaute Stärke	Kartoffelstärke	-	5698	10972	1,93
RH119	Abgebaute Stärke	Kartoffelstärke	-	7398	16992	2,30
RH148	Abgebaute Stärke	Maisstärke		5516	9870	1,79
RH161	Abgebaute Stärke	Hylon VII		2586	5839	2,26
RH154	Abgebaute Stärke	Markerbsenstärke		3797	10744	2,83
RH159	Abgebaute Stärke	Amiocapowder		3397	14366	4,23
RH177	Stärkeacetat	Hylon VII	0,17	2201	5590	2,54
RH178	Stärkeacetat	Markerbsenstärke	0,15	2553	5448	2,13
RH179	Stärkepropylphosphonat	Tapioka K4484	0,23	4770	10505	2,20
RH176	Stärkepropylphosphonat	Tapioka K4484	0,62	13319	23337	1,75
RH180	Stärkepropylphosphonat	Tapioka K4484	1,19	28847	41099	1,42
RH203	Stärkepropylphosphonat	Tapioka K4484	1,58	26264	44346	1,69
RH182	Stärkepropylphosphonat	Tapioka Crystal Tex 626	0,70	13659	25194	1,84
RH207	Stärkepropylphosphonat	Hylon VII	0,72	25826	41885	1,62
RH208	Stärkepropylphosphonat	Markerbsenstärke	0,71	18406	26225	1,42
RH195	Sulfoethylstärke	Tapioka K4484	0,20	10409	21251	2,04
RH181	Sulfoethylstärke	Tapioka K4484	0,46	11935	26800	2,25
RH204	Sulfoethylstärke	Tapioka K4484	0,68	20889	33236	1,59

4.1.4 Testlösungen für Ultrafiltrationsversuche

Um die Modellsubstanzen, bzw. die alternativen osmotischen Agenzien auf ihre Ultrafiltrationsleistung zu testen, werden diese in definierten Konzentrationen in einer standardisierten Matrix bzw. Wasser gelöst.

Die Laktat Matrix ist in ihrer Zusammensetzung und den Konzentrationen an Elektrolyten angelehnt an die Zusammensetzung einer Dialyselösung. In weiteren Versuchsreihen, um den Effekt des Puffers auf das UF-Verhalten zu analysieren, wird anstelle einer laktathaltigen Matrix eine hydrogencarbonathaltige Matrix eingesetzt. Die Herstellung der verschiedenen Matrizen ist in Kapitel 4.2.1 siehe Tabelle 8 dargestellt.

Je nach Versuchsdesign wird der pH-Wert der Testlösungen mit Hilfe von Natronlauge bzw. Salzsäure auf 6,4 eingestellt. Um das Diffusionsverhalten von Modellsubstanzen durch die Membran zu untersuchen, werden außerdem UF-Versuche durchgeführt, in welchen die Substanzen lediglich in destilliertem Wasser gelöst sind. In Tabelle 7 sind Chemikalien sowie Bezugsquellen aufgelistet, welche für die Lösungsherstellung verwendet werden.

Tabelle 7: Übersicht über verwendete Chemikalien für Testlösungen sowie dazugehörige Hersteller.

Chemikalien	Hersteller
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Chem. Fabrik Lehrte GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Macco Organiques, S.r.o.
Natriumchlorid (NaCl)	ESCO GmbH & Co. KG
Natriumlaktat-Lösung (50%ig)	Purac Biochem BV
0,1 M Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA
1 M Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA
0,1 M Salzsäure (HCl)	Merck KGaA
1 M Salzsäure (HCl)	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat	Church & Dwight

4.2 Methoden

Im Methodenteil 4.2 dieser Arbeit wird die Durchführung der Ultrafiltrationsversuche zur Bestimmung der osmotischen Aktivität von Testsubstanzen in einem *in vitro* 1-Poren-Modell beschrieben. Des Weiteren wird die Konzentration der Modellsubstanzen mit Hilfe verschiedener Methoden bestimmt.

Zu den physikalisch-chemischen Parametern zählen der Brechungsindex sowie der kristalloid- und kolloidosmotische Druck. Außerdem wird Glucose mit Hilfe einer enzymatischen Messmethode quantitativ detektiert.

4.2.1 Ultrafiltrationsversuche zur Bestimmung der osmotischen Aktivität von Testsubstanzen in einem 1-Poren-Modell

Mit Hilfe des *in vitro* 1-Poren-Modells werden Ultrafiltrationsversuche durchgeführt, um die osmotische Aktivität verschiedener Agenzien miteinander zu vergleichen. Die UF-Versuche werden jeweils dreimal durchgeführt, Mittelwerte sowie Standardabweichung bei den Auswertungen berechnet. Ein Funktionsdiagramm ist am Ende des Kapitels in Abbildung 28 schematisch dargestellt, die genauen Schritte werden im Folgenden beschrieben.

Für die Versuche werden zunächst die Testlösungen hergestellt, die Konzentrationsangabe erfolgt in Massenkonzentration [g/l] bzw. als Stoffmengenkonzentration [mol/l]. Die Testlösungen werden entweder in destilliertem Wasser, in Laktat Matrix oder in Hydrogencarbonat Matrix hergestellt. Die Zusammensetzung der Matrix ähnelt der Zusammensetzung einer Dialyselösung.^{[26],[27]} Die Konzentration der Elektrolyte ist Tabelle 8 zu entnehmen. Der pH-Wert der Laktat Matrix liegt bei ca. 6,4, der der Hydrogencarbonat Matrix bei ca. 7,4.

Tabelle 8: Übersicht über Zusammensetzung der Laktat und Hydrogencarbonat Matrix.

Elektrolyt	Laktat Matrix c [mmol/l]	Hydrogencarbonat Matrix c [mmol/l]
Na ⁺	138,0	134,0
Ca ²⁺	1,0	1,75
Mg ²⁺	0,5	0,5
Cl ⁻	106,0	104,5
Laktat ⁻	35,0	-
HCO ₃ ⁻	-	34,0

Je nach Versuchsreihe wird der pH Wert der Lösungen auf 6,4 +/- 0,1 mit Hilfe von Natronlauge oder Salzsäure eingestellt. Die Testlösungen mit den Modellsubstanzen der FSU Jena werden vor den UF-Versuchen zusätzlich bei 121 °C für eine Stunde autoklaviert und der pH-Wert nach der Hitzesterilisation auf 6,4 eingestellt. Es wird von den verwendeten Versuchslösungen die Dichte bestimmt, da dieser Wert für die Berechnung der prozentualen Volumenzunahme für die Ergebnisauswertung notwendig ist.

Vor Versuchsbeginn muss das gewünschte Außenmedium, destilliertes Wasser, Laktat- oder Hydrogencarbonat Matrix in Bechergläser abgefüllt (450 g(+/- 1 g)), mit Uhrglasschalen abgedeckt und in einem auf 38 °C temperiertem Wasserbad für ca. 30 Minuten temperiert werden. Das Außenmedium in den Bechergläsern wird somit auf maximal 38 °C erwärmt, somit soll die menschliche Körpertemperatur im Rahmen der UF-Versuche simuliert werden.

Für die Versuche müssen die Dialysemembranen mit dem gewünschten MWCO zunächst auf eine Länge von 12,8 cm zugeschnitten werden. Die Membranfläche, abzüglich der Verschlussklammern entspricht ca. 100 cm², durch ein Füllvolumen von 450 g in einem hohem 500 ml Becherglas ist während dem UF-Versuch die komplette Membranfläche mit Flüssigkeit benetzt. Die Dialysemembran muss vor dem Versuch mit destilliertem Wasser durchspült werden und mindestens 1 h in destilliertem Wasser gelagert sein, um das in der Lagerflüssigkeit enthaltene Ethanol zu entfernen.

Zum Befüllen der Membrankammern, werden diese an einer Seite mit einer Klammer verschlossen, die vorbereitete Testlösung mit Hilfe einer Vollpipette mit dem gewünschten Volumen in die sich ergebene Kammer der Dialysemembran gefüllt, Luftblasen aus dem Membrankammer entfernt und ebenfalls mit einer Klammer verschlossen. Am Ende einer der beiden Klammern ist ein Schwimmer integriert, am Ende der anderen Klammer ein Magnetrührfisch als Beschwerungsstäbchen, um somit eine höchstmögliche Kontaktfläche zum Außenmedium zu erhalten (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: Versuchsmembran mit Testlösung.

Vor dem Versuchsstart wird ein Becherglas mit entsprechendem Außenmedium gefüllt, um die gefüllte Dialysemembran vor Versuchsbeginn einzutauchen und mit Außenmedium zu benetzen. Die benetzte Schlauchmembran wird mit einem Papiertuch abgetupft, das Startgewicht notiert, die Membran in das vorbereitete temperierte Becherglas gegeben und die Stoppuhr gestartet.

Dieser Schritt vor dem eigentlichen Versuchsstart ist notwendig, um die Gewichtszunahme aufgrund der osmotischen Leistung zu erfassen. Ohne vorheriges Benetzen der Membran würden die Ergebnisse zu stark von nicht benetzten Membranen abweichen.

Das Gewicht der gefüllten Schlauchmembranen wird standardmäßig nach 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 und 24 h nach dem gleichen Prinzip in gleicher Reihenfolge bestimmt, um somit die Gewichtsverläufe über die Zeit zu erhalten. In einer Versuchsreihe mit variierendem Testvolumen wird zusätzlich das Gewicht nach 6, 7, und 8 Stunden bestimmt, um in diesem Bereich weitere Messpunkte zu erhalten. In Abbildung 23 ist der Aufbau des *in vitro* Testsystems A (1-Poren-Modell) dargestellt.

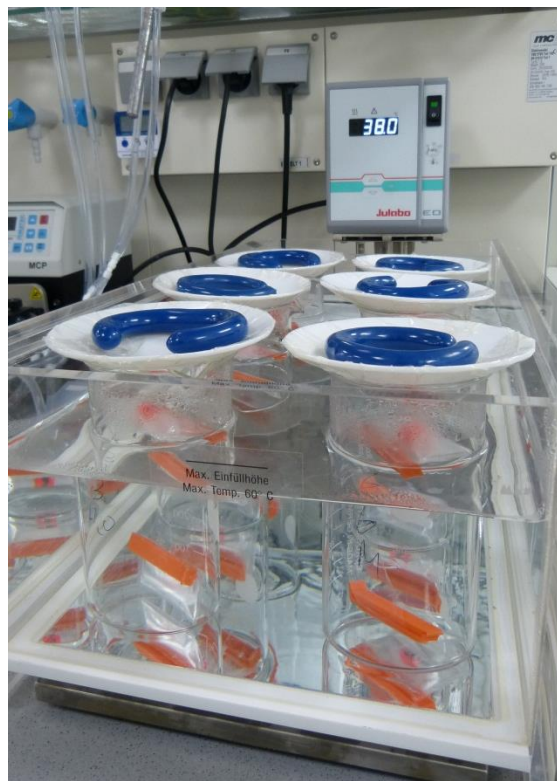


Abbildung 23: Versuchsaufbau *in vitro* Testsystem A.

Um in der Versuchsauswertung die Ergebnisse der prozentualen Volumenzunahme über die Zeit aufzutragen, ist es notwendig die Dichte der Testlösungen zu bestimmen und diese in der Versuchsauswertung miteinzubeziehen. Die Bestimmung der Dichte erfolgt an einem Dichtemessgerät (DMA 4500M, Anton Paar). Es werden ca. 10 ml Testvolumen benötigt, welche mit Hilfe einer Spritze ohne sichtbare Luftblasen über die Einfüllvorrichtung eingespritzt werden.

Bei bekannter Dichte der Testlösung, bekannter Massenänderung der gefüllten Versuchsmembranen über die Zeit und bekanntem Startvolumen, kann dann die prozentuale Volumenzunahme wie folgt berechnet werden.

Die Gewichtszunahme (Δm) ist die Differenz zwischen Anfangsgewicht (m_0) und Gewicht zum Zeitpunkt x (m_x) (siehe Gleichung 21).

$$\Delta m = m_x - m_0$$

Gleichung 21

Δm	Massenänderung [g]
m_x	Masse zum Zeitpunkt x [g]
m_0	Masse zum Zeitpunkt 0 (Versuchsbeginn) [g]

Die Massenänderung (Δm) kann bei bekannter Dichte, unter der Annahme, dass sich die Dichte über die Versuchsdauer konstant verhält, in die Volumenzunahme (ΔV) umgerechnet werden (siehe Gleichung 22).

$$\Delta V = \frac{\Delta m}{\rho}$$

Gleichung 22

ΔV	Volumenzunahme [ml]
ρ	Dichte [g/ml]

Die prozentuale Volumenzunahme ($\Delta V[\%]$) kann mit Hilfe des Startvolumens (V_0) und berechneter Volumenzunahme (ΔV) bestimmt werden (siehe Gleichung 23).

$$\Delta V[\%] = \frac{\Delta V}{V_0} \cdot 100$$

Gleichung 23

$\Delta V [\%]$	Volumenzunahme [%]
V_0	Volumen zum Zeitpunkt t_0 [ml]

4.2.2 Bestimmung von Konzentrationen verschiedener Substanzen über den Brechungsindex

Über den Brechungsindex lässt sich die Konzentration von Substanzen in Testlösungen bestimmen. Die Konzentrationsbestimmung kann von Testlösungen in Wasser sowie in Matrixlösung durchgeführt werden. Die Messung erfolgt an einem Refraktometer (DR-6300-T, A.KRÜSS Optronic). Die Messung beruht auf dem Prinzip der Totalreflexion, wobei ein Lichtstrahl auf dem Weg von einem optisch dichteren zu einem optisch dünneren Medium einen Grenzwinkel überschreitet und somit total reflektiert wird. (siehe Abbildung 24). Für die Messung wird eine LED-Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 589 nm (Natrium-D-Linie) und ein Glasprisma (optisch dichtere Medium) mit bekanntem Brechungsindex verwendet.

Bei bekanntem Einfallswinkel und bekanntem Brechungsindex des Glasprismas kann der Reflektionswinkel bestimmt und somit der Brechungsindex errechnet werden. Der Brechungsindex ist eine temperatur- und konzentrationsabhängige Größe und ist substanzspezifisch.^{[70],[71]}

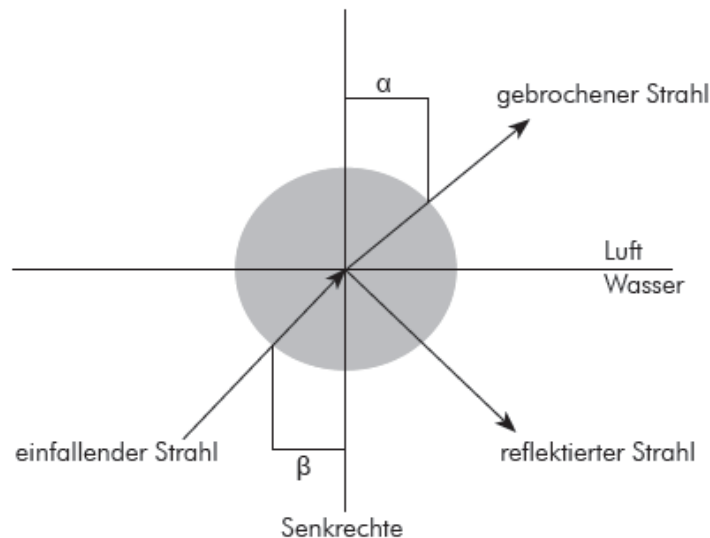


Abbildung 24: Prinzip der Totalreflexion am Refraktometer.

Für die Messung werden 250 µl mit einer Pipette in das Refraktometer gegeben. Die Messung findet temperiert bei 25 °C statt, es wird geräteintern aus zehn Messungen der Mittelwert bestimmt und ausgegeben. Die Messung wird standardmäßig dreimal durchgeführt, Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt für die Untersuchung des Permeationsverhaltens von osmotischen Agenzien durch die Membran über die Zeit (Diffusionsversuche). Um die Konzentration einer Substanz über ihren Brechungsindex bestimmen zu können, muss eine Kalibriergerade erstellt werden. Hierzu wird aus einer Stammlösung (5%) durch 1:2-Verdünnungen eine Verdünnungsreihe (2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%) erstellt, jeweils der Brechungsindex gemessen und aus den Ergebnissen eine Kalibriergerade erstellt. Anhand des gemessenen Brechungsindex lässt sich dann über die Gleichung der Kalibriergeraden die Konzentrationen in den Testlösungen bestimmen.

4.2.3 Bestimmung der Osmolalität

Die Messung der Osmolalität von Testlösungen wird mit Hilfe eines Osmometers (OSMOMAT 030, Gonotec GmbH) durchgeführt und dient der Bestimmung des kristalloidosmotischen Druckes der Versuchslösungen. Bei dem Anteil des kristalloidosmotischen Druck handelt es sich um eine rein kolligative Stoffeigenschaft, die nur abhängig ist von der Teilchenanzahl. Zur Bestimmung nutzt man die Gefrierpunktserniedrigung, um daraus die Osmolalität zu berechnen. Der Wert der Osmolalität gibt die Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen pro Kilogramm Lösungsmittel wieder, die Einheit ist daher osmol/kg.

Das Messprinzip beruht auf der Gefrierpunktserniedrigung, wobei Wasser unter Normalbedingungen (273,15 K; 1013,25 mPa) einen Gefrierpunkt von 0 °C, eine Lösung mit einer Salzkonzentration von 1 osmol/kg einen Gefrierpunkt von -1,858 °C aufweist. Für die Berechnung wird Gleichung 24 verwendet.

$$c_{osmo} = \frac{\Delta T}{K}$$

Gleichung 24

c_{osm}	Osmolalität [osmol/kg]
ΔT	Temperaturdifferenz (Gefrierpunktserniedrigung) [°C]
K	1,858 °C·kg/osmol Kryoskopische Konstante

Die Probelösung wird bei der Messung mit einem Peltier-Kühlsystem abgekühlt und elektronisch überwacht. Erreicht die Lösung eine Temperatur deutlich unterhalb des Gefrierpunktes, so wird die Kristallisation durch Eiskristalle an einer Edelstahlnadel ausgelöst. Die Temperatur steigt dann auf die Kristallisationstemperatur an (Gefrierpunkt, Umkehrpunkt) und wird dann gemessen.

Aus der Temperaturdifferenz zwischen 0 °C und der Kristallisationstemperatur kann dann die Anzahl an osmotisch wirksamen Teilchen bestimmt werden (siehe Abbildung 25).

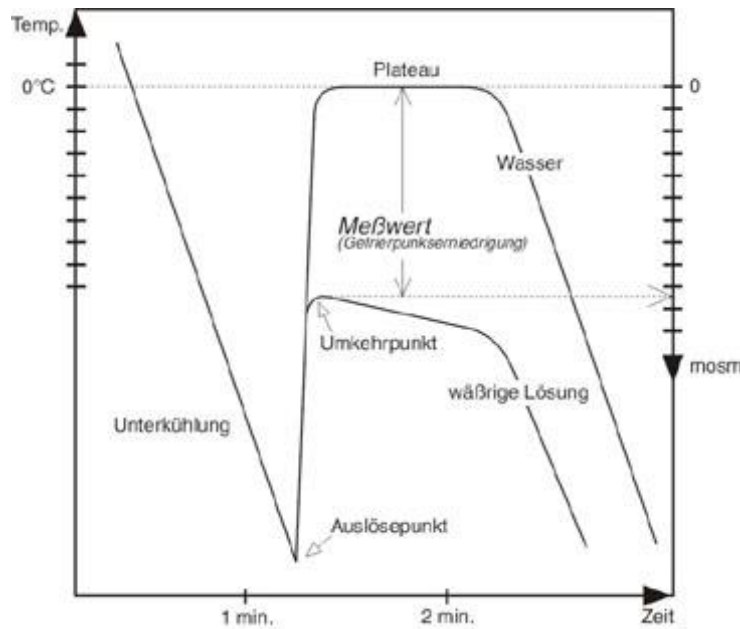


Abbildung 25: Prinzip der Gefrierpunkts erniedrigung.

Für die Messung der Osmolalität wird ein Probevolumen von 50 µl benötigt. Vor der Messung muss das Osmometer durch eine Zwei-Punkt-Kalibrierung kalibriert werden. Dazu wird destilliertes Wasser (0 mosmol/kg) und eine Kalibrierlösung mit 300 mosmol/kg verwendet. Nach der Kalibrierung erfolgt eine Zweifachbestimmung der Osmolalität mit jeweils zwei neuen Kalibrierlösungen. Mit der Messung der Testlösungen wird begonnen, sobald die Werte der Kalibrierlösungen bei 0,300 osmol/kg (+/- 0,003 osmol/kg) liegen. Für die Messung der Testlösungen müssen die Messwerte im Kalibrierbereich zwischen 0 und 300 mosmol/kg liegen, ansonsten muss mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend neu berechnet werden.^[72]

Es wird zum einen die Osmolalität der Testlösungen für die UF-Versuche bestimmt, um eine Aussage über den kristalloidosmotischen Druck treffen zu können.

Des Weiteren wird diese Messmethode im Rahmen der Diffusionsversuche von Glucose durch die Membran verwendet, um ihre Teilchenanzahl über die Versuchszeit zu bestimmen. Das Messprinzip kann bei Glukoselösungen verwendet werden, da hier nur der kristalloidosmotische Druck einen Einfluss hat.

Da die Teilchenanzahl und somit die Konzentration proportional zur Osmolalität ist, wird durch Messen der Gefrierpunktserniedrigung eine Kalibriergerade für die verschiedenen Konzentrationen (5%, 2,5%, 12,5%, 0,625%, 0,3125%) erstellt. Mit Hilfe der Kalibriergeraden kann die Konzentration in den Testlösungen bestimmt werden.

4.2.4 Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes von Substanzen mittels Membranosmometrie

Der kolloidosmotische Druck von Testlösungen wird mit Hilfe eines Onkometers (OSMOMAT 050, Gonotec GmbH) bestimmt. Ein kolloidosmotischer Druck entsteht, wenn zwei Flüssigkeitsräume durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind, wobei in einem der beiden Flüssigkeiten zusätzlich eine hochmolekulare kolloidale Substanz vorhanden ist. Um den Konzentrationsgradienten auszugleichen, findet ein Flüssigkeitstransport vom Kompartiment mit reinem Lösemittel zum Ort der kolloidalen Lösung statt. Makromoleküle wie Proteine besitzen die Fähigkeit, an ihrer Oberfläche über Wasserstoffbrückenbindungen Wassermoleküle anzulagern und somit Hydrathüllen auszubilden. Damit üben sie einen osmotischen Druck auf die Wassermoleküle in ihrer Umgebung aus.

Im medizinischen Bereich wird der kolloidosmotische Druck von Blutplasma bestimmt, um eine Aussage über den physiologischen Zustand treffen zu können.

Mit Hilfe des gemessenen kolloidosmotischen Druckes kann des Weiteren das Molekulargewicht von Modellsubstanzen bestimmt werden.

Für die Messung des kolloidosmotischen Druckes am Onkometer ist ein Probenvolumen von ca. 150 µl notwendig. Probenzelle und Referenzzelle sind durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt. Der MWCO der Membran beträgt 20 kDa, wodurch nur Wasser, Elektrolyte und niedermolekulare Substanzen die Membran passieren können. Im Grundzustand sind beide Zellen mit einer sogenannten Ringerlösung gefüllt.

Ringerlösungen gibt es in verschiedener Zusammensetzung, wobei die hier verwendete gemäß der Zusammensetzung des Handbuches OSMOMAT 050 hergestellt wurde. Wird eine kolloidale Lösung in die Probenzelle eingebracht, entsteht durch den Flüssigkeitstransport aus der Referenzzelle in die Probenzelle ein Unterdruck in der Referenzzelle. Dieser Unterdruck wird von dem Drucksensor bestimmt, elektronisch verstärkt und als kolloidosmotischer Druck über die Anzeige digital ausgegeben (siehe Abbildung 26). Die Anzeige kann in mmHg (Millimeter-Quecksilbersäule), cmH₂O (Zentimeter Wassersäule) oder kPa (Kilopascal) erfolgen.

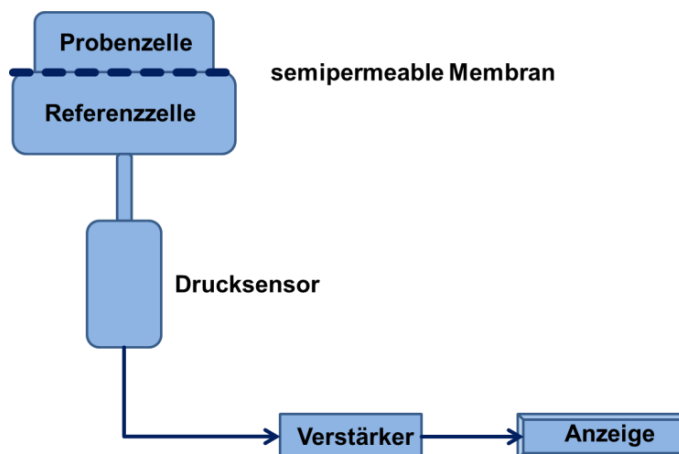


Abbildung 26: Aufbau und Messprinzip Osmomat 050.

Zur Messung des kolloidosmotischen Druckes wird die Probenlösung (150 µl) mit Hilfe einer Spezialkanüle in drei möglichst gleichmäßigen Etappen zu je 50 µl in die Probenzelle injiziert. Durch diesen Überdruck, welcher als Triggerimpuls dient, wird das Messprogramm des Onkometers gestartet.

Je nach Testlösung dauert die Messung wenige Sekunden bis zu 5 Minuten bis sich ein Gleichgewicht des osmotischen Unterdruckes in der Referenzzelle eingestellt hat.^[73]

Mit Hilfe der Messung der Testlösungen lässt sich zum einen der kolloidosmotische Druck von Modellsubstanzen bestimmen und somit eine Aussage über den *long dwell* Effekt von alternativen osmotischen Agenzien.

Die Messmethode wird außerdem im Rahmen der Diffusionsversuche verwendet, um die Konzentration von höhermolekularen Substanzen über die Zeit wie z.B. Icodextrin im Rahmen der UF-Versuche zu bestimmen. Für die Konzentrationsbestimmung wird eine Kalibriergerade ausgehend von der Stammlösung aufgenommen als Funktion des gemessenen kolloidosmotischen Druckes über die Konzentration. Mit Hilfe dieser Kalibriergerade kann dann nach Messung des kolloidosmotischen Druckes auf die Konzentration der Testlösung zurückgeschlossen werden.

4.2.5 Quantitative Bestimmung der Glukosekonzentration über die enzymatische Methode

Die Glukosekonzentration der Testlösungen kann mit Hilfe eines vollautomatisierten photometrischen Analyseautomates (GalleryTM, Fa. Thermo Scientific) bestimmt werden. Die Bestimmung beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Im ersten Reaktionsschritt wird D-Glucose durch das Enzym Hexokinase in Gegenwart von Adenosin-triphosphat (ATP) zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-diphosphat. Anschließend folgt die zweite Reaktion, die eigentliche Nachweisreaktion, in welcher Glucose-6-phosphat unter Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-dehydrogenase und Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+) zu Gluconat-6-phosphat dehydriert.

Der freiwerdende Wasserstoff wird auf NAD^+ übertragen (siehe Abbildung 27). Das gebildete NADH absorbiert Licht der Wellenlänge 340 nm und kann somit photometrisch bestimmt werden.

Die bestimmte Menge an NADH ist der Menge an D-Glucose direkt proportional, wodurch auf die Glukosekonzentration zurückgeschlossen werden kann.^[74]

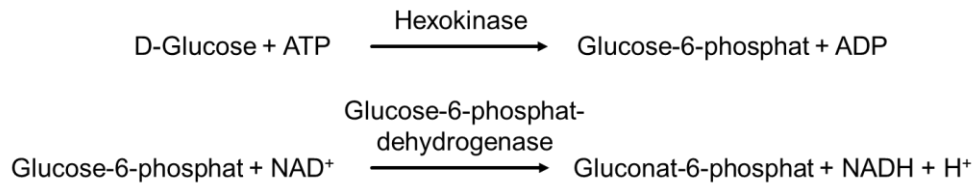


Abbildung 27: Enzymatische Testverfahren zur Glukosekonzentrationsbestimmung.

Für die Messung am Analyseautomaten ist ein Probenvolumen von 1 ml notwendig. Die Probe wird in eine Plastikvial des Analyseautomaten überführt, in die Halterung des Analysegerätes eingesetzt und im Softwareprogramm die Proben und entsprechende Verdünnungen angegeben. Zur Überprüfung werden jeweils zwei Standards in der entsprechenden Konzentration mitgemessen.

Im Softwareprogramm muss für die Proben eine geeignete interne Verdünnung angegeben werden, sodass man im Messbereich des Analysators liegt. In Vorversuchen wurde dazu die Konzentration mittels Brechungsindex bestimmt. Die Messung erfolgt vollautomatisch und die Ergebnisse der Glukosekonzentration werden nach der Messung angezeigt. Die Glukosebestimmung wird im Rahmen der Diffusionsversuche eingesetzt, um die Glukosekonzentration über die Zeit zu bestimmen und eine Aussage über die Permeation von Glukose durch die Membran treffen zu können.

Zur abschließenden Übersicht der Ultrafiltrationsversuche mit *in vitro* Testsystem A und den verwendeten Analysemethoden ist in Abbildung 28 ein Funktionsdiagramm dargestellt.

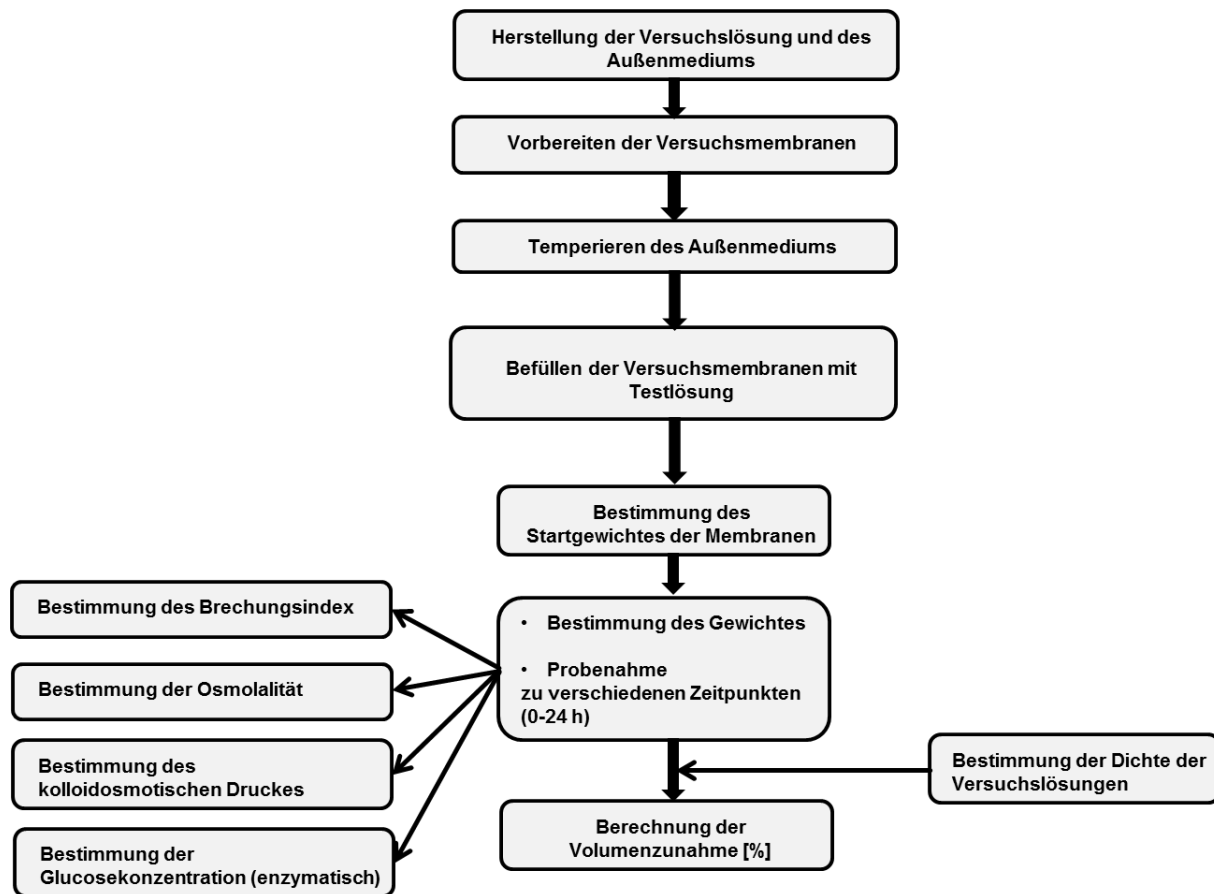


Abbildung 28: Versuchsdurchführung *in vitro* Testsystem A sowie Analysemethoden als Funktionsdiagramm.

5 Ergebnisse und Diskussion *in vitro* Testsystem A

Ergebnisse und Diskussion bezüglich *in vitro* Testsystem A sind in zwei Bereiche gegliedert. Im ersten Teil werden die Ergebnisse der UF-Versuche bezüglich Evaluierung bzw. Analyse verschiedener Einflussfaktoren in Testsystem A erläutert (Kapitel 5.1). Im zweiten Teil werden die Ultrafiltrationsergebnisse von Dextranen und alternativer osmotischer Agenzien der FSU Jena dargestellt und diskutiert (Kapitel 5.2).

5.1 Ultrafiltrationsversuche zur Evaluierung von *in vitro* Testsystem A

Zur Evaluierung von *in vitro* Testsystem A werden verschiedene Einflussfaktoren im Testsystem variiert, welche auch unter Realbedingungen im Patienten Schwankungen unterliegen können. In Abbildung 29 sind die verschiedenen Einflussfaktoren schematisch dargestellt, welche bezüglich des UF-Verhaltens in den folgenden Kapiteln analysiert werden.

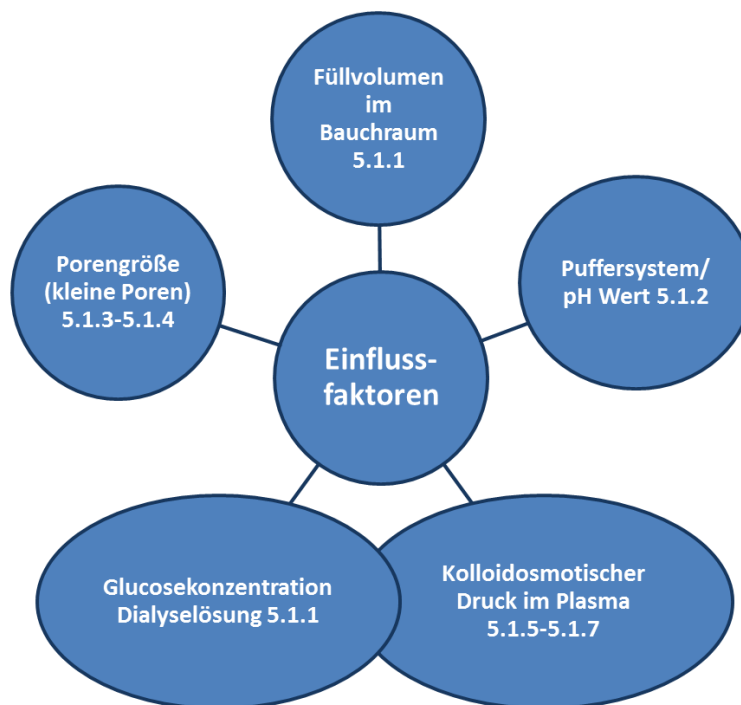


Abbildung 29: Übersicht der Einflussfaktoren zur Evaluierung von *in vitro* Testsystem A.

Hinsichtlich des Effektes einer Variation der Glucosekonzentration sowie eines Vergleichs zu einer 7,5%igen Icodextrinlösung wurden bereits in vorherigen Arbeiten UF Versuche durchgeführt.^[57] Ziel dieser Experimente war es, eine Evaluierung des *in vitro* Testsystems durchzuführen. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der damaligen experimentellen Untersuchungen dargestellt. Im Vergleich zu den simulierten UF Verläufen (siehe Abbildung 18) wird deutlich, dass der Effekt der Flüssigkeitsresorption bei Verwendung von Glucose in der damaligen Arbeit nicht experimentell mittels *in vitro* Testsystem A nachgestellt werden konnte, weshalb eine weiterführende Analyse potentieller Ursachen für die Rückfiltration in das *in vitro* Testsystem notwendig ist.

5.1.1 Ultrafiltrationsversuche mit variierendem Füllvolumen und variierender Glucosekonzentration

Um den Effekt von unterschiedlichen Füllvolumina bei der Durchführung einer PD Behandlung zu ermitteln, wurde bei den UF Versuchen das Füllvolumen in den Dialyseschläuchen variiert. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse dieser Ultrafiltrationsversuche mit 5%iger Glucoselösungen in Laktat Matrix dargestellt. Dabei wird die tatsächliche Volumenzunahme als Gewichtsänderung gegen die Zeit dargestellt.

Anhand der Ergebnisse kann man erkennen, dass das Gewicht bei einem Füllvolumen zwischen 5 und 40 ml zunächst ansteigt, wobei nach 2 bis 7 h abhängig vom Ausgangsvolumen ein Plateau erreicht wird. Es ist zu erkennen, dass die maximale Gewichtszunahme zwischen 5 und 40 ml proportional zu diesem ist. Bei einem Füllvolumen von 50 ml findet eine Flüssigkeitsaufnahme zwischen 0 und 5 Stunden statt, zwischen 8 und 24 Stunden ist jedoch eine Flüssigkeitsabgabe in Richtung Außenmedium zu verzeichnen. Man kann anhand der Ergebnisse erkennen, dass ein höheres Füllvolumen eine längere Ultrafiltrationsdauer bewirkt.

Wird jedoch die maximale Füllvolumenkapazität des Dialyseschlauches erreicht (etwa 54 ml), findet wieder ein Rückfluss der Flüssigkeit statt und das Füllvolumen nimmt wieder ab. Mögliche Ursache hierfür ist der sich aufbauende Gegendruck auf die Membran, wodurch Flüssigkeit wieder nach außen transportiert wird.

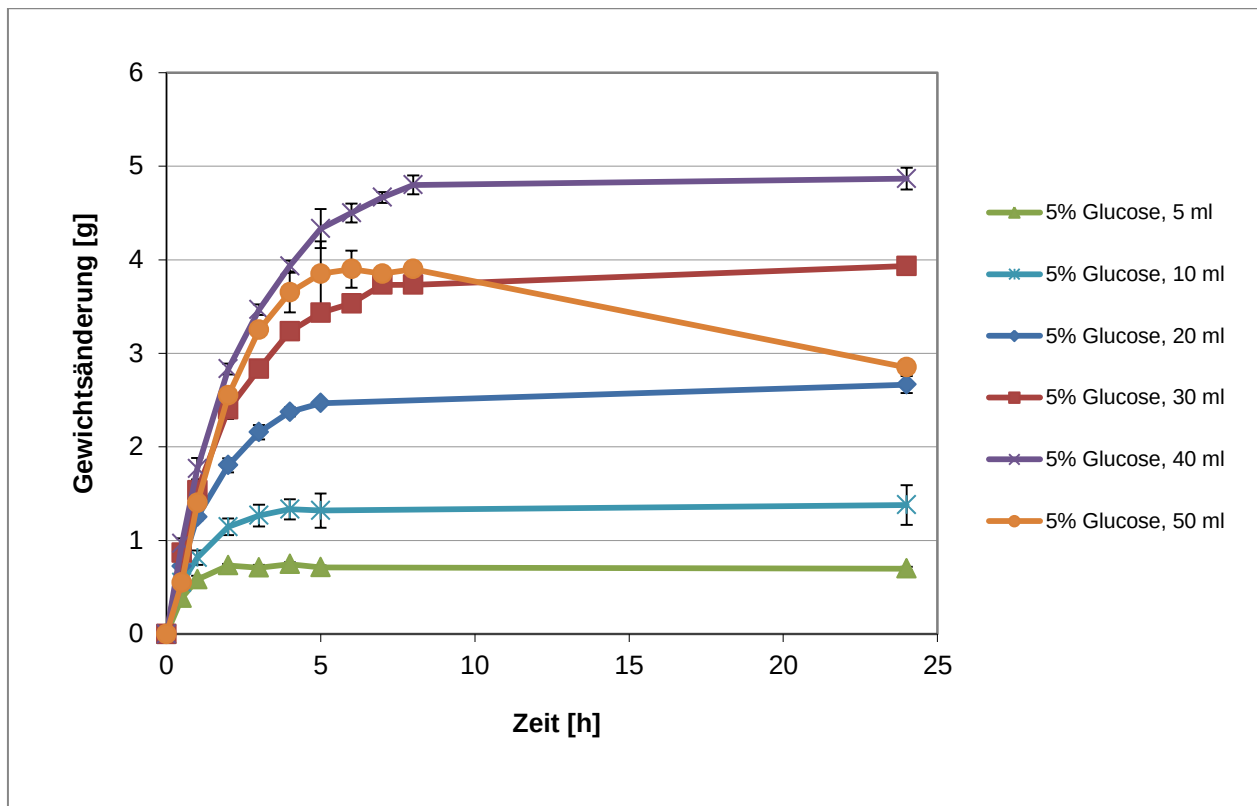


Abbildung 30: Ultrafiltrationsversuche: 1 kDa Membran; 5%ige Glucoselösung in Laktat Matrix (pH 6,4), Außenmedium Laktat Matrix; Variation im Füllvolumen (5, 10, 20, 30, 40, 50 ml).

Um diese Ergebnisse nochmals zu überprüfen, wurde eine weitere Versuchsreihe mit variierendem Füllvolumen mit 10%igen Glucoselösungen in Laktat Matrix durchgeführt. In Abbildung 31 ist die Gewichtszunahme [g] über die Zeit für die 10%igen Glucoselösungen dargestellt. Es wurde eine Füllvolumenvariation zwischen 20 und 50 ml gewählt.

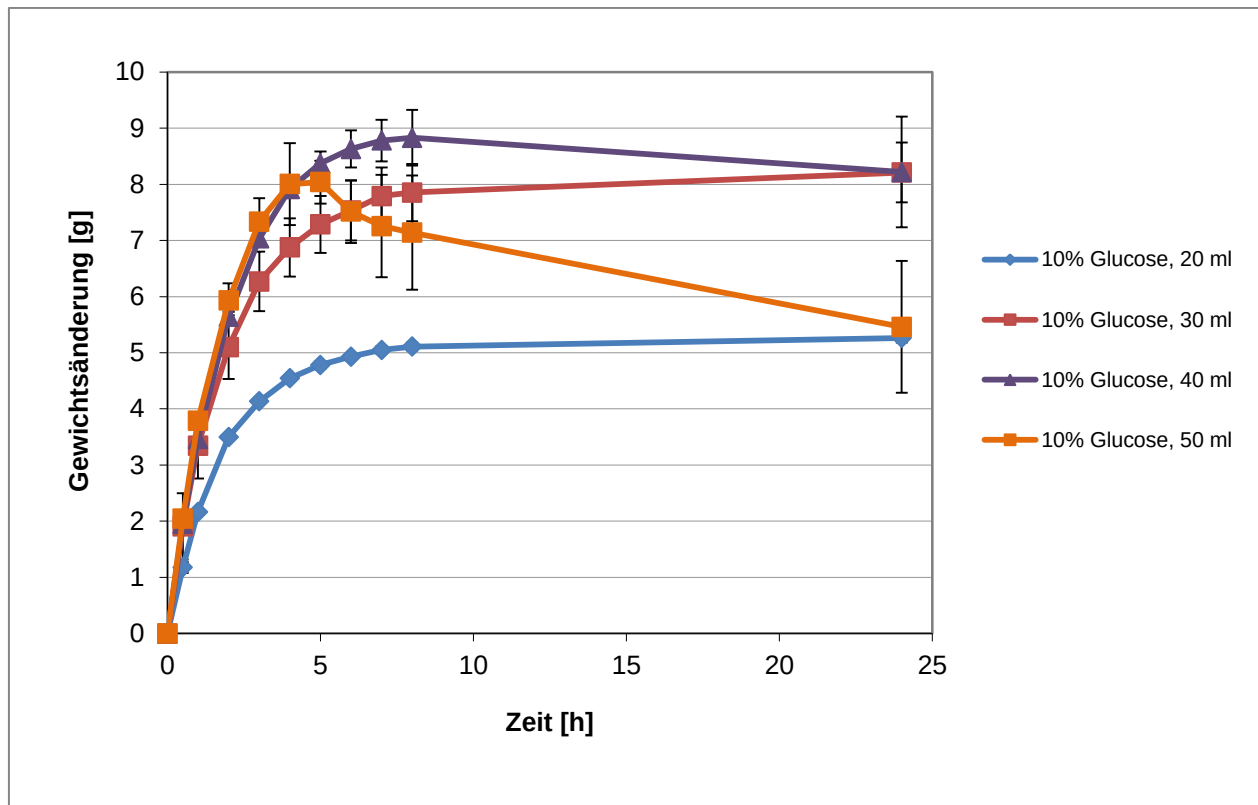


Abbildung 31: Ultrafiltrationsversuche: 1 kDa Membran; 10%ige Glucoselösung in Laktat Matrix (pH 6,4), Außenmedium Laktat Matrix; Variation im Füllvolumen (20, 30, 40, 50 ml).

Anhand von Abbildung 31 wird deutlich, dass auch hier die Gewichtszunahme, also Ultrafiltrationsleistung mit steigendem Füllvolumen zunimmt, bis die maximale Füllvolumenkapazität des Dialyseschlauches erreicht wird. Vergleicht man die absoluten Werte der Gewichtsänderung [g] von Abbildung 30 und Abbildung 31, so wird deutlich, dass bei 20 ml und 30 ml Füllvolumen durch eine Verdopplung der Glucosekonzentration eine doppelt so hohe Gewichtszunahme erzielt wird. Eine 5%ige Glucoselösung bei einem Füllvolumen von 20 ml bewirkt nach 24 h eine Gewichtszunahme von 2,7 g, eine 10%ige Glucoselösung bei gleichem Füllvolumen erzeugt nach 24 h eine Gewichtszunahme von 5,3 g. Bei der 10%igen Glucoselösung mit einem Füllvolumen von 40 ml wird zwischen 0 und 8 Stunden ebenfalls eine doppelt so hohe Gewichtsänderung erzielt, jedoch findet zwischen 8 und 24 Stunden eine geringe Flüssigkeitsresorption statt.

Bei der 10%igen Glucoselösung mit einem Füllvolumen von 50 ml wird der Effekt des Gegendruckes noch stärker deutlich als bei einer 5%igen Glucoselösung. Zwischen 0 und 5 Stunden findet Ultrafiltration in Richtung des Dialyseschlauches statt, anschließend eine noch stärkere Resorption von ca. 3,5 g Lösungsmittel, im Vergleich zu 1 g Resorption bei der 5%igen Glucoselösung.

Aufgrund der Ergebnisse wird deutlich, dass der Effekt eines sich aufbauenden Gegendruckes bei Überschreiten eines kritischen Füllvolumens eine Flüssigkeitsresorption bewirken kann. Dieser Effekt muss auch bei einer Dialysebehandlung beachtet werden, da eine mögliche Resorption von Flüssigkeit in den Patienten vermieden werden sollte.

5.1.2 UF-Versuche mit physiologischer Glucosekonzentration in der artifiziellen Plasmalösung und Variation der Matrixlösung

Zur Analyse der Einflussfaktoren der artifiziellen Plasmalösung (Außenmedium) in *in vitro* Testsystem A wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Blutplasma enthält eine konstante Glucosekonzentration von ca. 0,1%.^[75] Im ersten Schritt wurde ein vergleichender UF-Versuch mit einer sterilen 5%igen Glucoselösung (pH 6,4) in Laktat Matrix gegen Laktat Matrix durchgeführt, wobei in der zweiten Versuchsreihe 0,1% Glucose im Außenmedium enthalten war. Die Ergebnisse der prozentualen Volumenänderung der beiden Versuchsreihen gegen die Zeit sind in Abbildung 32 dargestellt.

Man kann anhand von Abbildung 32 erkennen, dass durch die 5%ige Glucoselösung eine schnelle aber nur kurz andauernde Ultrafiltration bis ca. 3 Stunden erzielt wird. Zwischen 3 bis 24 Stunden findet keine weitere Wasseraufnahme vom Außenmedium in die Dialyseschläuche statt. Vergleicht man die beiden UF Ergebnisse mit und ohne 0,1% Glucose im Außenmedium, so kann man erkennen, dass diese geringe Änderung in der osmotischen Druckdifferenz keinen Effekt auf die UF-Leistung hat.

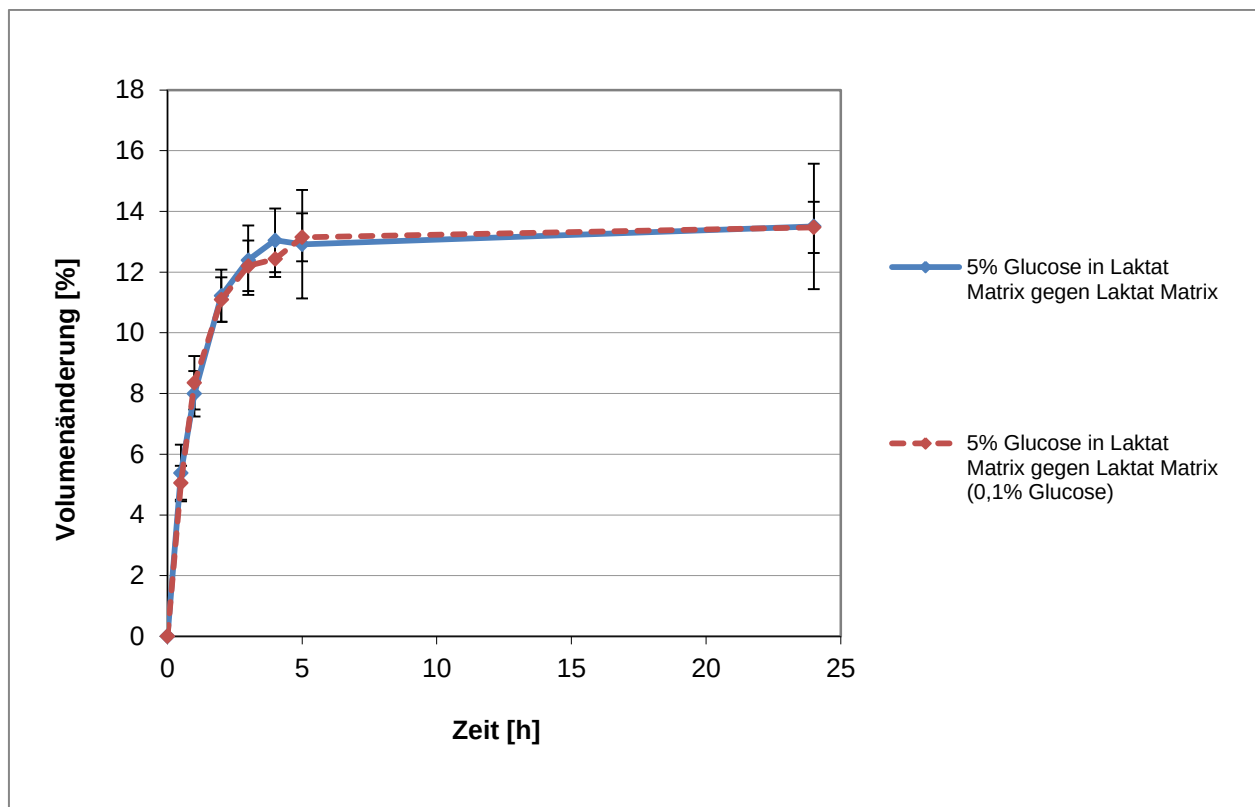


Abbildung 32: Ultrafiltrationsversuche: 1 kDa Membran; 5%ige sterile Glucoselösung in Laktat Matrix (pH 6,4), Füllvolumen 10 ml; Außenmedium Laktat Matrix mit und ohne 0,1% Glucose.

Zur Analyse des Effektes des Puffersystems wurden weitere UF Versuche mit einer artifiziellen Dialyselösung mit jeweils 5% Glucose bzw. 5% Icodextrin als osmotische Agenzien durchgeführt. Dabei wurden sowohl hydrogencarbonathaltige als auch laktathaltige Versuchslösungen eingesetzt. Als Außenmedium (Blutplasmaersatz) wurde laktathaltiges sowie hydrogencarbonathaltiges Medium mit einer physiologischen Glucosekonzentration von 0,1% verwendet. Die molare Zusammensetzung der Matrixlösungen ist Tabelle 8 zu entnehmen. Der pH Wert der Testlösungen in Laktat Matrix wurde nach der Sterilisation auf 6,4 und der hydrogencarbonathaltigen Lösungen auf 7,4 mittels Natronlauge eingestellt. In Abbildung 33 sind die Ergebnisse der prozentualen Volumenänderung über die Zeit für die verschiedenen Variationen dargestellt. In Hinblick auf die Ultrafiltrationsleistung von Glucose bzw. Icodextrin ergeben sich obwohl bei Variation der Lösungsmittel als auch bei Änderung der Plasmaersatzmedien keine großen Unterschiede.

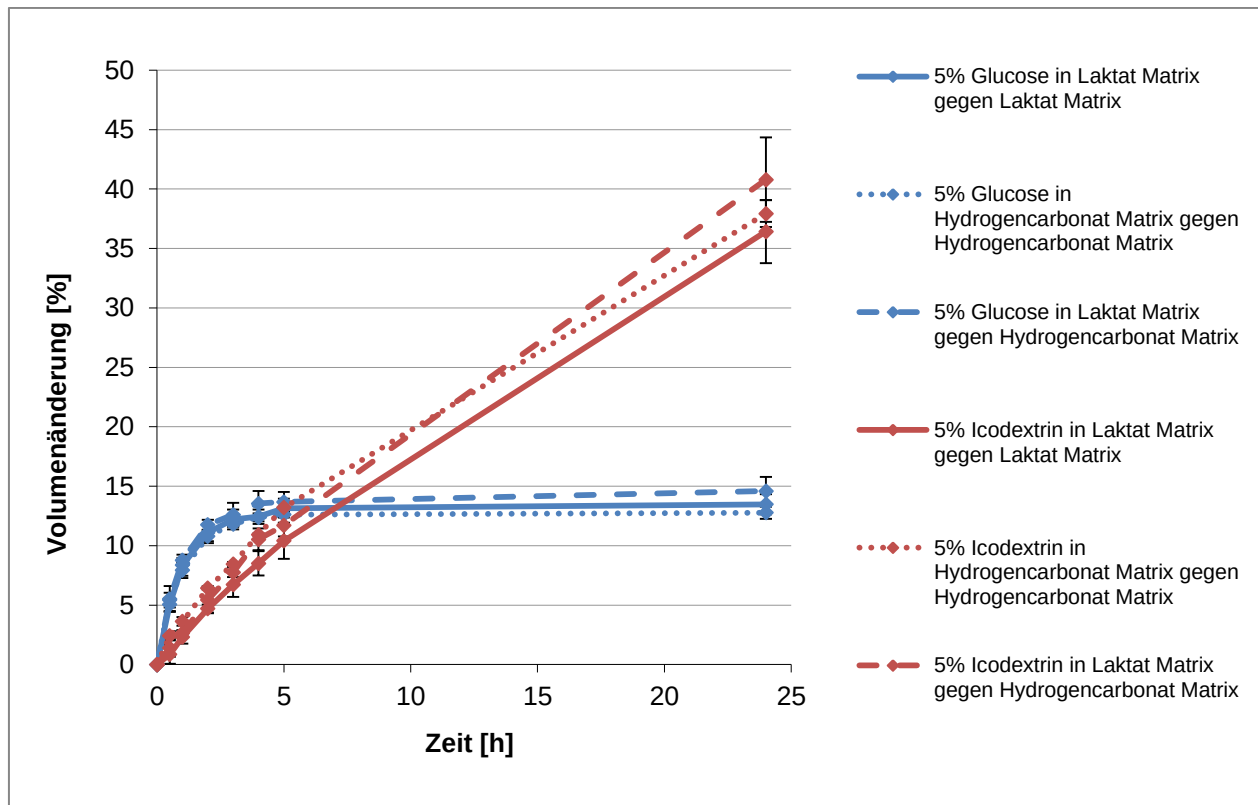


Abbildung 33: Ultrafiltrationsversuche: 1 kDa Membran; 5%ige sterile Testlösungen mit Glucose bzw. Icodextrin in Laktat (pH 6,4) bzw. Hydrogencarbonat Matrix (pH 7,4), Füllvolumen 10 ml; Außenmedium Laktat bzw. Hydrogencarbonat Matrix mit 0,1% Glucose.

5.1.3 Ultrafiltrationsversuche mit variierender Porengröße der Dialysemembran

Eine der wichtigsten Faktoren auf das Filtrationsverhalten ist die Porengröße der Membran. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 beschrieben, werden bei den Poren der Blutgefäße gemäß 3-Poren Modells zwischen Aquaporinen, kleinen und großen Poren unterschieden. Für die Ultrafiltration und den Transport von niedermolekularen Substanzen sind je nach osmotischem Agens die Aquaporine und kleinen Poren besonders wichtig. In Abbildung 34 ist das Filtrationsspektrum mit den jeweiligen Filtrationsverfahren und Porengrößen in Mikrometer bzw. Ångström dargestellt.

Aquaporine liegen mit einem Porendurchmesser von 10 Å bzw. 200 Da im Bereich der Umkehrosmose bzw. Nanofiltration und kleine Poren mit einem Durchmesser von ca. 100 Å bzw. 20 kDa im Bereich der Ultrafiltration.

In vorherigen Arbeiten wurden Membranen mit einem MWCO von 1 kDa als Ultrafiltrationsmembran gewählt, um somit im mittleren Bereich der beiden wichtigsten beteiligten Porenarten zu liegen (siehe Abbildung 34).^[57] Im Rahmen dieser Arbeit soll nun der Stofftransport über die kleinen Poren mit Hilfe von *in vitro* Testsystem A analysiert werden und in einem zweiten Schritt mit *in vitro* Testsystem B die Ultrafiltration über eine Aquaporinmembran.

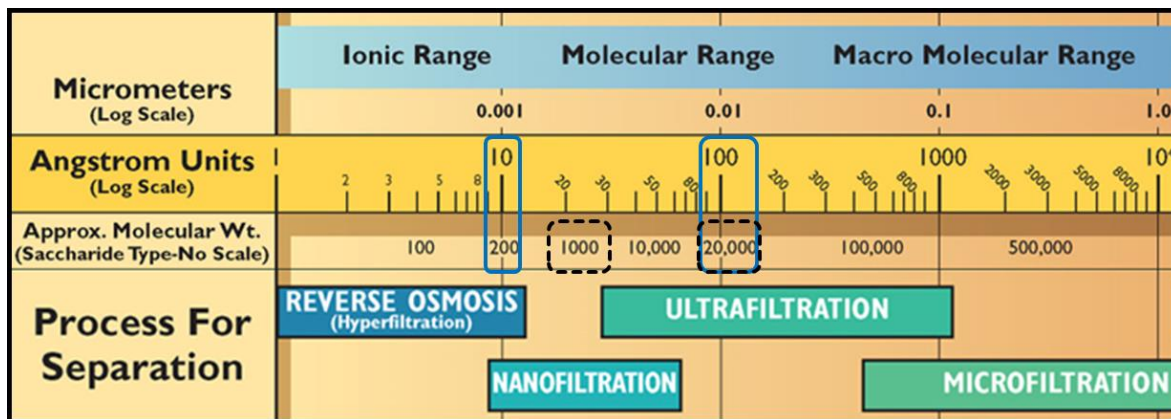


Abbildung 34: Filtrationsspektrum.^[57]

Für die Durchführung der UF Versuche mit den beiden kommerziell erhältlichen osmotischen Agenzien Glucose und Icodextrin wurde eine regenerierte Cellulosemembran mit einem MWCO von 25 kDa gewählt, um somit laut Filtrationsspektrum (siehe Abbildung 34) im Größenbereich der kleinen Poren der Blutgefäße zu liegen.

In Abbildung 35 ist die prozentuale Volumenänderung gegen die Zeit für 5%ige Glucose- und Icodextrinhaltige Lösungen in Laktat Matrix dargestellt. Die Dialysemembranen besitzen einen MWCO von 25 kDa (gestrichelte Linie) und als Vergleich 1 kDa (durchgezogene Linie).

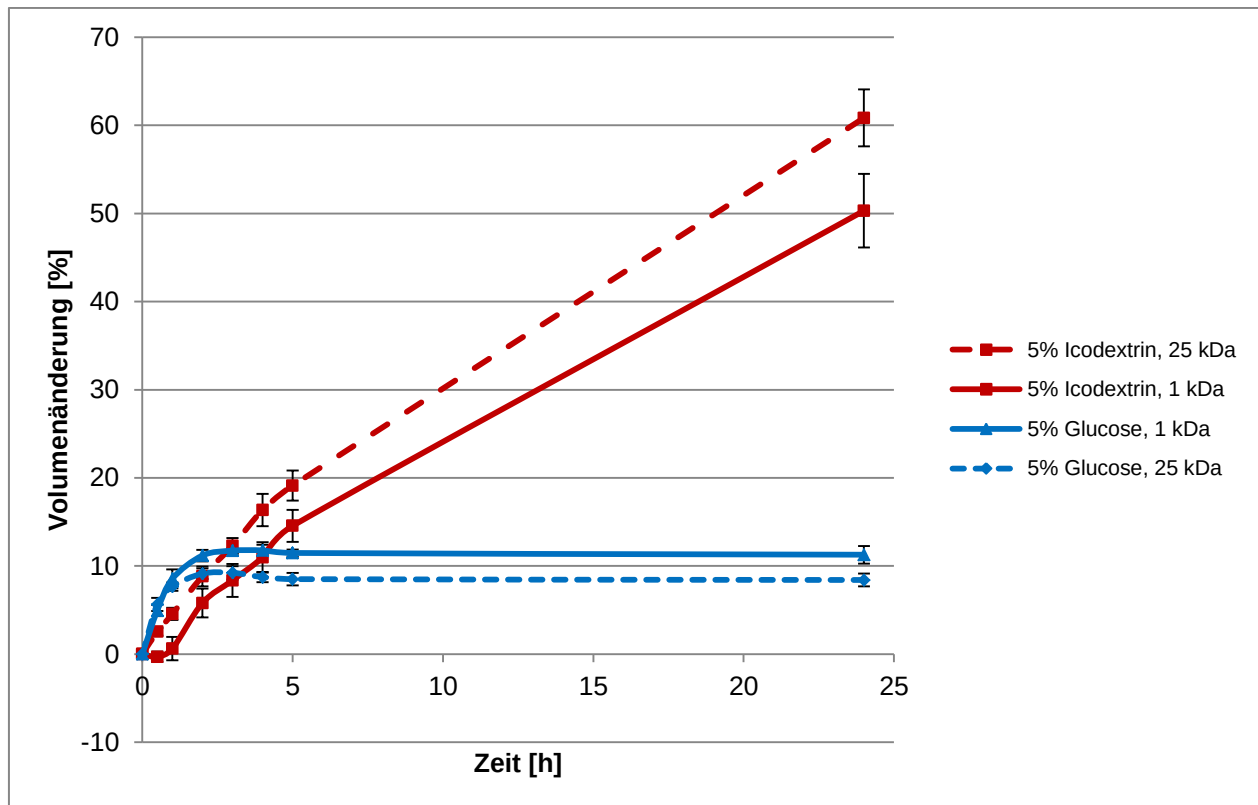


Abbildung 35: Ultrafiltrationsversuche: 5%ige Testlösungen mit Glucose bzw. Icodextrin in Laktat Matrix; Füllvolumen 10 ml; Außenmedium Laktat Matrix; Variation der Dialysemembran (1 kDa und 25 kDa).

Vergleicht man die UF Verläufe der beiden 5%igen Glucoselösungen mit den unterschiedlichen Membranen, so wird deutlich, dass bei Verwendung einer 25 kDa Membran eine etwas geringere prozentuale Volumenzunahme erreicht wird, als bei einer 1 kDa Membran. Die maximale Volumenzunahme wird bei einer 1 kDa Membran nach ca. 3 bis 4 Stunden erreicht, bei einer 25 kDa Membran bereits nach 2 bis 3 Stunden.

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass der Reflektionskoeffizient von Glucose an einer 25 kDa Membran geringer ist, als an einer 1 kDa Membran, Glucose somit leichter durch die Membran permeiert, wodurch die osmotische Druckdifferenz schneller abnimmt. Diese Annahme wird in einer weiteren Versuchsreihe im Rahmen der Permeationsversuche genauer untersucht.

Betrachtet man die prozentualen Volumenzunahmen der 5%igen Icodextrinlösung an den beiden verwendeten Membranen, so lässt sich bei der 25 kDa Membran eine deutlich höhere prozentuale Volumenzunahme im Laufe der 24 h Versuchszeit feststellen, als bei einer 1 kDa Membran.

Ein möglicher Grund für die höhere UF an der 25 kDa Membran, könnte die höhere hydraulische Leitfähigkeit der Membran im Vergleich zu einer 1 kDa Membran sein. Unter der Annahme eines gleichen Reflektionskoeffizienten für beide Membranen wäre die UF Leistung bei einer Membran mit einer höheren hydraulischen Leitfähigkeit, bei sonst gleichen Versuchsbedingungen, höher.

Aus diesem Grund wurde in einer weiteren Versuchsreihe überprüft, wie sich die Konzentrationen einer Icodextrinlösung in Wasser unter Verwendung einer 1 kDa Membran sowie einer 25 kDa Membran nach 24 h unterscheiden. Die Berechnung erfolgte anhand des Brechungsindex. Es wurde bei der 1 kDa Membran eine Volumenzunahme von 5 ml festgestellt und eine Konzentration von 2,81% bestimmt, bei einer 25 kDa Membran eine Volumenzunahme von 7,1 ml und eine Konzentration nach 24 h von 2,19%. Berechnet man bei beiden Versuchen die Konzentration in der Versuchsmembran ohne die Verdünnung, so erhält man bei der 1 kDa Membran eine Konzentration von 4,22% und bei der 25 kDa Membran eine Konzentration von 3,74%. In beiden Versuchen ist auch nach 24 h eine hohe Restkonzentration an Icodextrin vorhanden, bei Verwendung einer 25 kDa Membran jedoch eine leicht geringere. Der Effekt des geringeren Widerstandes bzw. der höheren hydraulischen Leitfähigkeit überwiegt also den Effekt des etwas stärker abnehmenden osmotischen Druckes bei der 25 kDa Membran.

Man kann jedoch sowohl bei den Versuchen mit einer 1 kDa als auch 25 kDa Membran für beide Modellsubstanzen die typischen Eigenschaften in *in vitro* Testsystem A erkennen. Glucose erzeugt eine schnelle aber nur kurze Ultrafiltration (hoher *short dwell* Effekt), Icodextrin bewirkt eine langsame aber langanhaltende Ultrafiltration (hoher *long dwell* Effekt).

5.1.4 Diffusionsversuche mit variierender Porengröße der Dialysemembran

Zur Untersuchung des Stofftransportes von osmotischen Agenzien durch die Membran und die damit verbundene osmotische Aktivität im Rahmen der Ultrafiltrationsversuche wurden Diffusionsversuche mit Glucose mit variierender Porengröße der Dialysemembran (1 kDa und 25 kDa) durchgeführt (siehe Abbildung 36). Aus Abbildung 35 wird deutlich, dass Glucose bei Verwendung einer 1 kDa Membran eine höhere Volumenzunahme erzeugt im Vergleich zu einer 25 kDa Membran. Zur Durchführung der Diffusionsversuche wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die UF Versuche gestoppt und mittels verschiedener Analysemethoden, wie in Kapitel 4.2.2 bis Kapitel 4.2.5 beschrieben, die Glucose- bzw. Icodextrinkonzentration in den Dialyseschläuchen bestimmt.

Die UF Versuche wurden in Laktat Matrix als Lösungsmittel sowie Laktat Matrix als Außenmedium mit einem Füllvolumen von 10 ml durchgeführt. Die Gesamtmenge an Glucose im System beträgt 0,5 g, das Gesamtvolumen an Lösung im System beträgt 460 ml. Würde sich die im Dialyseschlauch vorhandene Menge an Glucose komplett im System verteilen, so würde man rechnerisch (siehe Gleichung 25) eine Ausgleichskonzentration von 1,09 g/l (0,1%) erhalten.

$$\text{Ausgleichskonz.} \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{\text{Gesamtmenge} [g]}{\text{Gesamtvolumen} [l]} = \frac{0,5}{460} = 1,09 \frac{g}{l}$$

Gleichung 25

In Abbildung 36 ist der zeitlich relevante Ausschnitt für die Diffusionsversuche mit einer 5%igen Glucoselösung in Laktat Matrix dargestellt. Es ist jeweils die Glucosekonzentration [%] über die Zeit unter Verwendung verschiedener Bestimmungsmethoden aufgeführt. Die Ergebnisse unter Verwendung einer 1 kDa Membran sind jeweils mit einer durchgezogenen Linie gekennzeichnet, die Versuche mit einer 25 kDa Membran mit einer gestrichelten Linie.

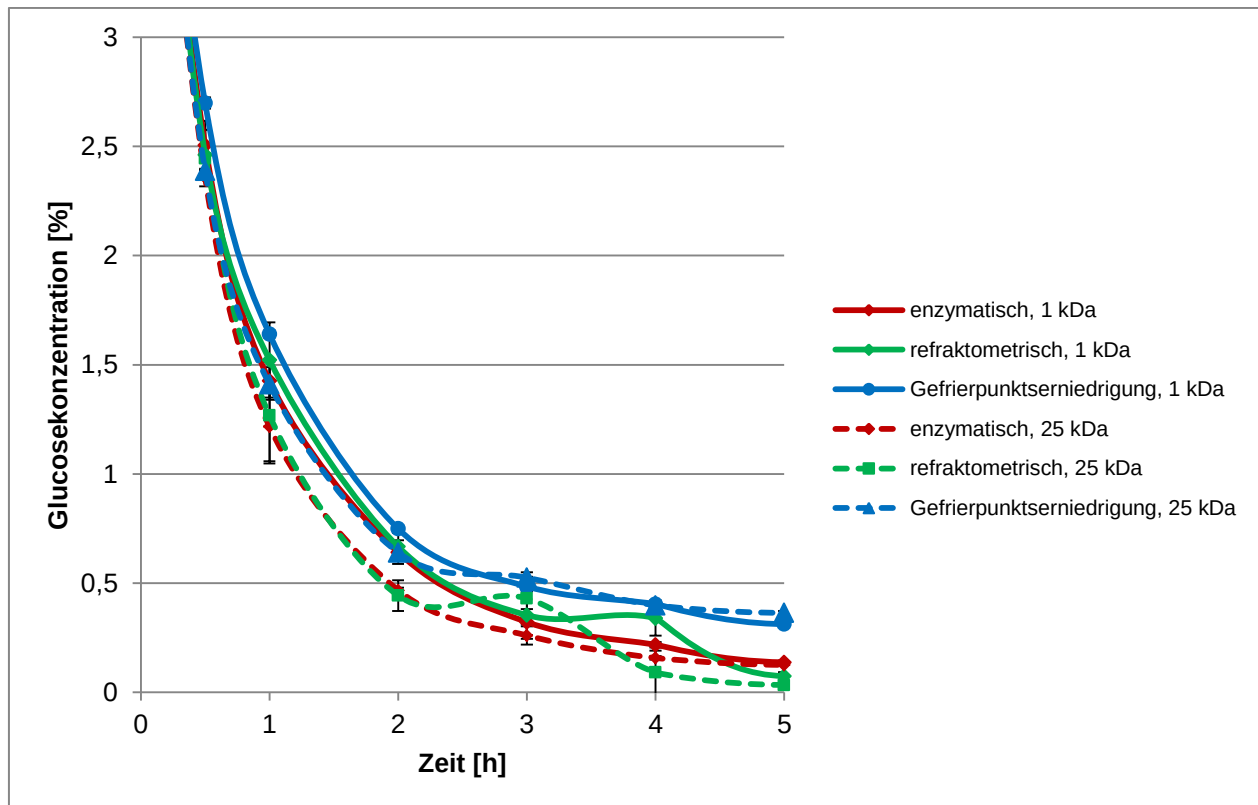


Abbildung 36: Diffusionsversuche, 5%ige Glucoselösung in Laktat Matrix, Füllvolumen 10 ml, Außenmedium Laktat Matrix, Variation der Dialysemembran (1 kDa und 25 kDa); Vergleich der Methode zur Bestimmung der Glucosekonzentration (enzymatisch mittels Gallery, refraktometrisch über Brechungsindex, Osmolalität mittels Gefrierpunktserniedrigung).

Anhand der Ergebnisse der enzymatischen Glucosebestimmung wird deutlich, dass eine gleichmäßige Abnahme über die Zeit festzustellen ist und die Diffusion von Glucose durch eine 25 kDa Membran erwartungsgemäß schneller stattfindet, als bei einer 1 kDa Membran. Nach 5 Stunden wird bei Verwendung beider Membranen eine Glucosekonzentration von ca. 0,1% gemessen, was der theoretischen Ausgleichkonzentration entspricht.

Die Ergebnisse der refraktometrischen Bestimmung zeigen bis zu einer Versuchszeit von 2 Stunden eine gute Übereinstimmung der Werte mit denen der enzymatischen Methode. Ab einer Versuchszeit von 2 Stunden und einer Glucosekonzentration von unter 0,5% ergeben sich sehr stark schwankende Werte bei der refraktometrischen Bestimmung.

Die Ergebnisse der Glucosebestimmung über die Osmolalität (Gefrierpunktserniedrigung) zeigen bei Verwendung beider Membranen eine höhere Konzentration im Vergleich zu den beiden vorherigen Methoden. Nach 4 Stunden erhält man über die Osmolalität eine Glucosekonzentration von 0,36%, die nicht der theoretischen Ausgleichskonzentration von 0,1% entspricht. Eine mögliche Ursache für die Ergebnisse könnte der Einfluss der Ionen in der Laktat Matrix sein. Im Rahmen der UF Versuche könnte nach 4-5 Stunden eine höhere Ionenkonzentration im Inneren des Membranbeutels als zu Beginn des Versuches vorliegen. Bei der Messung der Osmolalität wird die Anzahl der osmotisch aktiven Teilchen pro kg Lösungsmittel bestimmt. Bei der Messmethode kann nicht zwischen Ionen oder Glucose unterschieden werden. Bei der enzymatischen Methode hingegen wird Glucose spezifisch bestimmt, die Ergebnisse zeigen außerdem eine sehr gute Übereinstimmung mit der berechneten Ausgleichskonzentration.

5.1.5 UF Versuche mit variierender Konzentration von Hydroxyethylstärke 50/0,2 im Außenmedium

Um den Effekt des kolloidosmotischen Druckes im Blutplasma auf die UF Leistung von Glucose und Icodextrin zu analysieren, wurden zunächst exemplarisch UF Versuche mit einer variierenden Konzentration an HES 50/0,2 im Außenmedium durchgeführt. HES soll dabei den Einfluss des Humanalbumins nachstellen, dessen typischer Konzentrationsbereich beim Menschen zwischen 35 g/l bis 53 g/l liegt.^[76] Humanalbumin besitzt eine molare Masse von 66 kDa, wodurch sich ein molarer Konzentrationsbereich von 0,53 mmol/l bis 0,803 mmol/l ergibt. Im Rahmen der UF Versuche wurde die Konzentration an HES 50/0,2, als kolloidosmotischer Ersatz für Albumin, im Außenmedium in dem oben angegebenen Konzentrationsbereich variiert. Es wurde eine Konzentration von 2,65% (0,53 mmol/l), 3% (0,6 mmol/l) und 4,015% (0,803 mmol/l) von HES im Außenmedium eingestellt, unter der Annahme einer molaren Masse von 50 kDa. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse dieser Ultrafiltrationsversuche dargestellt.

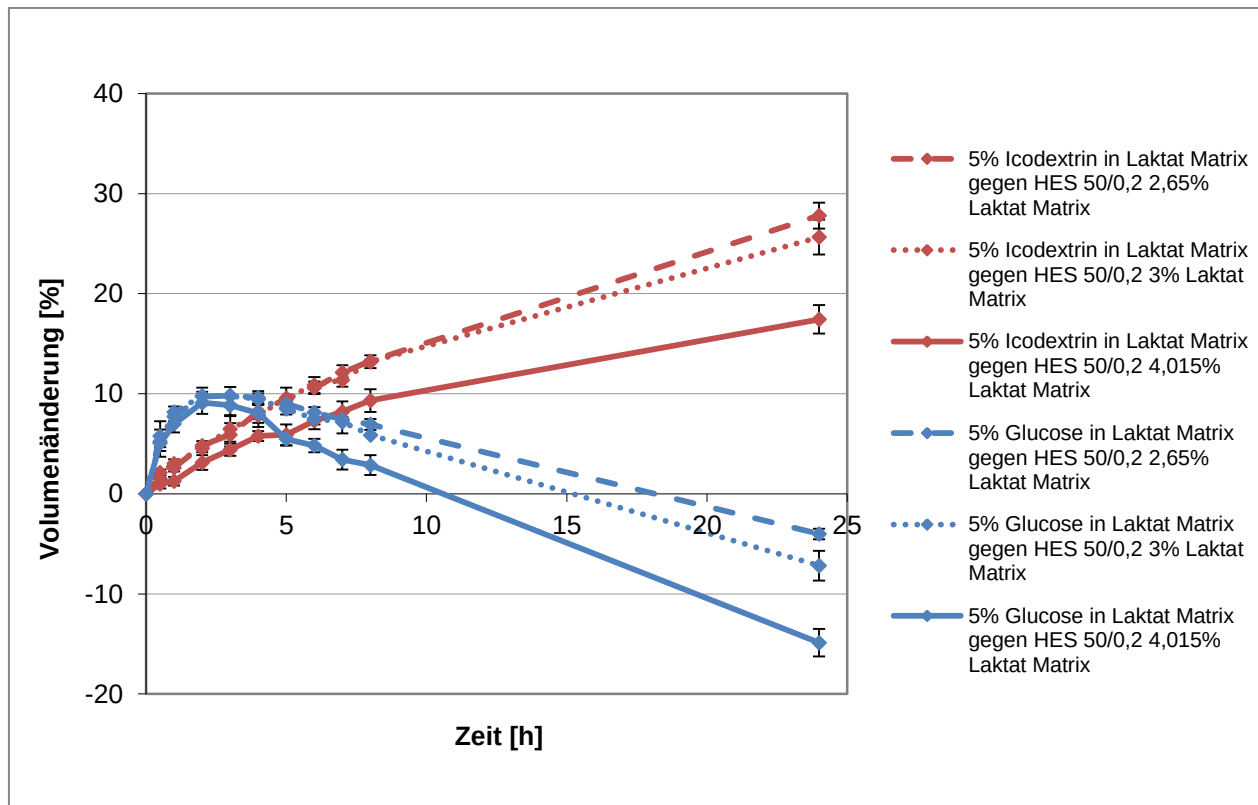


Abbildung 37: Ultrafiltrationsversuche: 1 kDa Membran; 5%ige Testlösungen mit Glucose bzw. Icodextrin in Laktat Matrix; Füllvolumen 10 ml; Außenmedium Laktat Matrix mit variierender HES 50/0,2 Konzentration.

In dieser Abbildung ist die prozentuale Volumenänderung über einen Versuchszeitraum von 24 Stunden dargestellt. Als Testlösungen wurden 5%ige Glucose- und 5%ige Icodextrinlösungen in Laktat Matrix eingesetzt. Als Außenmedium wurde Laktat Matrix mit einer variierenden Konzentration an HES 50/0,2 verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration an kolloidosmotischer Substanz sowohl bei den Versuchen mit Glucose als auch Icodextrin einen entscheidenden Einfluss auf den Ultrafiltrationsverlauf hat. Bei den Versuchen mit Icodextrin verläuft die prozentuale Volumenzunahme mit steigender Konzentration an HES im Außenmedium zunehmend flacher.

Der UF Verlauf von Glucose zeigt bei den ersten 2 bis 3 Stunden einen fast übereinstimmenden Verlauf, das Ausmaß der Rückfiltration ist jedoch stark abhängig von der Konzentration an HES im Außenmedium.

Es ergibt sich mit steigender HES-Konzentration im Außenmedium eine stärkere Abnahme des Volumens im Dialyseschlauch. Somit ist auch die Konzentration an Albumin im Blutplasma ein entscheidender Faktor auf die Ultrafiltrationsleistung bei der Peritonealdialyse und sollte bei der Behandlung mit berücksichtigt werden.

5.1.6 Screening nach geeigneten Substanzen zur Substitution von Humanalbumin anhand deren kolloidosmotischen Druckes

Damit sich ein möglichst ähnliches Verhalten des Außenmediums im Vergleich zum Blutplasma ergibt, ist es wichtig eine kolloidosmotische Substanz einzusetzen, welche in ihrem Verhalten humanem Albumin ähnelt. Potentielle kolloidosmotische Substanzen (siehe Tabelle 5) wurden im nächsten Schritt mit Hilfe des Osmomat 050 hinsichtlich ihres kolloidosmotischen Druckes in Abhängigkeit der Konzentration analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 im Vergleich zum Literaturwert von Albumin bei einer Konzentration von 5 g/100 ml dargestellt.

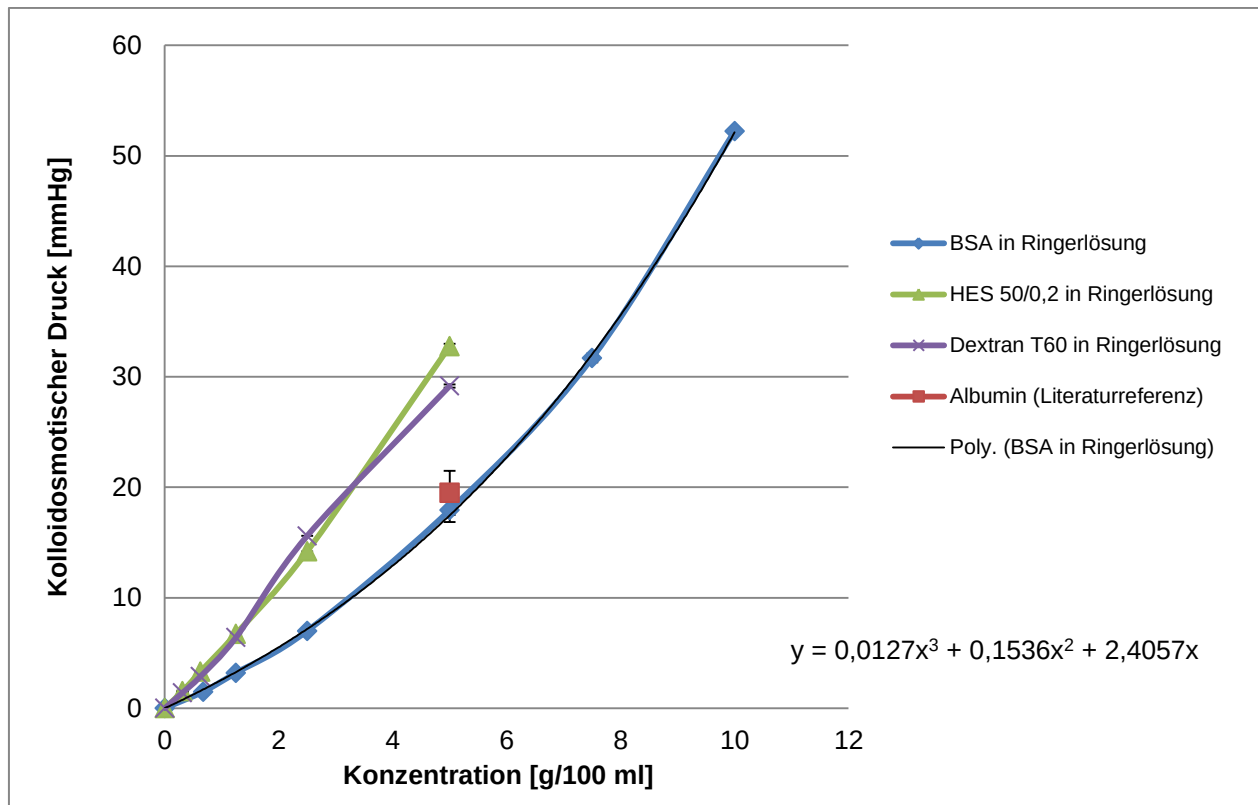


Abbildung 38: Kolloidosmotischer Druck [mmHg] von Modellsubstanzen im Vergleich zu humanem Albumin gegen die Konzentration [g/100 ml]; Bestimmung mittels Osmomat 050 mit integrierter 20 kDa Membran, von Gonotec.

Wie anhand dieser Abbildung zu sehen, nimmt der kolloidosmotische Druck bei HES 50/0,2 und Dextran T60 mit steigender Konzentration relativ linear zu, der kolloidosmotische Druck einer 5%igen Lösung liegt bei beiden Substanzen bei 30 mmHg und damit ca. 10 mmHg über dem Literaturwert von Humanalbumin. Der kolloidosmotische Druck von Rinderalbumin (BSA) stimmt bei einer 5%igen Lösung mit dem Referenzwert von Humanalbumin überein. Fügt man für den kolloidosmotischen Druck über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 100 g/l eine Trendlinie ein, so ergibt sich durch ein Polynom dritter Ordnung eine besonders gute Annäherung (siehe Gleichung in Abbildung 38). In Abbildung 39 ist als Vergleich der osmotische Druck von humanen Plasmaproteinen sowie von Blutplasma in Abhängigkeit der Konzentration [g/100 ml] dargestellt.

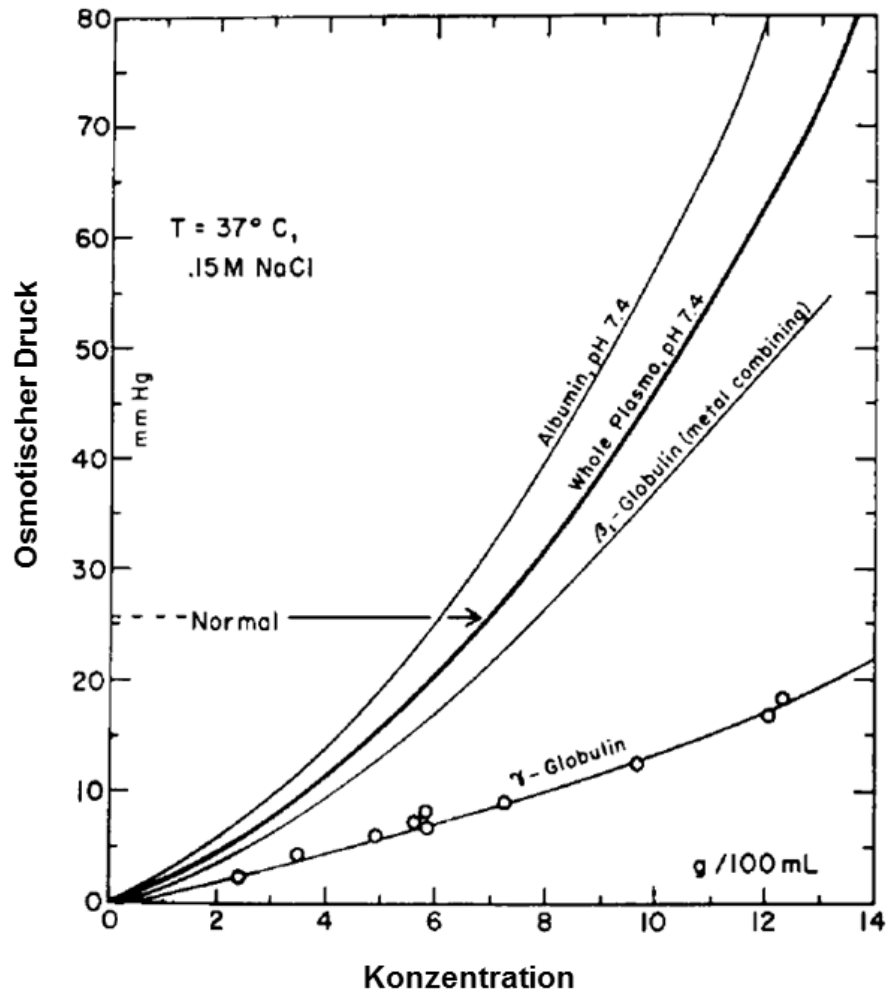


Abbildung 39: Osmotischer Druck von humanen Plasmaproteinen in Abhängigkeit der Konzentration.^[77]

$$\Pi_{\text{Albumin}} = 1,2 \cdot 10^{-3} \cdot c^3 + 0,18 \cdot c^2 + 2,8 \cdot c$$

Gleichung 26

$$\Pi_{\text{Plasma}} = 0,9 \cdot 10^{-3} \cdot c^3 + 0,16 \cdot c^2 + 2,1 \cdot c$$

Gleichung 27

Anhand der Abbildung 39 sowie Gleichung 26 bis Gleichung 28 lässt sich erkennen, dass der kolloidosmotische Druck im Blutplasma einen ähnlichen konzentrationsabhängigen Verlauf hat wie Humanalbumin. Humanalbumin ist also bezüglich des kolloidosmotischen Druckes eine sehr gut geeignete Indikatorsubstanz für das Verhalten des Blutplasmas.^[77]

Im Folgenden wird die experimentell ermittelte Gleichung von Rinderalbumin dargestellt.

$$\Pi_{Albumin} = 1,3 \cdot 10^{-3} \cdot c^3 + 0,15 \cdot c^2 + 2,4 \cdot c$$

Gleichung 28

Vergleicht man die Referenzgleichungen von Albumin sowie Blutplasma aus der Literatur mit den experimentell ermittelten Ergebnissen des kolloidosmotischen Druckes von Rinderalbumin, so ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung. BSA ist also im Vergleich zu Dextran T60 bzw. HES 50/0,2 als Humanalbuminersatz in der Plasmasubstitutionslösung im Rahmen der UF Versuche sehr gut geeignet. Es zeigt in dem konzentrationsrelevanten Bereich eine gute Löslichkeit in der Laktat Matrix.

5.1.7 Ultrafiltrationsversuche mit variierendem MWCO der Dialysemembran sowie BSA als Humanalbuminsubstituent im Außenmedium

Nachdem durch Evaluierung der kolloidosmotischen Substanzen die Eignung von BSA in der Matrixlösung als Plasmaersatz bestätigt wurde, wurden zusätzlich der Effekt von BSA im Rahmen der UF Versuche mittels *in vitro* Testsystem A analysiert. Bei den UF Versuchen wurde eine BSA Konzentration von 40 g/l bzw. 0,6 mmol/l gewählt, um in dem mittleren Konzentrationsbereich von Albumin im Blutplasma zu liegen.

Die Versuche wurden sowohl mit Glucose als auch mit Icodextrin als osmotische Agenzien durchgeführt und die Membran mit 1 kDa und 25 kDa MWCO eingesetzt. Die Ergebnisse der prozentualen Volumenänderung sind in Abbildung 40 dargestellt.

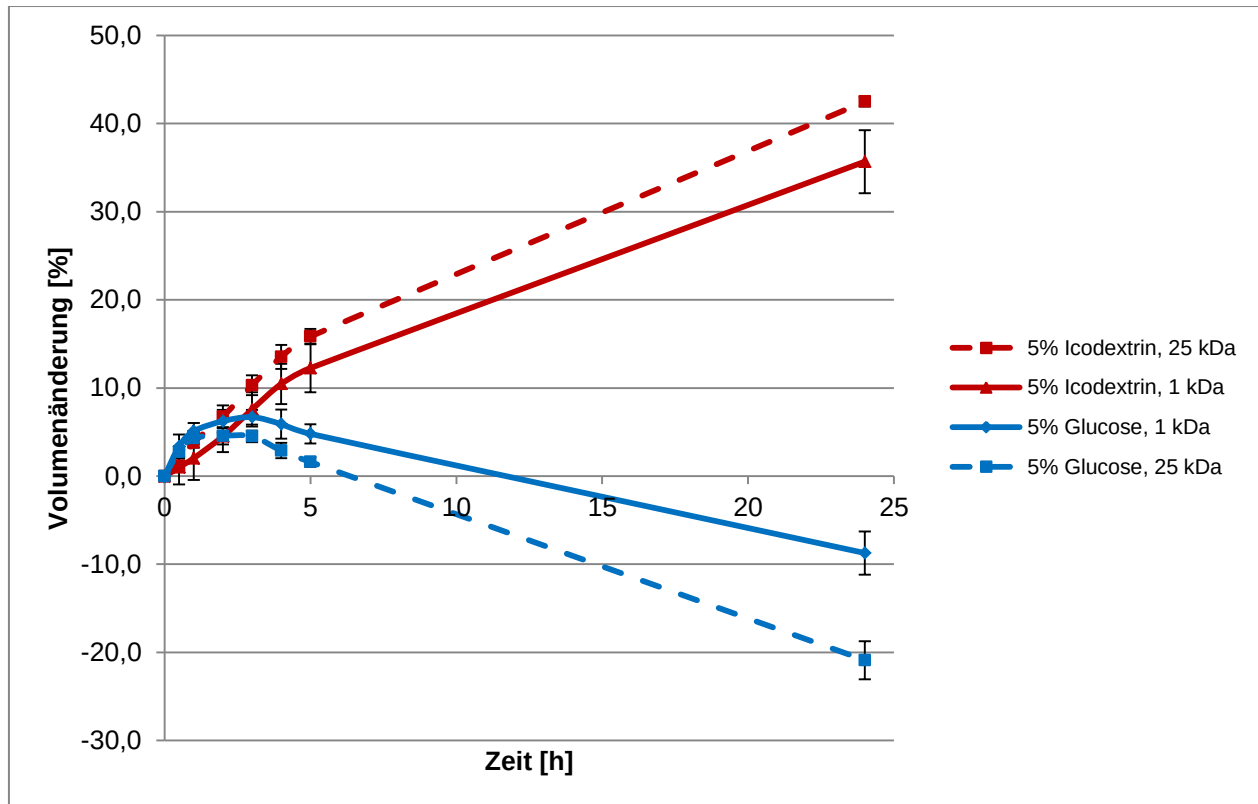


Abbildung 40: Ultrafiltrationsversuche: 5%ige Testlösungen mit Glucose bzw. Icodextrin in Laktat Matrix; Füllvolumen 10 ml; Außenmedium Laktat Matrix mit 0,6 mmol/l BSA; Variation der Dialysemembran (1 kDa und 25 kDa).

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass Glucose sowohl bei Verwendung einer 1 kDa als auch bei einer 25 kDa Membran eine schnelle aber nur kurze osmotische Wirkung erzeugt. Bis ca. 2 bis 3 Stunden nimmt der Dialysebeutel vom Außenmedium Flüssigkeit auf, anschließend findet ein Flüssigkeitstransport ins Außenmedium statt. Bei einer 25 kDa Membran verringert sich die Flüssigkeitsaufnahme im Vergleich zur 1 kDa Membran während die Rückfiltration verstärkt wird.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Resultaten der Diffusionsversuche (siehe Kapitel 5.1.4), da Glucose schneller durch eine 25 kDa Membran diffundiert als durch eine 1 kDa Membran.

Findet nun ein Ausgleich der Glucosekonzentration zwischen Innen- und Außenmedium nach spätestens 4 bis 5 Stunden statt, so findet bei längeren Verweilzeiten in Abhängigkeit der hydraulischen Leitfähigkeit der Membran bei definiertem kolloidosmotischen Druck ein Flüssigkeitstransport in Richtung höherer osmotischer Drücke, also ins Außenmedium, statt. Die Ergebnisse der Icodextrinversuche stimmen ebenfalls vom Verlauf her mit den Ergebnissen ohne zugesetzten Albumin überein. Es findet eine stärkere Volumenzunahme durch eine 25 kDa Membran statt, als durch eine 1 kDa Membran.

Ohne Albumin im Außenmedium wird nach 24 h eine Volumenzunahme von 50% bzw. 60% erzeugt, mit 0,6 mmol/l Albumin betragen die Volumenzunahmen 36% bzw. 43%. Im Vergleich zu den UF Ergebnisse von Glucose und Icodextrin mit 0,6 mmol/l Albumin mit den Ergebnissen mit 0,6 mmol/l HES 50/0,2, wird nach 24 Stunden unter Verwendung von BSA eine höhere Volumenzunahme bzw. geringere Rückfiltration festgestellt. Dies lässt sich anhand der Ergebnisse des kolloidosmotischen Druckes bestimmt mittels Osmomat erklären. 0,6 mmol/l HES 50/0,2 entsprechen einer Konzentration von ca. 3%, was einem kolloidosmotischen Druck von ca. 18 mmHg erzeugt (siehe Abbildung 38). BSA mit einer äquimolaren Konzentration entspricht einer Konzentration von ca. 4%, wodurch sich ein Druck von ca. 12 mmHg ergeben würde. Durch den niedrigeren kolloidosmotischen Druck der BSA-Lösung im Vergleich zur HES-Lösung lässt sich die höhere UF-Rate bei Icodextrin bzw. die geringere Rückfiltration bei der Glucoselösung erklären.

5.2 Ultrafiltrationsversuche mit alternativen osmotischen Agenzien von FSU Jena

Wie bereits in Kapitel 4.1.3 beschrieben besteht eine große Nachfrage nach einem alternativen osmotischen Agens zu Glucose. Im Rahmen der Kooperation zwischen Fresenius Medical Care und der FSU Jena liegt deren Fokus auf der Entwicklung von stärkebasierten Polymeren.

Hierzu wurde in einer weiteren Testreihe der Effekt der molaren Masse von unterschiedlich großen Dextranen als Modellschubstanz getestet (siehe Kapitel 5.2.1). Anschließend werden die Ergebnisse einer Variation des Substituenten sowie Substitutionsgrades sowie Stärkeursprungs dargestellt (Kapitel 5.2.2 bis Kapitel 5.2.5).

5.2.1 Einfluss von molarer Masse des Backbones auf die Ultrafiltration

Die Ergebnisse der UF-Versuche mit unterschiedlichen Dextranen (siehe Tabelle 4) als Modellschubstanz sind in Abbildung 41 dargestellt.

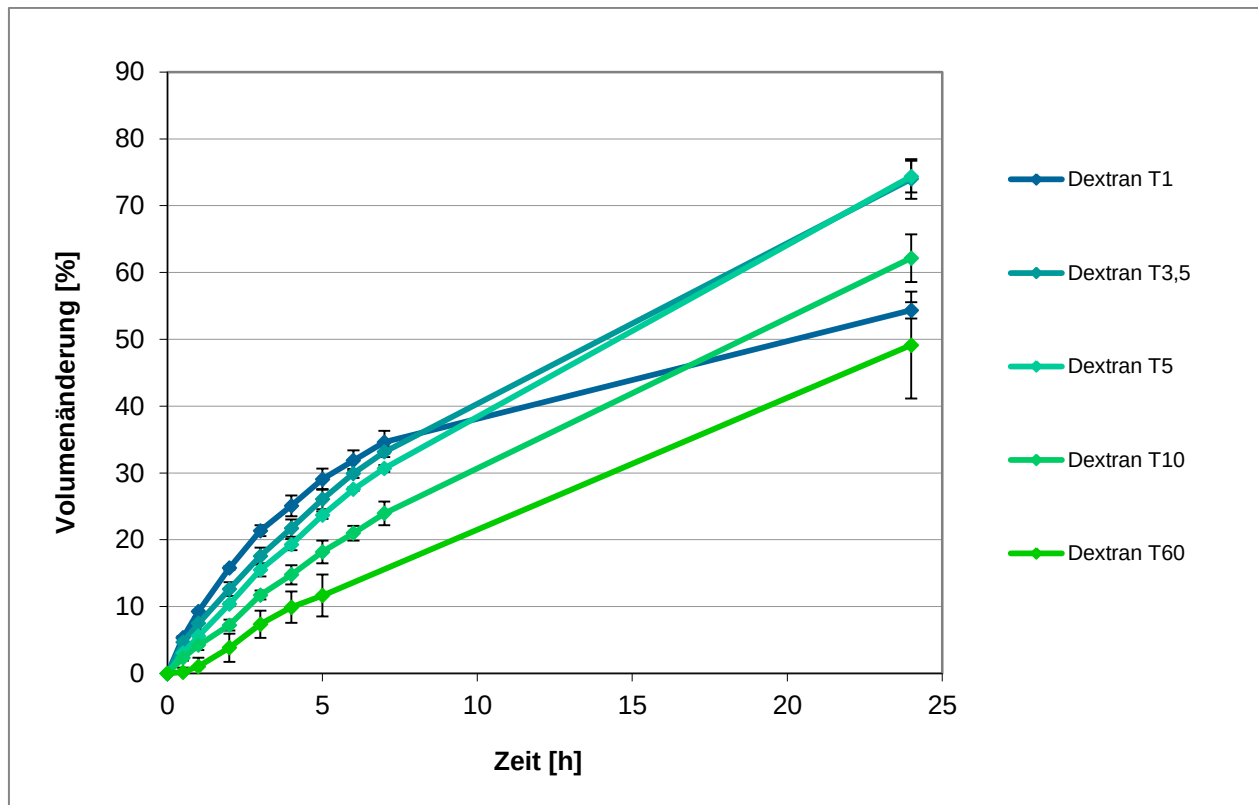


Abbildung 41: Ultrafiltrationsversuche: 5%ige Testlösungen mit Dextranen in Laktat Matrix, Füllvolumen 10 ml; Außenmedium Laktat Matrix, 1 kDa Membran.

Anhand Abbildung 41, der prozentualen Volumenänderung über die Zeit wird deutlich, dass das Dextran T1 mit der kleinsten molaren Masse, zwischen 0 bis ca. 6 Stunden, die stärkste Volumenänderung erzeugt, danach flacht der Kurvenverlauf jedoch ab. Die stärkste langfristige Volumenänderung erzeugen hingegen Dextran T3,5 und T5. Das Dextran mit der höchsten molaren Masse T60 verursacht eine langsame aber annähernd linear zunehmende Volumenänderung über 24 h. Diese Effekte sind typisch für Polymere und wurden bereits in vorherigen Arbeiten bei zwei weiteren Modellsustanzen Polyethylenglycol sowie hochverzweigtes Polyglycerol mit verschiedenen molaren Massen beobachtet.^[57]

In Abbildung 42 ist ein Vergleich der prozentualen Volumenzunahmen nach 24 Stunden gegen die zahlenmittlere molare Masse [g/mol] der Dextrane mit den vorherigen verwendeten Modellsustanzen HPG und PEG dargestellt.

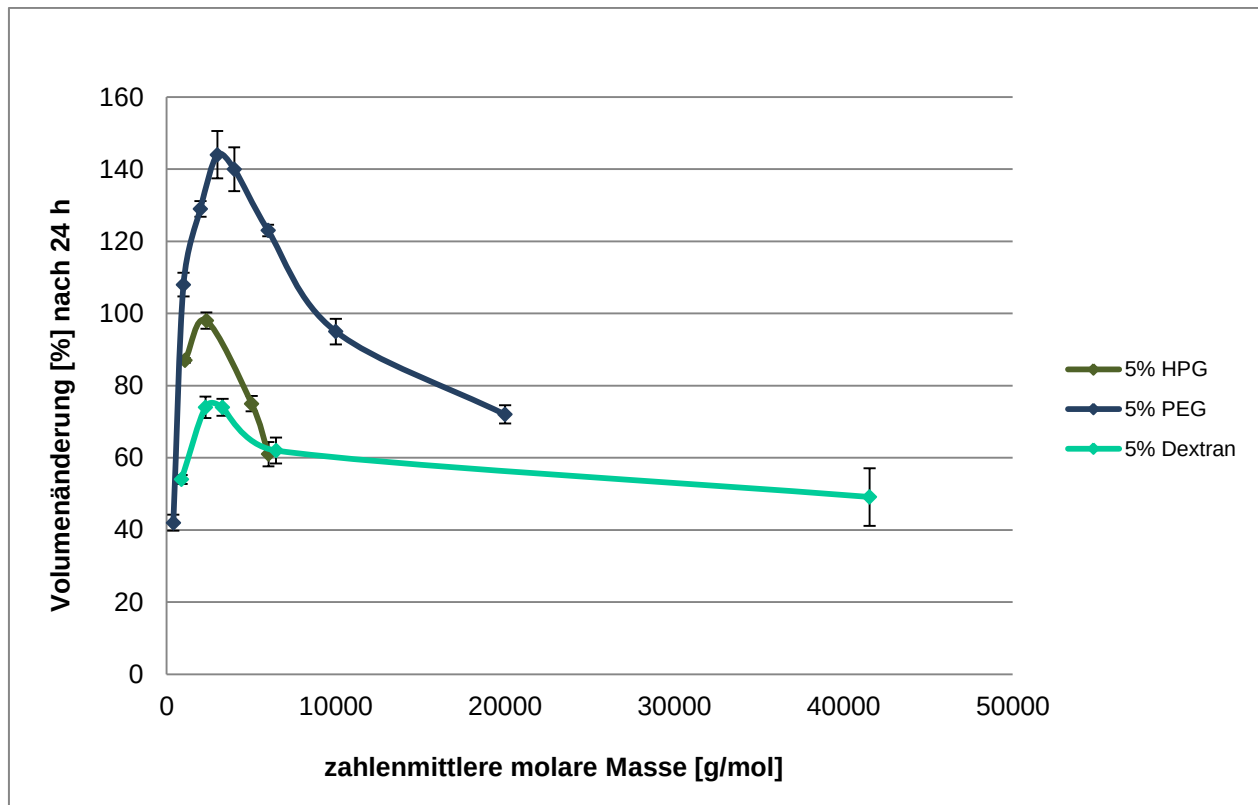


Abbildung 42: Gegenüberstellung der Volumenänderung [%] nach 24 h gegen zahlenmittlere molare Masse [g/mol] für verschiedene HPGs, PEGs und Dextrane (UF Versuch, 5%ige Testlösungen in Laktat Matrix gegen Laktat Matrix, 1 kDa Membran, 10 ml Füllvolumen).

Alle drei Polymere weisen bezüglich der Volumenzunahme nach 24 h ein Maximum im Molekülgrößenbereich von etwa 2000 bis 5000 g/mol auf.

Für die Volumenzunahme zu einem definierten Zeitpunkt im Rahmen der UF Versuche mit *in vitro* Testsystem A sind jeweils sowohl der Anteil des kristalloidosmotischen Druckes sowie der Anteil des kolloidosmotischen Druckes von Bedeutung. Der kolloidosmotische Druck ist immer abhängig von dem Reflektionskoeffizient, welcher wiederum abhängig ist von der Größe und Struktur der Modellschubstanz sowie von der Porengröße bzw. der Struktur der Membran. Betrachtet man die Volumenzunahme im Rahmen der Versuche, so wirken immer beide Effekte, kristalloid- und kolloidosmotischer Druck. Für jedes Polymer lässt sich somit immer ein molarer Massenbereich bestimmen, bei der eine maximalen Volumenzunahme unter Verwendung einer Membran mit einem definierten MWCO getroffen werden kann.

Die maximale Volumenzunahme würde sich zu kleineren Molekülen verschieben, sofern kürzere Verweilzeiten betrachtet werden. Hinsichtlich der unterschiedlich hohen UF-Leistung zwischen verschiedenen Polymeren bei gleicher molarer Masse wurden bereits in vorherigen Arbeiten mögliche Ursachen, wie z.B. unterschiedliche Struktur in Lösung begründet.^[57]

5.2.2 Effekte von unterschiedlichem Amyloseanteil des *Backbones* auf die Ultrafiltration

Um den Effekt von unterschiedlichem Amylosegehalt von Stärken auf das UF Verhalten zu analysieren, wurden Stärken mit verschiedener Rohstoffbasis ausgewählt und von der FSU Jena säurehydrolytisch abgebaut. Die molare Masse der Produkte wurde so eingestellt, dass sie im Bereich von 2000 bis 5000 g/mol liegt. Dieser Bereich hat sich in den vorherigen Versuchen mit Hilfe der Dextrane als besonders effektiv hinsichtlich der Ultrafiltrationsleistung erwiesen.

In Abbildung 43 sind die prozentualen Volumenänderungen der verwendeten abgebauten Stärken als 5%ige Testlösungen nach 24 Stunden im Vergleich zu Glucose und Icodextrin dargestellt.

Der Graphik sind sowohl der Stärkeursprung als auch die zahlenmittlere molare Masse zu entnehmen. Die Lösungen wurden vor der Verwendung sterilisiert, wobei es bei Hylon VII und Markerbsenstärke zu Ausfällungen kam, wodurch nur noch eine 4,06%ige und 1,92%ige Lösung in den UF Versuchen eingesetzt werden konnte. Die Konzentration wurde mittels Gefriertrocknung nachträglich ermittelt.

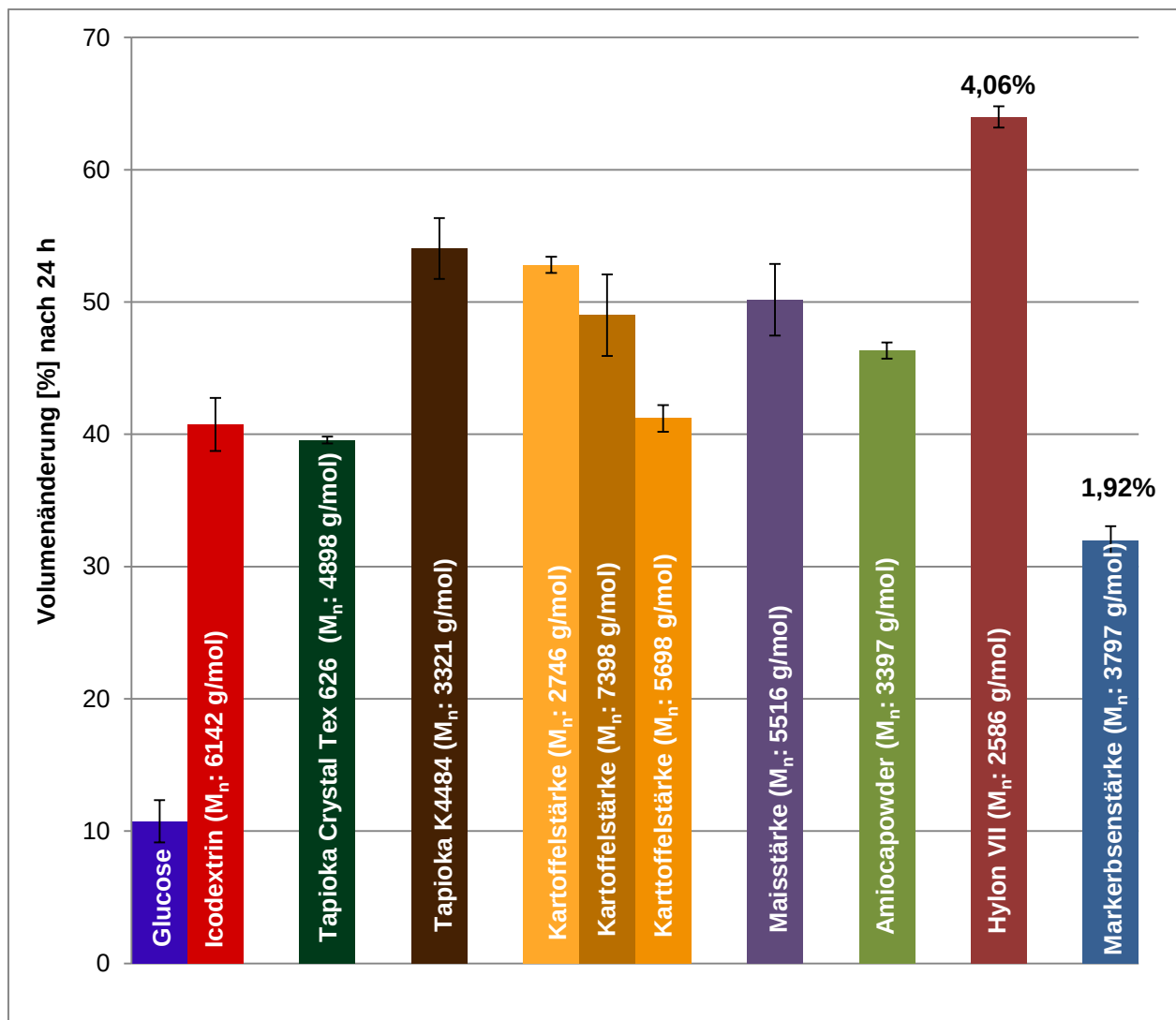


Abbildung 43: Volumenänderung [%] nach 24 h für verschiedene Stärkopolymere mit unterschiedlichem Stärkeursprung im Vergleich zu Glucose und Icodextrin (UF Versuche in Laktat Matrix gegen Laktat Matrix, 1 kDa Membran, 5%ige sterile Lösungen, Füllvolumen 10 ml).

Wie in Abbildung 43 zu sehen, wurden bei allen getesteten 5%igen Stärkelösungen, eine gleiche oder bessere UF [%] im Vergleich zu Icodextrin erzielt. Vergleicht man die beiden Stärken aus Tapioka K4484 und Crystal Tex 626, so wird mit K4484 eine höhere UF-Rate erreicht. Ein möglicher Grund hierfür könnte die zahlenmittlere molare Masse von 3321 g/mol sein, die auch im Rahmen der Dextranversuche im Bereich der höchsten UF-Rate lag.

Vergleicht man die Kartoffelstärken mit den unterschiedlichen molaren Massen, so erreicht auch hier die Substanz mit einer zahlenmittleren molaren Masse von 2746 g/mol die höchste Volumenzunahme. Anschließend folgt die Kartoffelstärke mit der höchsten molaren Masse von 7398 g/mol und dann mit 5698 g/mol, wobei aufgrund der Dextranergebnisse eine genau umgedrehte Reihenfolge erwartet werden müsste. Die Maisstärke mit einem vergleichbaren M_n zur Tapioka Crystal Tex 626 erzeugt eine um ca. 10% höhere UF-Rate, Amiocapowder mit einem vergleichbaren M_n zu Tapioka K4484 eine um ca. 5% geringe UF.

Die beiden Stärken Hylon VII und Markerbsenstärke wurden in einer zweiten Versuchsreihe als Stärkeacetate in ihrer UF-Leistung getestet. Aufgrund von früheren Ergebnissen ist bekannt, dass durch die Acetylierung keine Verbesserung in der UF erzielt wird, jedoch die Löslichkeit verbessert werden kann. Somit konnten beide Testsubstanzen als 5%ige Lösungen in *in vitro* Testsystem A getestet werden.

Hylon VII als Stärkeacetat (RH177) zeigte im Vergleich zu Hylon VII keine Verbesserung in der UF-Leistung, jedoch wurde bei der neuen Substanz ein M_n von 2201 g/mol gemessen (Daten nicht gezeigt). Die geringere Molekülgröße könnte auch zu einer Verringerung der UF-Leistung führen, da die Substanz etwas schneller durch die Membran diffundieren kann. Durch die Acetylierung der Markerbsenstärke (RH178) konnte hingegen die UF von 32% auf 70% gesteigert werden. Nach der Acetylierung wurde ein M_n von 2553 g/mol gemessen, was ebenfalls die Ultrafiltrationsleistung beeinflusst haben kann, außerdem konnte hier eine 5%ige Lösung im Vergleich zu einer 2%igen Lösung eingesetzt werden.

Neben der molaren Massenverteilung könnte auch der Amylosegehalt der verschiedenen Stärken einen Effekt auf die Wasserbindekapazität ausüben. In Tabelle 9 sind die Stärken mit ihrem Amylosegehalt dargestellt. Die Mehrheit der natürlichen Stärken besitzt einen Amylosegehalt von 20-30%. Daneben gibt es verschiedene Markerbsenstärken, welche sich im Amylosegehalt unterscheiden sowie Züchtungen, bei denen entweder der Amylosegehalt oder der Amylopektingehalt gezielt erhöht wurde.^[78]

Tabelle 9: Amylosegehalt der verwendeten Stärken.^{[79],[80],[78]}

Stärke	Amylosegehalt [%]
Tapiokastärke	17
Markerbsenstärke	69-75
Hylon VII	70
Maisstärke	21-27
Kartoffelstärke	21-22
Amiocapowder	< 1

Amylose ist eine Form der Stärke, bei der die Glucosebausteine α -1,4 glycosidisch miteinander verknüpft sind und dadurch eine helikale Konformation entsteht. Bei der zweiten Form der Stärkestruktur, Amylopektin, sind zwischen den Glucosemolekülen zusätzlich α -1,6 glycosidische Verknüpfungen ausgebildet, sodass ein verzweigtes Polymer entsteht.^[81] Aufgrund der helikalen Struktur einer Stärke mit einem hohen Amyloseanteil, kann eine hohe Wasserbindekapazität resultieren aufgrund der Einlagerung von Wasser in die Helikalstruktur. Außerdem könnten diese unterschiedlichen Strukturen auch dazu führen, dass trotz gleicher molarer Masse unterschiedliche Reflektionskoeffizienten gegeben sind. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein PEG im Vergleich zu einem HPG bei gleicher molarer Masse eine höhere UF erzeugt wurde.^[57] Polyethylenglycole besitzen im Vergleich zu hochverzweigten Polyglycerolen eine eher lineare Struktur im Vergleich zur verzweigten Struktur von HPG.

Hinsichtlich der Verstoffwechslung bei der potentiellen Aufnahme von Stärkopolymeren als osmotische Agenzien ist es wichtig zu beachten, dass vom menschlichen Körper mit Hilfe von α -Amylasen hauptsächlich die α -1,4 glycosidischen Verbindungen gespalten werden.^[81] Somit wäre aus diesem Grund ein höherer Amylosegehalt zu bevorzugen. Unter Verwendung von Icodextrin als osmotisches Agens sind allergische Reaktionen bekannt, da Icodextrin aufgrund der Kombination aus α -1,4 und α -1,6 glycosidischen Verknüpfungen nicht vollständig verstoffwechselt werden kann.

Im Rahmen der Kooperation mit FSU Jena wurden weiterhin zwei Stärkederivate gefunden, welche sich hinsichtlich ihrer Ultrafiltrationsleistung stark von den bereits beschriebenen unterscheiden.

Die Ultrafiltrationsergebnisse dieser beiden Substanzgruppen, der Stärkepropylphosphonate (Kapitel 5.2.3) sowie der Sulfoethylstärken (Kapitel 5.2.4) werden im Folgenden dargestellt. FMC beabsichtigt, gemeinsam mit der FSU Jena die Substanzgruppen für die Anwendung für den Dialysebereich patentrechtlich zu schützen.

5.2.3 Ultrafiltrationsergebnisse von Stärkepropylphosphonate mit Variation im Substitutionsgrad aus Tapioka K4484

In Abbildung 44 sind Ergebnisse der Volumenänderung [%] gegen die Zeit unter Verwendung der Stärkepropylphosphonate mit variierendem Substitutionsgrad im Vergleich zu Glucose, Icodextrin sowie unsubstituierter Tapioka K4484 dargestellt.

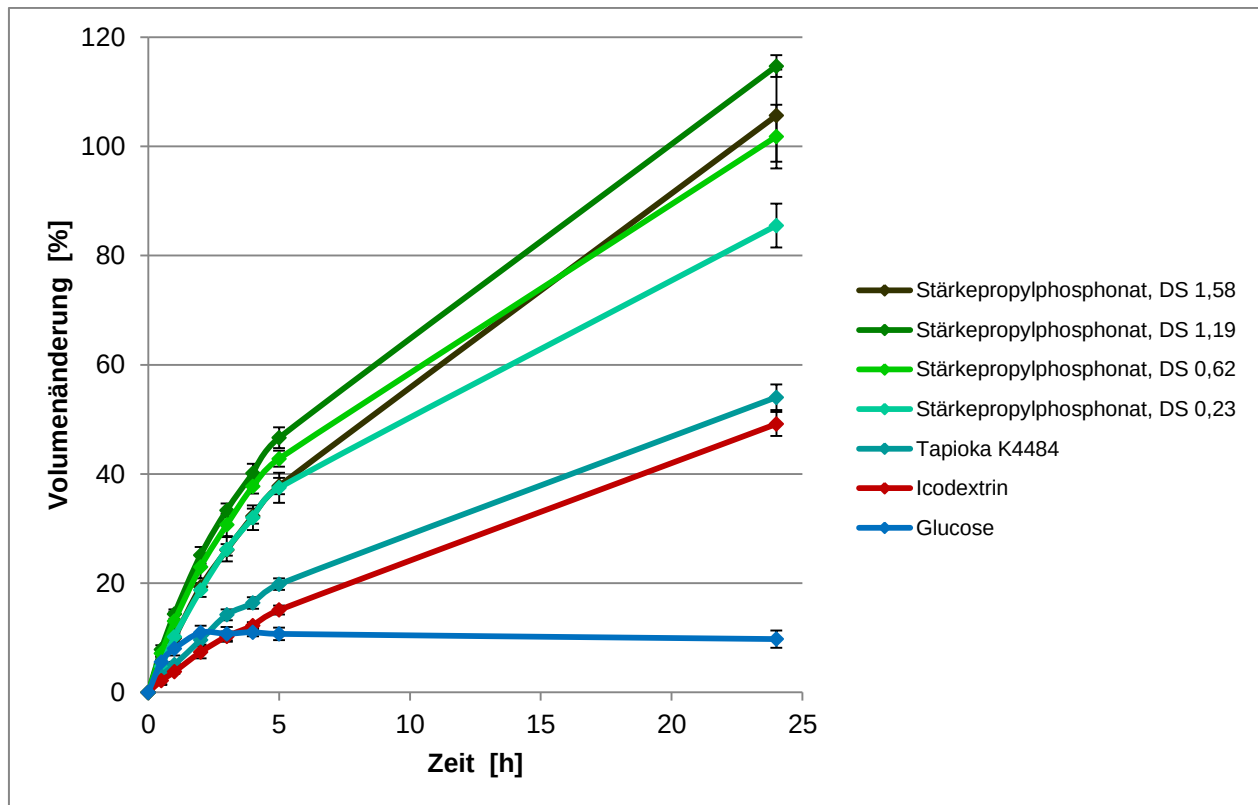


Abbildung 44: Ultrafiltrationsversuche mit 5%igen Testlösungen (steril) in Laktat Matrix gegen Laktat Matrix, MWCO 1 kDa, Füllvolumen 10 ml, Stärkepropylphosphonate mit Tapioka K4484 Ausgangsstärke.

In Abbildung 45 sind die Ergebnisse nochmals hinsichtlich *short* und *long dwell* Effektes ausgewertet und dargestellt. Für den sogenannten *short dwell* Effekt wurde die mittlere prozentuale Steigung pro Stunde für den Zeitraum 0 bis 3 Stunden berechnet, für den *long dwell* Effekt der mittlere Anstieg zwischen 5 und 24 Stunden.

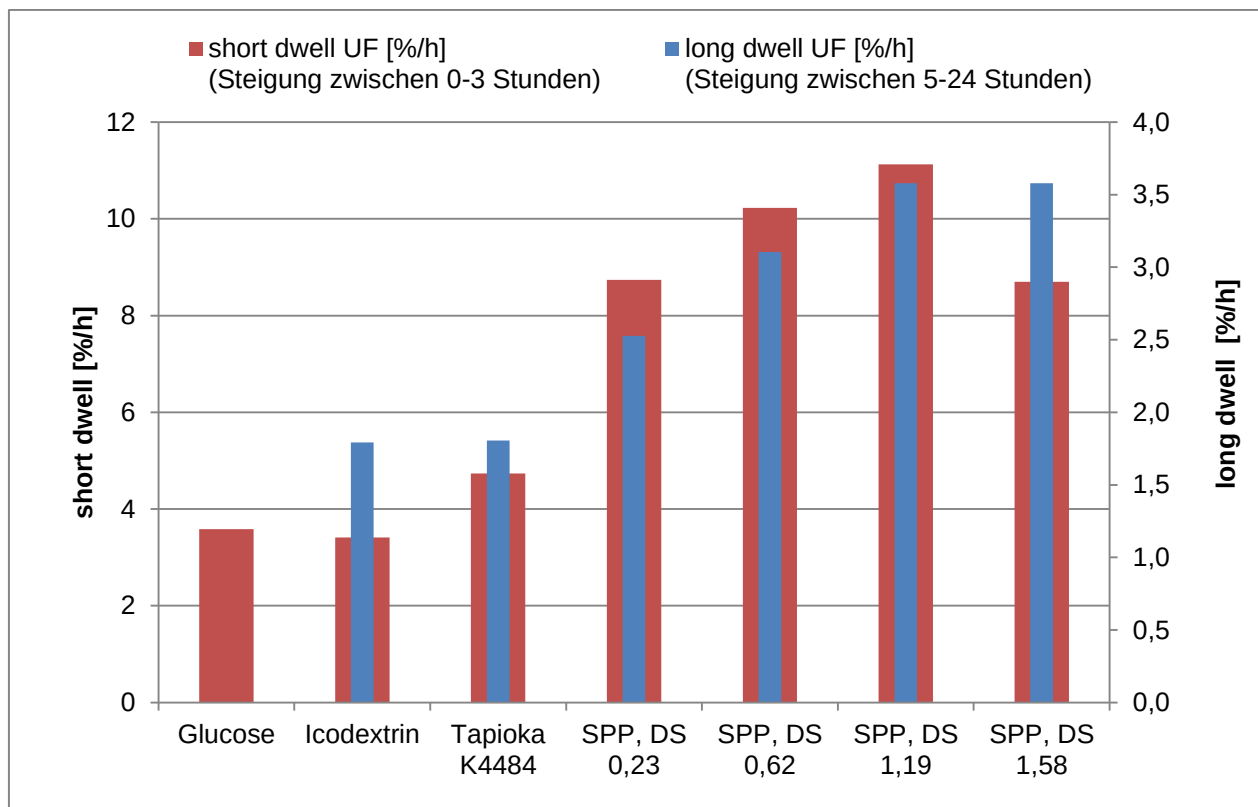


Abbildung 45: Gegenüberstellung des *short* und *long dwell* Effektes für Stärkepropylphosphonate im Vergleich zu Glucose, Icodextrin sowie Ausgangsstärke.

Anhand der beiden Abbildungen wird deutlich, dass durch die Modifizierung der Tapioka K4484 schon bei einem geringen Substitutionsgrad von 0,23 eine enorme Steigerung im *short* sowie im *long dwell* Effekt erzielt werden konnte.

Vergleicht man Icodextrin und Tapioka, so wird bereits hier eine Verbesserung hinsichtlich der UF innerhalb der ersten 3 Stunden beobachtet. Durch eine Erhöhung des DS von 0,23 auf 1,19 kann eine kontinuierliche Verbesserung im *short* sowie im *long dwell* Effekt erzielt werden. Eine weitere Erhöhung des DS auf 1,58 zeigte im Rahmen der Versuche wieder eine Abnahme der UF Leistung innerhalb der ersten drei Stunden, während der *long dwell* auf einem ähnlichen Niveau wie bei einem DS von 1,19 lag.

5.2.4 Ultrafiltrationsergebnisse von Sulfoethylstärken mit Variation im Substitutionsgrad aus Tapioka K4484

In Abbildung 46 sind Ergebnisse der Volumenänderung [%] gegen die Zeit unter Verwendung der Sulfoethylstärken mit variierendem Substitutionsgrad im Vergleich zu Glucose, Icodextrin sowie Tapioka K4484 dargestellt.

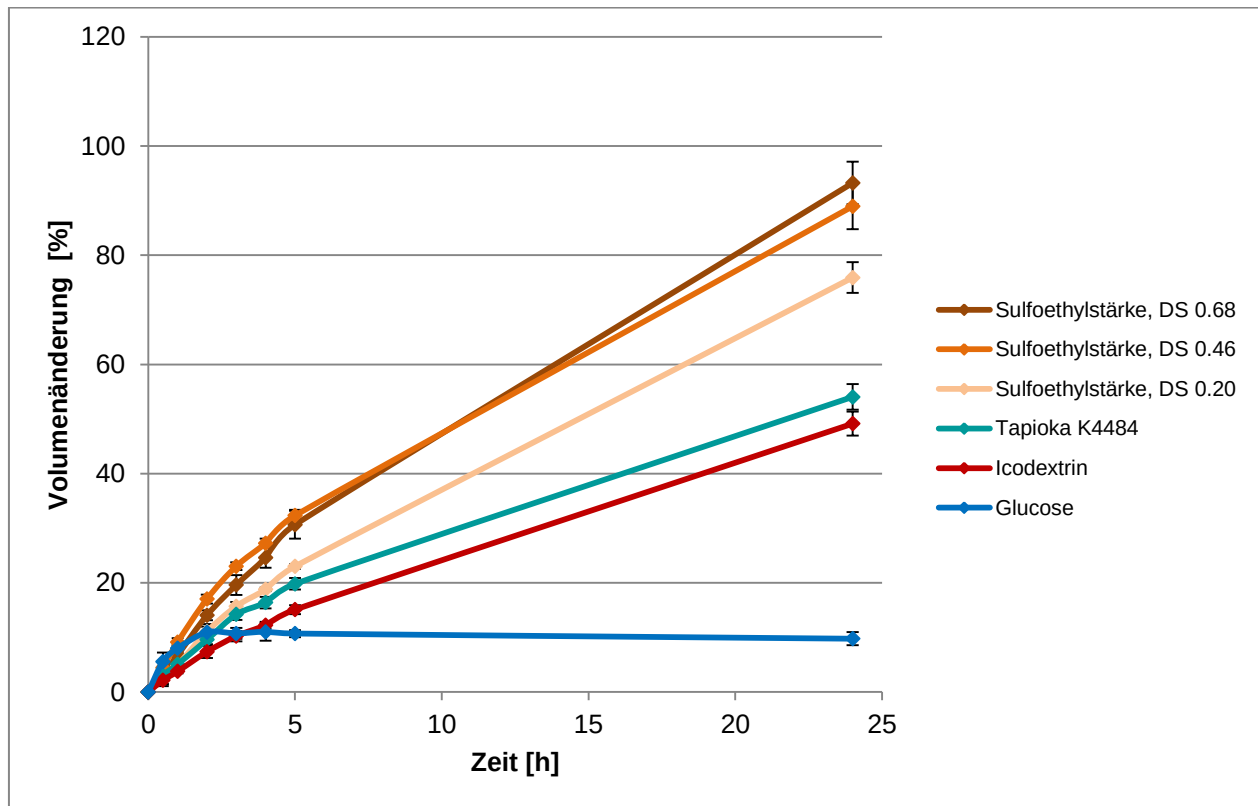


Abbildung 46: Ultrafiltrationsversuch mit 5%igen Testlösungen (steril) in Laktat Matrix gegen Laktat Matrix, MWCO 1 kDa, Füllvolumen 10 ml, Sulfoethylstärken mit Tapioka K4484 Ausgangsstärke.

In Abbildung 47 sind ebenfalls zum Vergleich, die Ergebnisse der gleichen Substanzen als *short* und *long* dwell Effekt berechnet und gegeneinander aufgetragen.

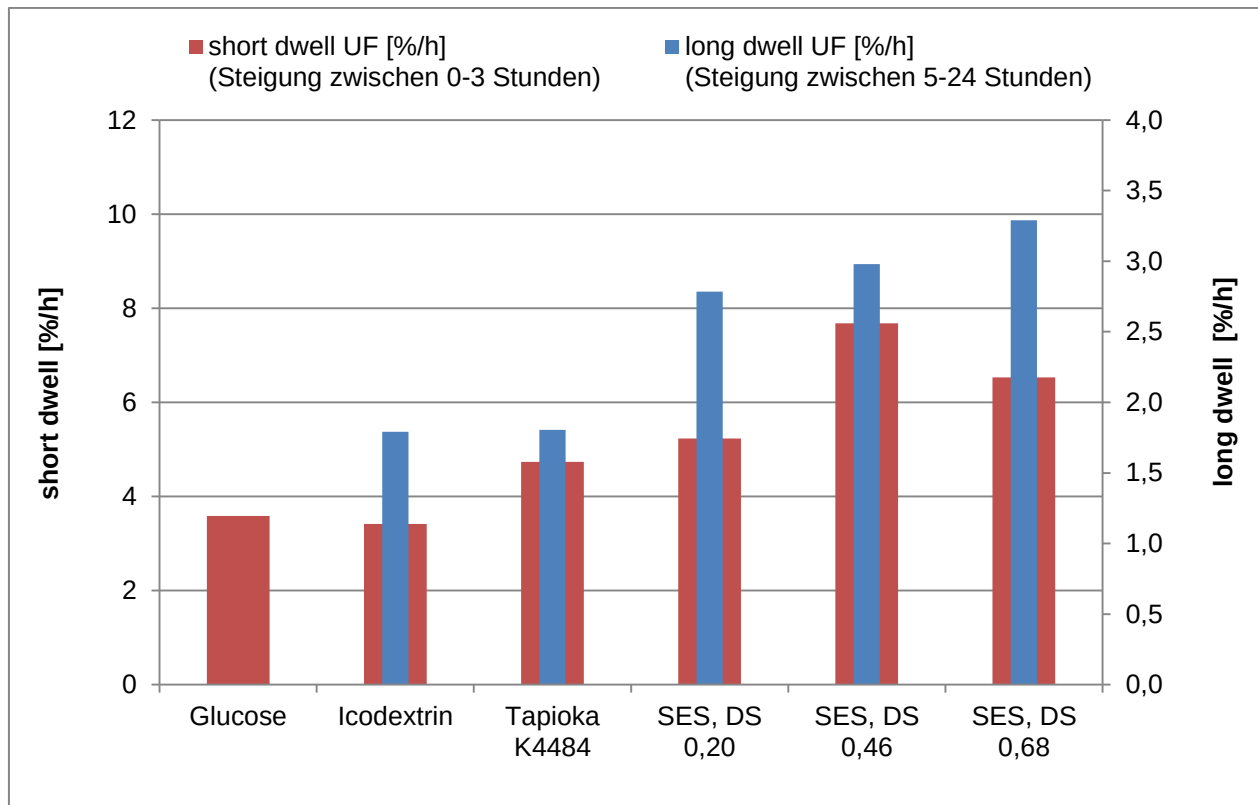


Abbildung 47: Gegenüberstellung des *short* und *long dwell* Effektes für Sulfoethylstärken im Vergleich zu Glucose, Icodextrin sowie Ausgangsstärke.

Auch bei den Sulfoethylstärken lässt sich schon bei geringem DS eine deutliche Verbesserung hinsichtlich ihrer UF Leistung erkennen. Bei einem DS von 0,20 findet im Vergleich zur reinen Ausgangsstärke Tapioka K4484 eine Verbesserung hinsichtlich des *long dwell* Effektes statt, die UF Leistung zu Beginn ist jedoch vergleichbar. Sulfoethylstärke mit einem DS von 0,46 zeigt eine starke Verbesserung des *short dwell* Effektes im Vergleich zu einem DS von 0,20, hinsichtlich des *long dwell* Effektes wird aber erst ab einem DS von 0,68 eine Steigerung erzeugt.

Die Sulfoethylstärke mit dem höchsten DS hat die beste UF-Leistung bezüglich des *long dwells*, zeigt aber hingegen der kurzfristigen UF Leistung ein schlechteres Ergebnis als die Sulfoethylstärke mit einem DS von 0,46.

Insgesamt zeigen beide Substanzgruppen, Stärkepropylphosphonate und Sulfoethylstärken vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich ihrer UF Leistung. Die Gruppe der Stärkepropylphosphonate zeigen bei gleichem DS eine höhere UF Leistung als die Sulfoethylstärken. Es wurden außerdem noch UF Versuche mit einer geringeren Konzentration der osmotischen Substanzen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei ergaben sich auch bei geringeren Konzentrationen gute UF Leistungen, wodurch potentiell auch die Aufnahme im Organismus unter *in vivo* Bedingungen reduziert werden könnte. Hinsichtlich des Einsatzes als potentielle osmotische Agenzien würden als weitere Schritte Stabilitätsuntersuchungen sowie Biokompatibilitätsuntersuchung geplant und durchgeführt werden.

5.2.5 Ultrafiltrationsergebnisse von Stärkepropylphosphonaten mit vergleichbarem Substitutionsgrad bei Variation des Stärkeursprungs

Abschließend wird in diesem Kapitel die Kombination des besten Substituenten hinsichtlich der Ultrafiltrationsleistung mit Stärken aus unterschiedlichem Rohstoffursprung untersucht.

Es wurde ein mittlerer Substitutionsgrad bei der Synthese der Stärken eingestellt und als Stärkeursprung Tapiokastärke K4484 und Crystal Tex626 sowie die Markerbbsenstärke und Hylon VII mit einem hohen Amylosegehalt gewählt.

In Abbildung 48 sind die Verläufe der prozentualen Volumenänderung über die Zeit für die 4 verschiedenen Substanzen dargestellt. Als Vergleich ist in Abbildung 49 nochmals die Auswertung der Ergebnisse als *short* und *long dwell* Effekt dargestellt.

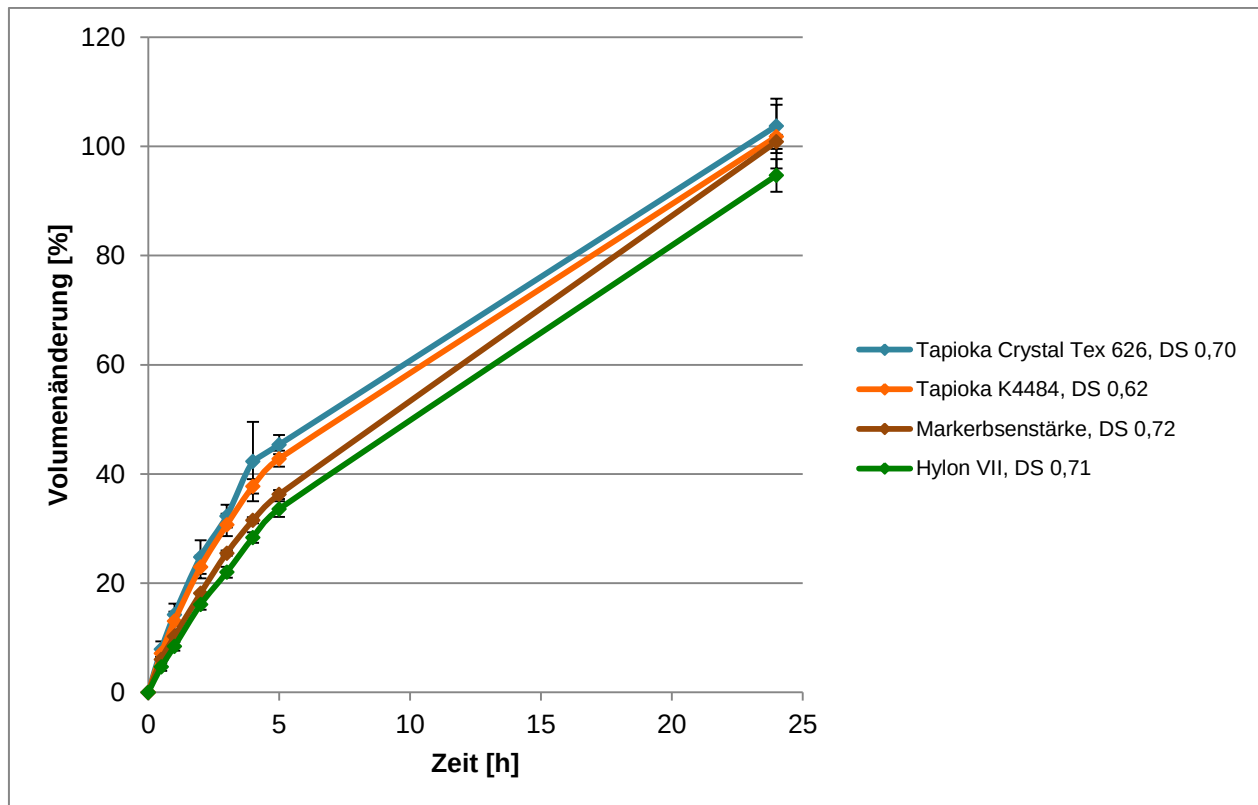


Abbildung 48: Ultrafiltrationsversuche mit 5%igen Testlösungen (steril) in Laktat Matrix gegen Laktat Matrix, MWCO 1 kDa, Füllvolumen 10 ml, Stärkepropylphosphonate mit ähnlichem DS unter Variation des Stärkeursprungs.

Hinsichtlich des Substitutionsgrades liegt bei den Substanzen eine leichte Variation vor, wodurch man die Markerbsenstärke und Tapioka K4484 mit einem DS von 0,62 miteinander vergleichen kann und Hylon VII und Crystal Tex 626 mit einem höheren DS von 0,70/0,71.

Hylon VII und Crystal Tex 626 zeigen einen vergleichbaren *long dwell* Effekt, die Tapiokastärke erzeugt jedoch eine stärkere Volumenzunahme innerhalb der ersten 5 Stunden.

Vergleicht man die Markerbsenstärke mit Tapioka K4484, so ergibt sich ein höherer *short dwell* Effekt bei der Tapiokastärke, einen höheren *long dwell* Effekt jedoch bei der Markerbsenstärke, wodurch nach 24 Stunden beide Substanzen eine identische Volumenzunahme von ca.100% erreichen.

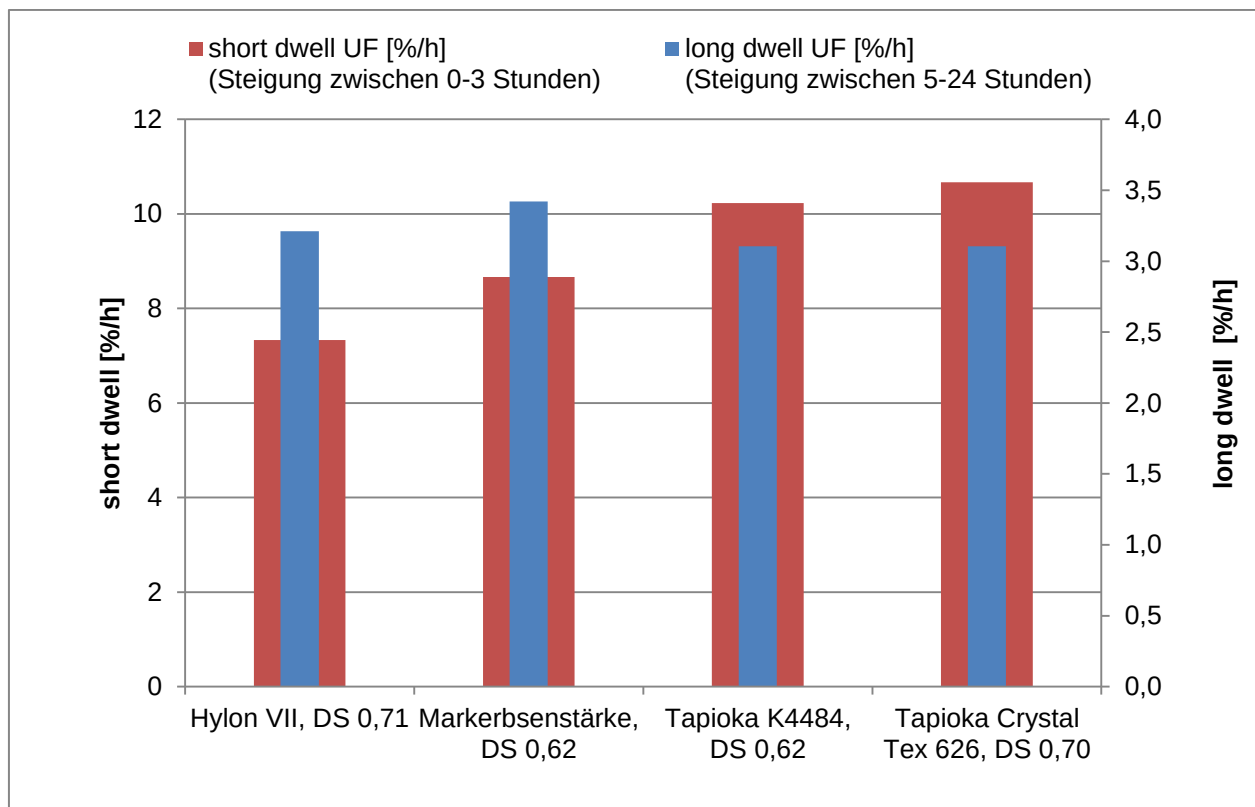


Abbildung 49: Gegenüberstellung des *short* und *long dwell* Effektes für Stärkepropylphosphonate mit ähnlichem DS unter Variation des Stärkeursprungs.

Zusammenfassend wird anhand der Ergebnisse deutlich, dass beide anionischen Stärkederivate (Sulfoethylstärke sowie Stärkepropylphosphonate) im Vergleich zur unmodifizierten Stärke eine höhere Ultrafiltrationsleistung bewirken. Dieser Effekt nahm im untersuchten Bereich mit steigendem Substitutionsgrad zu. Dies deutet darauf hin, dass die ausgebildete Hydrathülle bzw. der Reflektionskoeffizient mit steigendem Substitutionsgrad zunimmt. Solche Effekte sind bereits in der Literatur beschrieben (siehe Abbildung 50).^[82] Es wird anhand der Abbildung deutlich, dass z.B. eine neutral geladene Stärke mit einem Radius von 30 Å einen höheren Siebkoeffizient ausweist als eine anionische Stärke und somit die Membran leichter passieren kann.

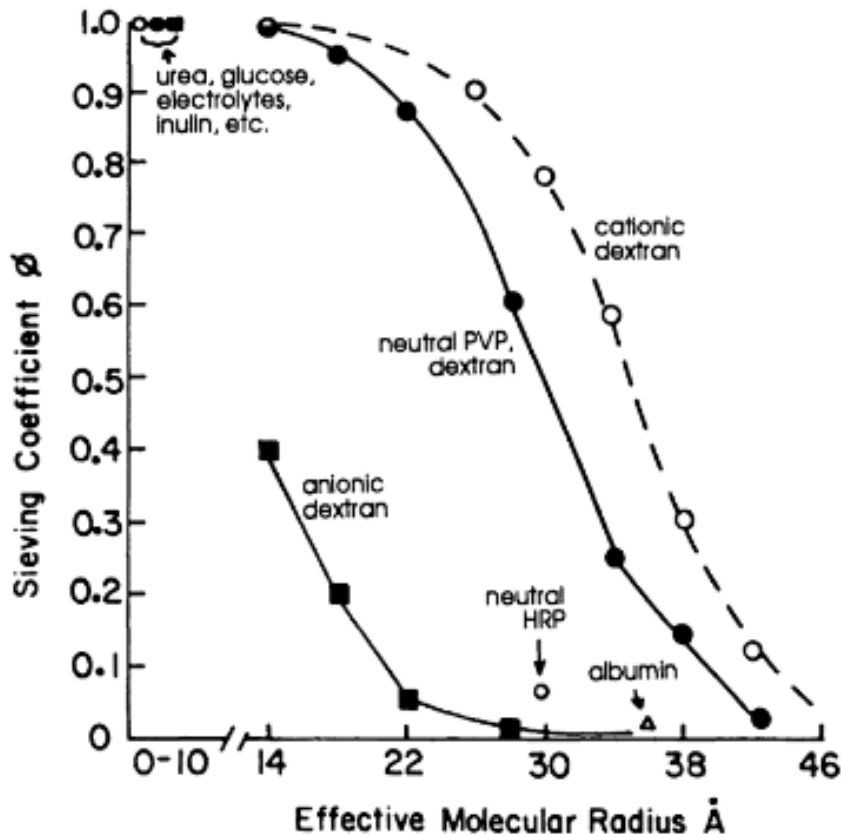


Abbildung 50: Siebkurve für verschiedene Makromoleküle und Moleküle.^[82]

Um diese Ergebnisse nochmals experimentell zu stützen, wurde zusätzlich der kolloidosmotische Druck einer 5%igen Lösung der Tapiokastärke sowie der Stärkepropylphosphonate mit einem DS von 0,23, 0,62 und 1,19 in Ringerlösung mittels Onkometer überprüft. Des Weiteren wurde der kristalloidosmotische Druck der Versuchslösungen in Matrix gemessen und ebenfalls graphisch dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 (a: kristalloidosmotischer Druck, b: kolloidosmotischer Druck) dargestellt und bestätigen die Vermutung, dass der kolloidosmotische Druck und der kristalloidosmotische Druck der Tapiokastärke K4484 mit steigendem Substitutionsgrad in der Versuchslösung zunimmt.

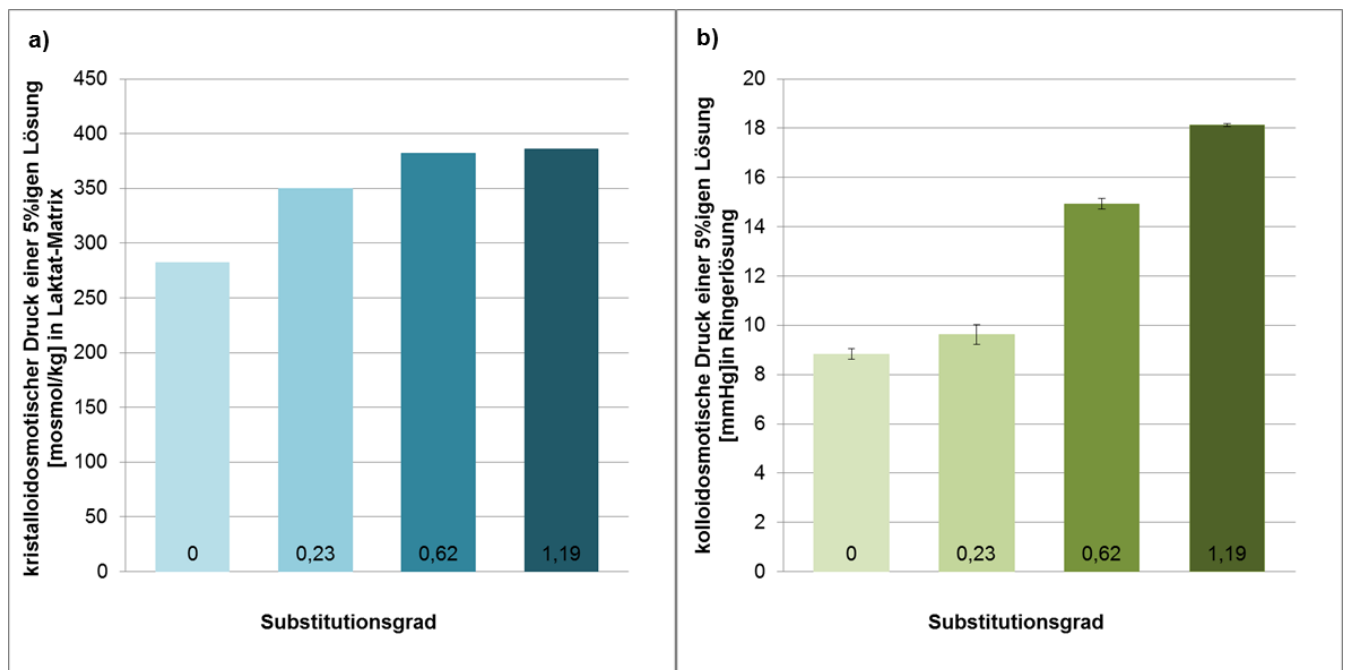


Abbildung 51: Kristalloidosmotischer Druck (a) und kolloidosmotischer Druck (b) in Abhängigkeit des Substitutionsgrades bei Tapioka K4484 als Stärkepropylphosphonate.

Anhand der Ergebnisse wird ersichtlich, dass der kristalloidosmotische Druck mit steigendem DS in den Versuchslösungen zunimmt. Mögliche Ursache hierfür könnte allerdings auch die erhöhte Ionenkonzentration bedingt durch die pH Wert Einstellung durch Natronlauge in der Versuchslösung sein. Je höher der DS, desto niedriger ist der Start-pH-Wert der Versuchslösung, desto mehr Natronlauge war notwendig, um einen pH Wert von 6,4 einzustellen. Betrachtet man die Ergebnisse des kolloidosmotischen Druckes, so erkennt man, dass reine Tapiokastärke als 5%ige Lösung einen kolloidosmotischen Druck von ca. 8,8 mmHg aufweist, hingegen das Stärkepropylphosphonat mit einem DS von 1,19 einen kolloidosmotischen Druck von ca. 18 mmHg.

Im Rahmen dieses Kapitels wurde nun die Ergebnisse des 1-Poren in vitro Modells genauer erläutert, bezüglich des Wassertransportes an den kleinen Poren des Peritoneums, im Rahmen des nächsten Kapitels finden nun eine genaue Analyse des Wassertransportes an einer Aquaporinmembran statt.

6 Experimenteller Teil *in vitro* Testsystem B

Mit *in vitro* Testsystem B wird die Ultrafiltration an Aquaporinen analysiert, es basiert also auf dem 1-Porenmodell. Obwohl die Aquaporinmembran selektiv für den Transport von Wasser ist, die Wirkung also eher eine Umkehrosmosemembran ist, wird der Begriff Ultrafiltration verwendet. Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien und Methoden für die Versuchsreihen genauer beschrieben.

6.1 Material

Für die Ultrafiltrationsversuche in *in vitro* Testsystem B werden Aquaporinmembranen verwendet, deren Aufbau im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird. Neben den bereits beschriebenen Substanzen Glucose und Polyglucose, zum Test derer osmotischer Aktivität mit Testsystem B, werden Polyethylenglycole in verschiedenen molaren Massen eingesetzt.

6.1.1 Aquaporinmembran

Die Aquaporinmembran für die Ultrafiltrationsversuche mit *in vitro* Testsystem B werden von der dänischen Firma Aquaporin A/S bezogen. Die Membran besitzt eine Breite von ca. 5,5 cm, eine Länge von ca. 11 cm und eine Dicke von 110 µm. Aquaporinmembranen werden auch als biomimetische Membranen bezeichnet, da hier eine technische Realisierung des Wassertransportes durch Aquaporinkanäle, welche in natürlichen Organismen vorkommen, stattfindet.

Die verwendete Aquaporinmembran enthält AquaporinZ-haltige Vesikel, welche durch ein Grenzflächenpolymerisationsverfahren in die Polyamidschicht eingebaut werden. Der Einbau dieser Vesikel findet auf einer Seite der Membran statt, welche auch als aktive Seite bezeichnet wird. Die Expression von AquaporinZ findet mit Hilfe von *E. coli* statt.^[83]

Laut Angabe von Aquaporin A/S kann die Membran bis zu einem halben Jahr verwendet werden. Die Membran muss nach jedem Experiment mehrfach mit destilliertem Wasser gespült und in destilliertem Wasser in der Kammer gelagert werden. Die Membran kann allgemein in einem Temperaturbereich von 5-50 °C sowie in einem pH-Bereich von 2-11 eingesetzt werden.^[84]

6.1.2 Modellsubstanzen zum Test der osmotischen Aktivität

Zusätzlich zu Glucose und Polyglucose werden Polyethylenglycole in den Ultrafiltrationsexperimenten mit der Aquaporinmembran verwendet. Polyethylenglycol (PEG) ist ein wasserlösliches Polymer und wird als nicht-toxisch eingestuft. Im pharmazeutischen Bereich ist PEG auch unter der Bezeichnung Macrogol bekannt, es kann im flüssigen Zustand noch mehr Wasser aufnehmen, ist somit hygroskopisch und wird als Abführmittel eingesetzt. Die Synthese von PEG erfolgt durch eine Polymerisation von Ethylenoxid. Die Bezeichnung der Substanz ist abhängig von der molaren Masse. Polymere mit einer molaren Masse kleiner als 20000 g/mol werden als Polyethylenglycol bezeichnet, mit einer molaren Masse größer als 20000 g/mol als Polyethylenoxid (PEO).^{[85],[86]}

Um den Effekt der Molekülgröße bzw. -anzahl an einer Aquaporinmembran zu testen, werden Polyethylenglycole (Fa. Merck Millipore) in unterschiedlichen molaren Massen verwendet. Die verwendeten Polyethylenglycole mit den entsprechenden molaren Massenbereichen (Herstellerangaben) sind Tabelle 10 zu entnehmen. Wie in Tabelle 10 zu erkennen, besitzen Polyethylenglycole eine enge molare Massenverteilung.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Polyethylenglycole in *in vitro* Testsystem B.

Substanz	Molarer Massenbereich [g/mol]
PEG 400	380-420
PEG 1000	950-1050
PEG 2000	1900-2200
PEG 3000	2700-3300
PEG 4000	3500-4500
PEG 6000	5000-7000
PEG 10.000	9000-12.500
PEG 20.000	~ 20.000

6.2 Methoden

Die in diesem Methodenteil beschriebenen UF-Versuche werden durchgeführt, um den Fluss an einer Aquaporinmembran bei unterschiedlichen Modellsubstanzen zu bestimmen und mit einer üblichen UF-Membran zu vergleichen. Im Vergleich zu den statischen Versuchen mit Testsystem A wurden die Lösungen im Testsystem B zirkuliert, da dies die Funktionsweise einer Niere besser nachbildet. Testsystem A ist angelehnt an die klassische CAPD, jedoch ohne eine Zirkulation des Blutkreislaufes. Testsystem B ist angelehnt an die künstliche Niere, an das Dialysatoren Prinzip.

6.2.1 Ultrafiltrationsversuche zur Bestimmung der osmotischen Aktivität von Modellsubstanzen an einer Aquaporinmembran

In vitro Testsystem B besteht aus einer sogenannten *cross flow cell* aus Acrylglas (CF042A, Fa. Sterlitech) für osmotische Versuche sowie der darin eingebauten Aquaporinmembran (AIMTM 60, Fa. Aquaporin A/S).

Mit Hilfe der Aquaporinmembran wird der Wassertransport aufgrund eines osmotischen Gradienten unter Laborbedingungen bestimmt. Das Testsystem simuliert somit die „Ultrafiltrationsleistung“ an den ultrakleinen Poren, welche im 3-Poren-Modell von B. Rippe beschrieben sind.

Wie bereits erwähnt, wird aus Gründen der Einheitlichkeit hier trotzdem der im technischen Sinne nicht ganz korrekte Begriff der Ultrafiltration verwendet. Wie bereits im Theorieteil erwähnt, sind Aquaporine lediglich durchlässig für Wassermoleküle. Der Ultrafiltrationsfluss oder die Leistung ist laut 3-Poren-Modell nur abhängig vom kristalloidosmotischen Druck, also der Teilchenanzahl. Im Testsystem werden zwei Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Konzentration parallel an der Aquaporinmembran vorbei geleitet und es findet Wassertransport über die Membran in Richtung der höheren Teilchenanzahl statt (siehe Abbildung 52).

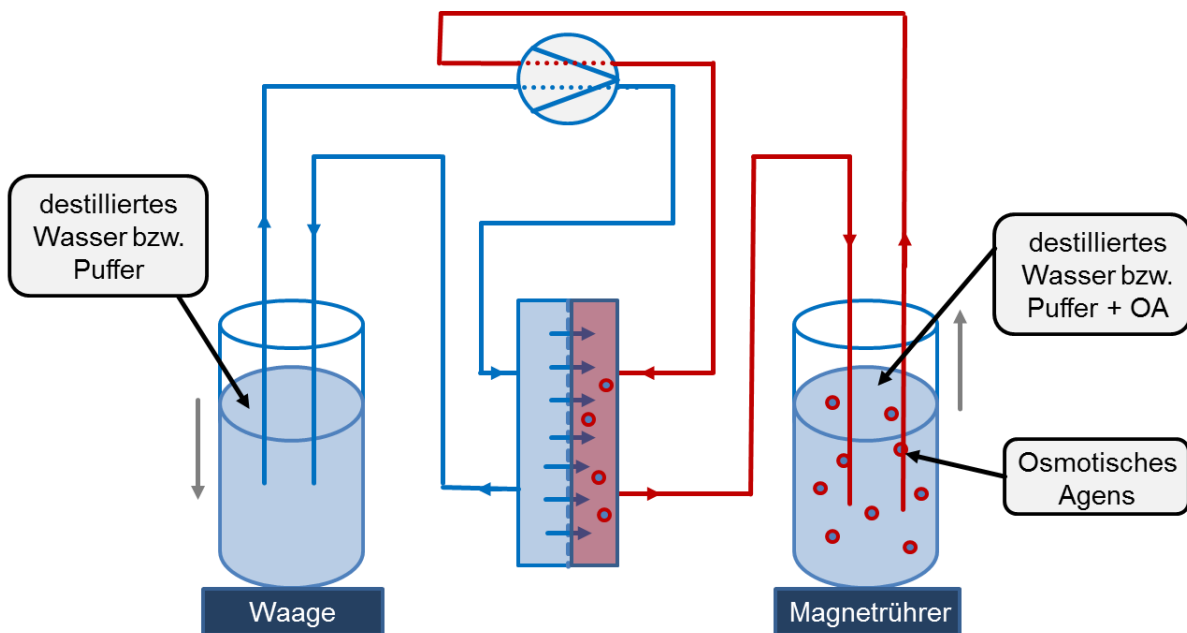


Abbildung 52: Schematischer Aufbau *in vitro* Testaufbau B.

Für den Testaufbau wird eine Schlauchpumpe (MCP Standard, Fa. Ismatec) mit einem 2-Kanal-Pumpkopf (SB-2V, Fa. Ismatec) sowie Tygonschläuche (Tygon Standard LMT-55, Ismatec) mit einem Innendurchmesser von 4,8 mm und einer Wandstärke von 1,6 mm verwendet. Die Schlauchsysteme, welche die beiden Lösungen parallel an der Membran vorbei leiten, sind auf gleiche Längen zugeschnitten, sodass in beiden Kreisläufen die gleichen Volumina zirkulieren.

Die Schläuche der beiden Kreisläufe wurden soweit möglich parallel mit Hilfe von Stativstangen verlegt, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass ein Einfluss einer zusätzlichen hydrostatischen Druckdifferenz ausgeschlossen werden kann. Die konzentrierte Lösung wurde mit einem Magnetrührer (RET control/t, Fa. IKA) gerührt (in Abbildung 53 rechts). Auf dem Magnetrührer wird eine 500 ml Schottflasche mit 400 ml destilliertem Wasser bzw. Matrix platziert, um die osmotische Substanz zu Beginn des Versuches darin aufzulösen. Auf der linken Seite der Pumpe steht eine Präzisionswaage (XS 6002 S, Fa. Mettler Toledo), auf welcher ebenfalls eine 500 ml Schottflasche mit 400 ml Lösungsmittel platziert ist (siehe Abbildung 53). Die Waage ist an einen Computer angeschlossen, sodass das Gewicht auf der Waage mittels Softwareprogramm (BalanceLink, Mettler Toledo) aufgezeichnet werden kann.



Abbildung 53: Versuchsaufbau *in vitro* Testsetup B.

Laut Angaben vom Hersteller, soll die Membran vor Verwendung für mindestens 30 Minuten in destilliertem Wasser gelagert werden. Nachdem anschließend mit Hilfe von einem Locheisen (5 mm) zwei Aussparungen in die Membran eingestanzt werden, kann diese in die dazugehörige Kammer (CF042) von Sterlitech eingebaut werden.

Zu Beginn des Versuches wird überprüft, ob die Membran „sauber“ ist und keine Ultrafiltration über die Membran stattfindet, indem auf beiden Seiten destilliertes Wasser oder Laktat Matrixlösung vorbei gepumpt wird. Eventuelle Rückstände von Testsubstanzen oder Luftblasen im System oder an der Membran können eine Gewichtsänderung bewirken. Wird an der Waage keine Gewichtsänderung angezeigt, so kann der eigentliche Versuch gestartet werden.

Das Pumpsystem wird zu Beginn gestoppt und über einen Trichter eine definierte Menge an osmotischen Agens in die Schottflasche auf dem Magnetrührer (150 rpm) gegeben und die Substanz gelöst.

In Vorversuchen wurden zwei unterschiedliche Methoden der Zugabe des osmotischen Agens durchgeführt. Zum einen wurde Substanz als Rohmaterial (Feststoff) über einen Trichter hinzugegeben und zum anderen eine höherkonzentrierte Lösung in einem definierten Volumen, um somit die gleiche Konzentration zu erhalten. Da die Versuchsergebnisse identisch waren, wurde für die Versuchsdurchführung die Zugabe der Rohsubstanz als Feststoff gewählt.

Nachdem die Substanz gelöst ist, wird die Waage auf „0“ tariert, die automatische Gewichtsaufzeichnung (im Abstand von 5 Minuten, über 5 Stunden) mittels BalanceLink gestartet und die Pumpe wieder eingeschaltet. Die Pumpgeschwindigkeit beträgt 15 rpm, wodurch ein Volumenstrom von ca. 30 ml pro Minute erreicht wird, der in Vorversuchen bestimmt wurde. Im Rahmen von Vorversuche, wurde des Weiteren überprüft, ob eine Variation der Pumpgeschwindigkeit einen Effekt auf die Ultrafiltration ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass bei gleichbleibender Glucosekonzentration von 5% und einer Variation der Umdrehungsgeschwindigkeit (3,8 rpm, 7,5 rpm, 15 rpm, 22,5 rpm und 30 rpm) kein Effekt auf die Ultrafiltration ausgeübt wird. Somit wurde in den folgenden Versuchen ein Fluss von 30 ml pro Minute eingestellt, was vom Hersteller Aquaporin A/S für Ultrafiltrationsversuche mit der AIMTM60 ebenfalls empfohlen wurde.

Auf Seite der Lösung ohne osmotisches Agens nimmt das Volumen im Kreislauf aufgrund des Filtratflusses über die Membran ab. Als Ergebnis erhält eine Gewichtsabnahme auf der Seite der Präzisionswaage, wodurch man eine Aussage über den Fluss [g/min] über die Membran treffen kann. Während der Ultrafiltrationsversuche ist es gewünscht die höchste Selektivität zu erhalten, das heißt einen Unterschied im Fluss bei Verwendung unterschiedlicher osmotischer Agenzien zu detektieren. Aus diesem Grund wurde die Membran, laut Empfehlung vom Hersteller mit der aktiven Seite immer in Richtung des destillierten Wasser eingebaut.

Im Gegensatz zu den Versuchen bei Testsystem A finden die Versuche bei Raumtemperatur statt und nicht im auf 37 °C temperierten Wasserbad. Im Rahmen von weiteren Vorversuchen wurde außerdem überprüft, ob die in der Matrix befindlichen Ionen und Glucose durch die Membran diffundieren können. Das Ergebnis bestätigte die Aussage, dass die Membran lediglich permeabel für Wasser ist.

7 Ergebnisse und Diskussion *in vitro* Testsystem B

Im Rahmen der UF-Versuche mit *in vitro* Testsystem B und der darin eingebauten Aquaporinmembran wurden verschiedene Versuchsparameter variiert. Als Beurteilungskriterium der Ultrafiltrationsleistung ist wie bereits erwähnt vom technischen Gesichtspunkt nicht ganz korrekt, da es sich um Membranen handelt, die selektiv für den Wassertransport sind und somit eher eine Umkehrosmosemembran. In der Literatur zum Thema Peritonealdialyse wird jedoch der Begriff Ultrafiltration auch für Aquaporinmembranen bzw. Aquaporine verwendet. Vor Beginn der Versuchsreihen wurde mit Hilfe einer 1 molaren NaCl Lösung die Regeneration der Membran überprüft. Es wurde der Fluss über die Membran an drei verschiedenen Versuchstagen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Es wird ersichtlich, dass eine Regeneration der Membran zwischen den Versuchen stattfindet, da keine tendenzielle Zu- oder Abnahme an den drei verschiedenen Versuchstagen zu detektieren ist.

Tabelle 11: Überprüfung der Regeneration der Aquaporinmembran mit Hilfe von NaCl.

Versuchsdatum	Fluss	Mittelwert	SD
	[g/30 cm ² /h]		
29.04.2014	16,5	16,60	0,15
30.04.2014	16,8		
05.05.2014	16,5		

7.1 Einfluss der molaren Masse bei konstanter Teilchenanzahl auf die Ultrafiltrationsleistung

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Wasserfluss über Aquaporinkanäle proportional zur Differenz der Teilchenanzahl bzw. abhängig vom Unterschied in der Osmolarität ist.^[87]

Diese Aussage soll in Bezug auf die verwendeten Aquaporinmembranen überprüft werden, indem als Modellsubstanz Polyethylenglycole in unterschiedlichen molaren Massen eingesetzt werden. Um zu überprüfen, ob lediglich die molare Konzentrationsdifferenz sich auf den Filtratfluss auswirkt, werden die in Tabelle 10 aufgelisteten PEGs als osmotische Agenzien bei den Versuchen in *in vitro* Testsystem B in äquimolarer Konzentration von jeweils 10 mmol/l eingesetzt. PEG zeichnet sich durch eine enge molare Massenverteilung aus, sodass jeweils der nominale Wert des PEGs verwendet wird, um die benötigte Einwaage zu berechnen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht über verwendeten PEGs, Konzentration [%] und Einwaage für 400 ml bei einer molaren Konzentration von 10 mmol/l.

Polyethylenglycole [g/mol]	Konzentration [%]	Einwaage [g] für 400 ml
400	0,4	1,6
1000	1	4
2000	2	8
3000	3	12
4000	4	16
6000	6	24
10.000	10	40

Entsprechend der Versuchsdurchführung (siehe Kapitel 6.2.1) wird die entsprechende Menge an PEG über einen Trichter bei Versuchsbeginn hinzugegeben und gelöst. In Abbildung 54 sind die Ergebnisse mit den verwendeten PEGs zwischen 400 g/mol und 10.000 g/mol dargestellt. Hier wird die UF-Leistung durch die Abnahme an Wasser im Außenmedium detektiert und nicht als Gewichtszunahme im Innenmedium (Vergleich *in vitro* Testsystem A). Es ist für jedes PEG die hervorgerufene Gewichtsänderung zwischen dem Zeitraum von 2 bis 4 Stunden dargestellt (Abbildung 54 a). Zu Beginn des Versuches ist die Reproduzierbarkeit nicht so gut, da sich zum Start des Versuches die Substanz erst gleichmäßig im Kreislauf verteilen muss, sodass jeweils immer der mittlere Bereich der Daten für die Auswertung gewählt wird.

Zusätzlich ist in Abbildung 54 b der Mittelwert sowie die Standardabweichung der dargestellten Versuche unter Verwendung der unterschiedlichen PEGs dargestellt. Der Fluss beträgt im Durchschnitt 0,0058 g/min mit einer Standardabweichung von 0,001 g/min.

Anhand der dargestellten Ergebnisse in Form der experimentellen Daten sowie der Geradengleichungen, kann man erkennen, dass bei einer gleichen Differenz in der Teilchenanzahl eine nahezu gleiche UF über die Aquaporinmembran erzeugt wird.

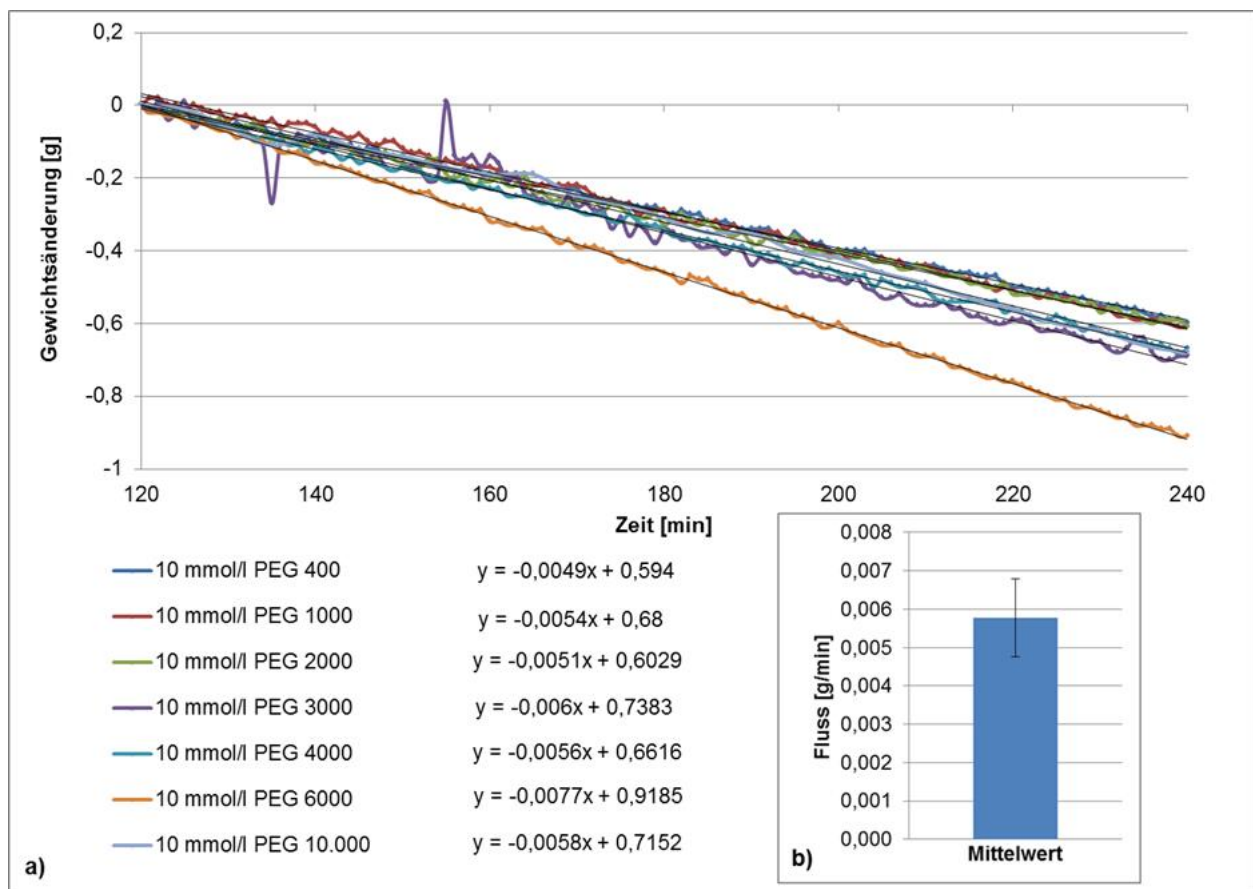


Abbildung 54: Ultrafiltrationsversuche mit Polyethylenglycolen unterschiedlicher molarer Masse bei gleicher Teilchenanzahl in Wasser (a: Darstellung der Gewichtsänderung über die Zeit unter Verwendung der einzelnen Testsubstanzen; b: Mittelwert der Flüsse).

Die Versuche wurden alle mit der gleichen Membran durchgeführt und zwischen den Versuchen mit destilliertem Wasser gespült, sodass mögliche Rückstände von PEG entfernt wurden. Im Mittel beträgt der Fluss über die Membran bei einer 10 mmol/l Konzentration 5,8 mg/min (+/- 1 mg/min) bzw. 0,35 g/h.

7.2 Ultrafiltrationsversuche mit Glucose und Polyglucose in variierender Teilchen- sowie Massenkonzentration an einer Aquaporinmembran

Hinsichtlich der Wassertransportrate über Aquaporine während der Peritonealdialyse ist es von Interesse den Effekt von Glucose sowie Icodextrin als kommerziell erhältliche osmotische Agenzien zu testen. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Icodextrin aufgrund seiner großen Molekülgröße und somit niedrigen molaren Konzentration einen vernachlässigbaren Effekt auf die UF über Aquaporinkanäle ausübt.^[88] Um die Ultrafiltrationsleistung von Glucose und Icodextrin zu vergleichen, wurde zum einen eine 5%ige Icodextrinlösung in Wasser gegen Wasser verwendet. Als Vergleich wurde zum anderen eine äquimolare Konzentration von Glucose eingesetzt (0,0083 mol/l) sowie eine 5%ige Glucoselösung (0,277 mol/l) in Wasser gegen Wasser.

In Abbildung 55 sind die experimentellen Ergebnisse der drei verschiedenen Testlösungen dargestellt. Es ist jeweils die Gewichtsänderung [g] über einen Zeitraum von zwei Stunden zwischen 120 und 240 min dargestellt.

Man kann anhand der Ergebnisse erkennen, dass eine 5%ige Icodextrinlösung im Vergleich zu einer 5%igen Glucoselösung eine nur sehr geringe UF-Leistung über die verwendete Aquaporinmembran erzeugt. Es ist außerdem ersichtlich, dass bei Verwendung einer gleichen Teilchenanzahl (0,0083 mol/l) unabhängig vom Rohstoff, der gleiche Fluss von ca. 0,25 g/h erzeugt wird. Der Fluss über die Membran bei einer 5%igen Glucoselösung beträgt hingegen 3,75 g/h, also ca. das 15fache von dem Fluss einer Lösung mit einer Konzentration von 8,3 mmol/l.

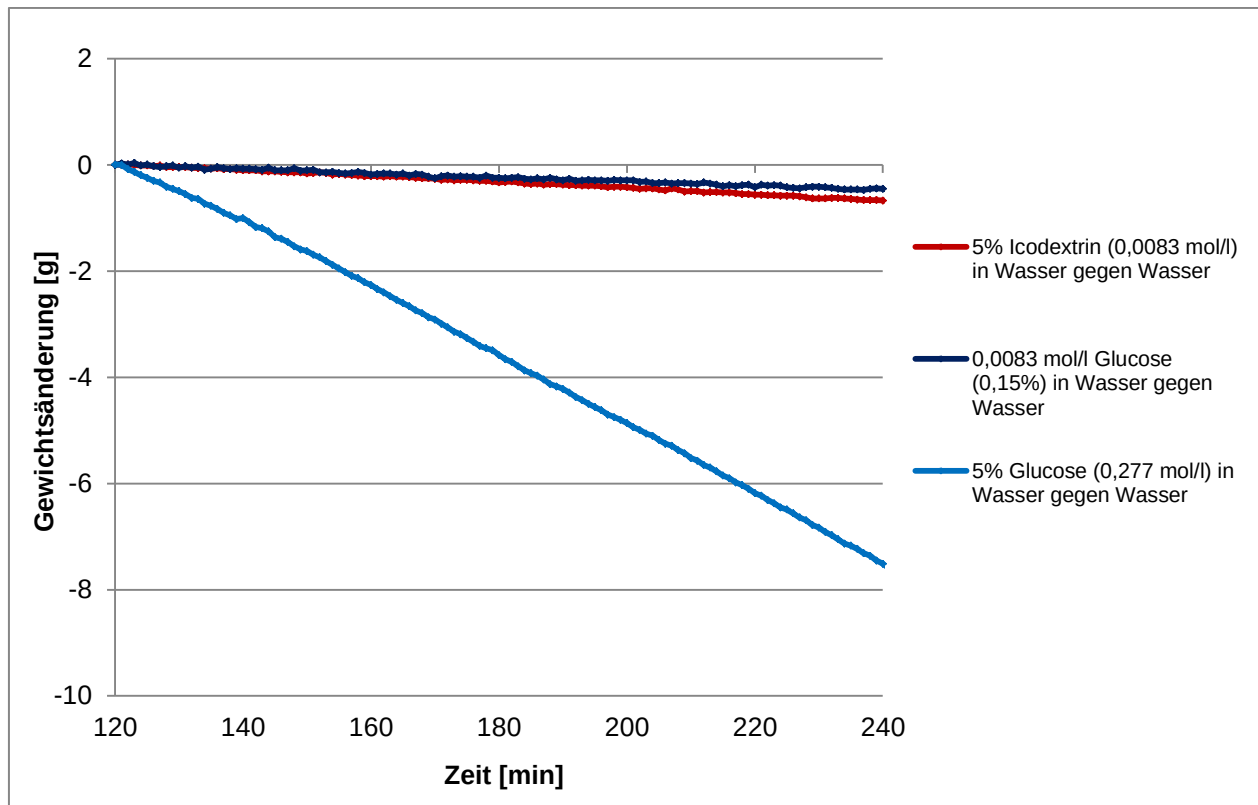


Abbildung 55: Ultrafiltrationsversuche an einer Aquaporinmembran mit Glucose und Icodextrin im Vergleich.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird deutlich, dass bei Verwendung einer Icodextrinlösung der Fluss über die Aquaporinmembran im Vergleich zu einer Glucoselösung nahezu vernachlässigbar ist. Diese Ergebnisse bestätigen nochmals die bereits dargestellte Gesetzmäßigkeit aus Kapitel 7.1, dass der Fluss über eine Aquaporinmembran, bzw. über die Aquaporinkanäle von der Teilchenanzahl also der kristalloidosmotischen Druckdifferenz und nicht von kolloidosmotischen Effekten abhängig ist. Somit müsste der anteilige Fluss über die Aquaporinmembran während der Dialysebehandlung stark von der eingesetzten Glucosekonzentration abhängig sein. Diese Abhängigkeit des transmembranen Flusses von der Glucosekonzentration, werden in weiteren Versuchsreihen (siehe Kapitel 7.3) genauer analysiert.

7.3 Einfluss von Wasser und Lösungsmatrix auf die Ultrafiltration bei Aquaporinen

In einer weiteren Versuchsreihe mit Hilfe von *in vitro* Testsystem B und der verwendeten Aquaporinmembran soll der Effekt verschiedener Glucosekonzentrationen zum einen in Wasser gegen Wasser aber auch in der Standardlaktat Matrix gegen Laktat Matrix analysiert werden. In dem Versuchsprogramm wurden Glucosekonzentrationen von 0,625%, 1,25%, 2,5% und 5% verwendet, von jedem Versuch eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung berechnet. In der Auswertung wird jeweils der Fluss über die Membran [g/min] berechnet über einen Versuchszeitraum von 0 bis 165 Minuten, da sich hier im Vergleich zu den Versuchen mit PEG keine Schwankungen zu Beginn des Versuches zeigten.

Zur Durchführung der Versuche werden zwei verschiedene Versuchsdesigns gewählt. Es werden zum einen die UF Versuche in einer geordneten Reihenfolge durchgeführt, beginnend mit der geringsten Glucosekonzentration in Wasser. Die Versuche werden nach steigender Glucosekonzentration durchgeführt und anschließend die Versuche in Matrix gegen Matrix wieder beginnend mit der geringsten Glucosekonzentration. Das komplette Versuchsprogramm wird mit der gleichen Membrancharge (S0248) durchgeführt. Zwischen den Versuchen wurde die Membran jeweils gespült.

In einem zweiten Schritt wurde mittels Minitab hinsichtlich Lösemittel und Glucosekonzentration ein komplett randomisiertes Versuchsprogramm aufgestellt und anschließend die Versuche durchgeführt. Ziel des Randomisierens ist es eine Sekundärkorrelation zu vermeiden, sondern den tatsächlichen Effekt jeder Einflussgröße auf die Zielgröße zu erreichen.^[89] Alle randomisierten Versuche wurden mit der gleichen Membrancharge (S0263) durchgeführt.

Um den Effekt einer geringeren bzw. höheren Glucosekonzentration zu analysieren und ein eventuelles Maximum in der UF zu detektieren wurden nachträglich UF Versuche mit 0,3125%ige und 10%ige Glucoselösungen in Wasser und Matrix (nicht randomisiert, Membrancharge S0263) durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 56 dargestellt.

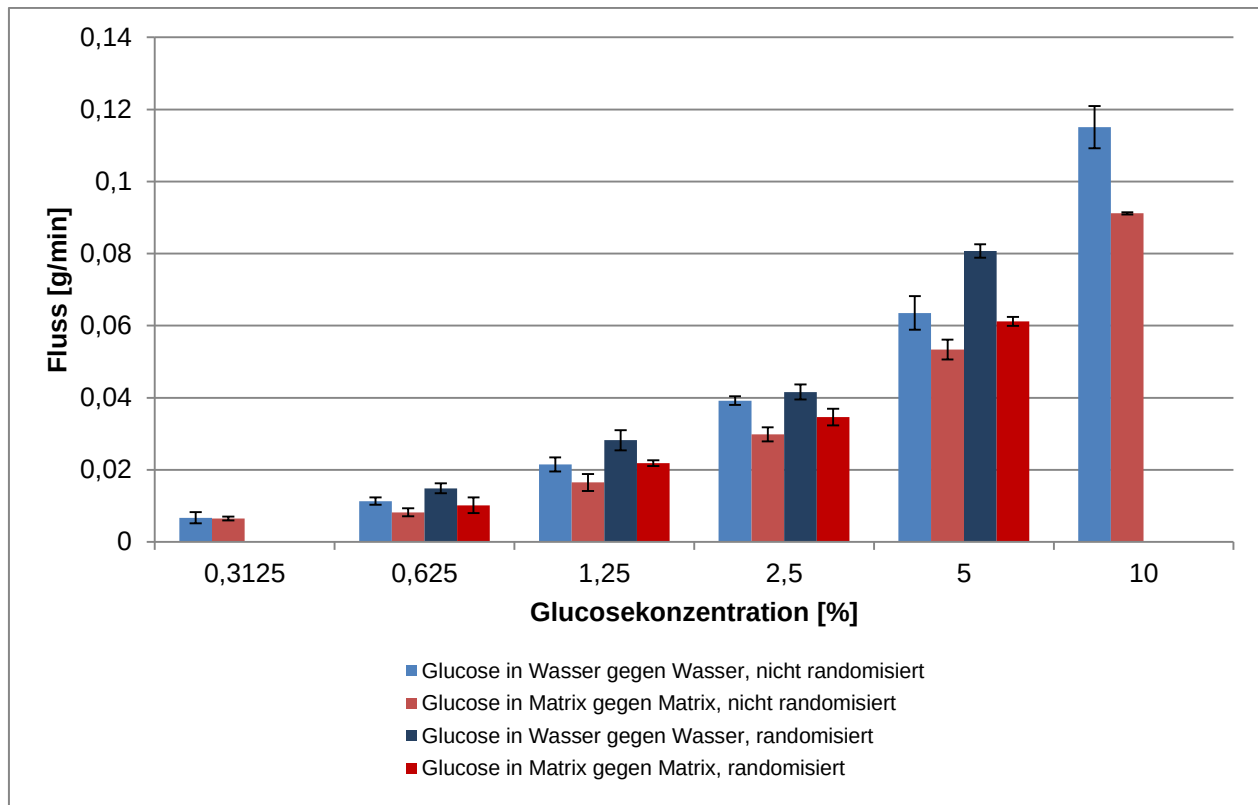


Abbildung 56: Fluss [g/min] über die Glucosekonzentration [%] für jeweils Versuche in Wasser und Matrix nach dem nicht randomisierten und randomisierten Versuchsprogramm.

In Abbildung 56 wird deutlich, dass durch eine steigende Glucosekonzentration, in Wasser als auch in Matrix, unabhängig ob randomisiert oder nicht randomisiert ein steigender Fluss über die Membran erzielt wird. Vergleicht man jeweils die Versuche bei einer gleichen Glucosekonzentration, so kann man feststellen, dass jeweils der Fluss in Wasser, egal ob randomisiert oder nicht, im Vergleich zu Matrix höher ist. Diese Differenz wird mit steigender Glucosekonzentration immer stärker ausgeprägt. Betrachtet man die Ergebnisse in Wasser und Matrix der 0,3125%igen Lösung im Vergleich zur 10%igen Lösung, so liegt bei den 0,3125%igen Lösungen eine Differenz im Fluss von 0,0002 g/min vor, hingegen bei den 10%igen Lösungen eine Differenz von 0,0239 g/min, also ca. das 120fache. Dieser Effekt könnte an der unterschiedlichen osmotischen Differenz, also einer unterschiedlich hohen Aufkonzentrierung während der Versuche in Wasser und Matrix liegen.

Hinzu kommt, dass sich während des Versuches auf Seiten der Waage (Außenmedium) weiter auf konzentriert haben könnte, da nur Wasser die Membran passieren kann. Bei dem Versuch mit Wasser als Lösungsmittel bleibt der osmotische Druck auf der Seite der Waage während des Versuches 0. Auf der Seite des Magnetrührers findet während beiden Versuchen (Wasser und Matrix) eine Verdünnung statt. Die osmotische Druckdifferenz nimmt also bei den Versuchen in Wasser weniger schnell ab, wodurch ein höherer Fluss über die Membran erzeugt wird.

Um diesen Effekt zu überprüfen, wurden zwei weitere Versuche durchgeführt, bei dem zum einen 5% Glucose in Wasser gegen Wasser eingesetzt und in einem weiteren Versuch 5% Glucose in Matrix gegen Matrix eingesetzt wurde. Über einen Zeitraum von 4 Stunden wurde jeweils stündlich eine Probe auf Seiten der Waage sowie des Magnetrührers entnommen und die Osmolalität [mosmol/kg] gemessen. In Abbildung 57 sind die Verläufe der Gewichtsänderungen beider Versuche über eine Zeit von 4 Stunden dargestellt.

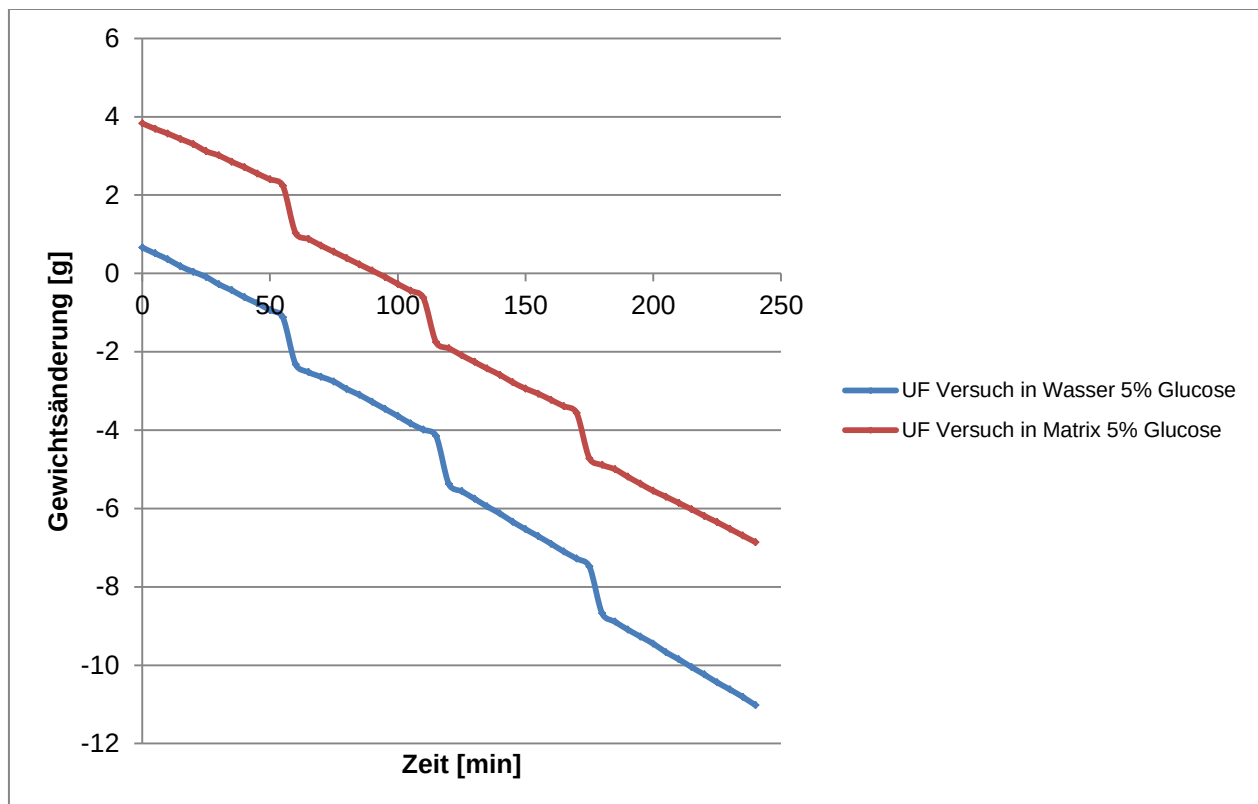


Abbildung 57: Gewichtsänderung [g] gegen die Zeit [min] für UF Versuche in Wasser und Matrix bei einer Glucosekonzentration von 5%, Membrancharge S0368.

Die Sprünge in der Gewichtsänderung korrespondieren mit dem Zeitpunkt der Probenahme zur Messung der Osmolalität. Anhand der Gewichtsänderungen über die Zeit wurde jeweils für den Versuch in Wasser als auch in Matrix die Steigungen berechnet, zum einen getrennt für die jeweiligen 4 Zeitabschnitte als auch die Steigung für die 5 min Messintervalle. Es wurde anhand der Ergebnisse deutlich (Daten nicht gezeigt), dass die Steigung (Fluss [g/min]) schon direkt zu Beginn bei den Versuchen in Wasser im Durchschnitt höher ist, als in Matrixlösung. Es wurde zusätzlich jeweils auf beiden Seiten des Versuchsaufbaus eine Probe genommen, die Osmolalität durch Doppelbestimmung gemessen und die Differenz bei beiden Versuchsdurchführungen berechnet und in Abbildung 58 aufgetragen, um eine mögliche unterschiedliche Aufkonzentrierung zu detektieren.

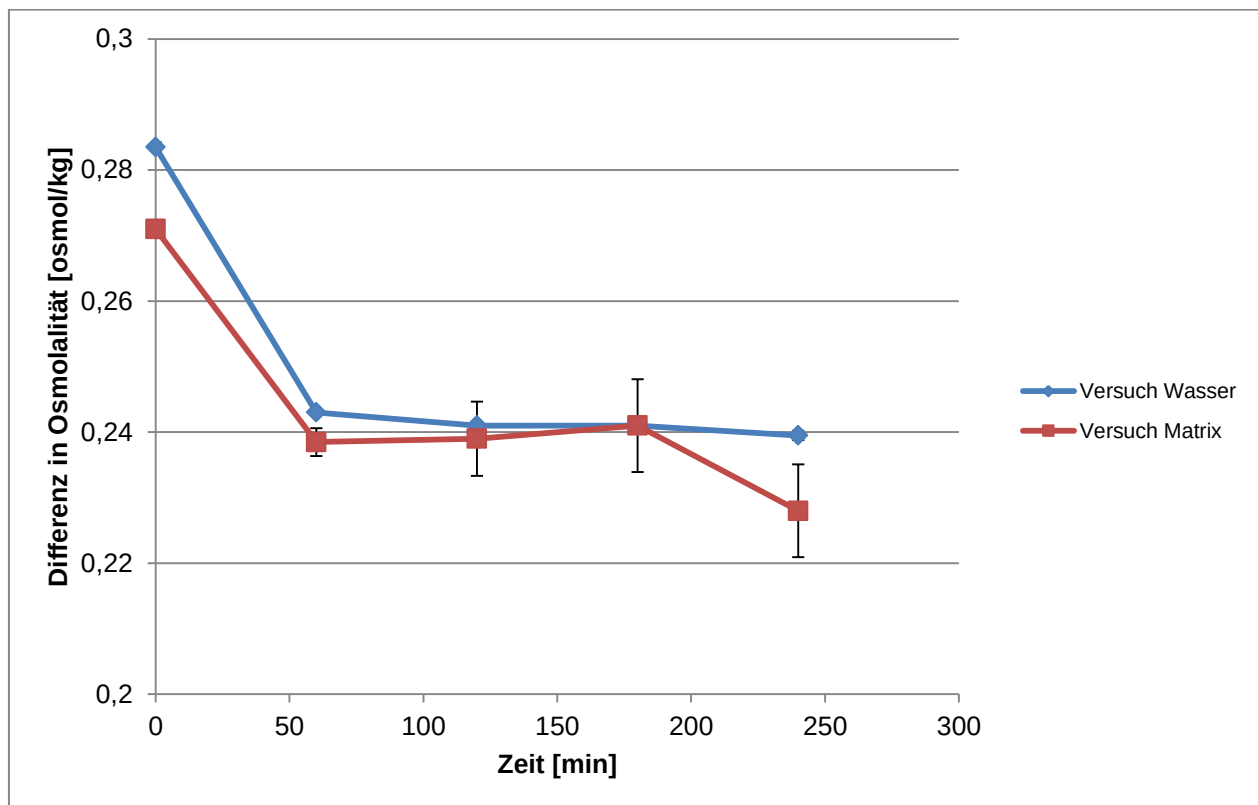


Abbildung 58: Differenz der Osmolalität [osmol/kg] gegen die Zeit [min] für die UF Versuche in Wasser und Matrix bei einer Glucosekonzentration von 5%, Membrancharge S0368.

Wie anhand der Ergebnisse ersichtlich, nimmt die Differenz in der Osmolalität während der Versuchsdauer innerhalb der ersten 60 min von 0,27 osmol/kg auf 0,24 mosmol/kg bei beiden Versuchen gleich stark ab. Die Differenz im osmotischen Druck bleibt bei den Versuchen gleich stark aufrecht erhalten, bzw. der Effekt der „Aufkonzentrierung“ der Matrixlösung ist vernachlässigbar gering im Vergleich zur osmotischen Druckdifferenz, hervorgerufen durch die Konzentration an Glucose. Anhand von Abbildung 56 wurde deutlich, dass die absolute Differenz des Flusses zwischen Versuchen in Matrix und Wasser mit steigender Glucosekonzentration ansteigt. Um diesen Effekt jedoch nochmals genauer zu eruieren, wurde in einer weiteren Auswertung der Fluss bei den Versuchen mit Matrixlösungen im Verhältnis zum Wasserfluss bei den Versuchen mit Wasser gesetzt. Unter der Annahme, dass der Fluss bei einem Versuch in Wasser 100% entspricht, wurde der prozentuale Fluss in Matrix für die verschiedenen Glucosekonzentration berechnet, die Ergebnisse sind in Abbildung 59 dargestellt.

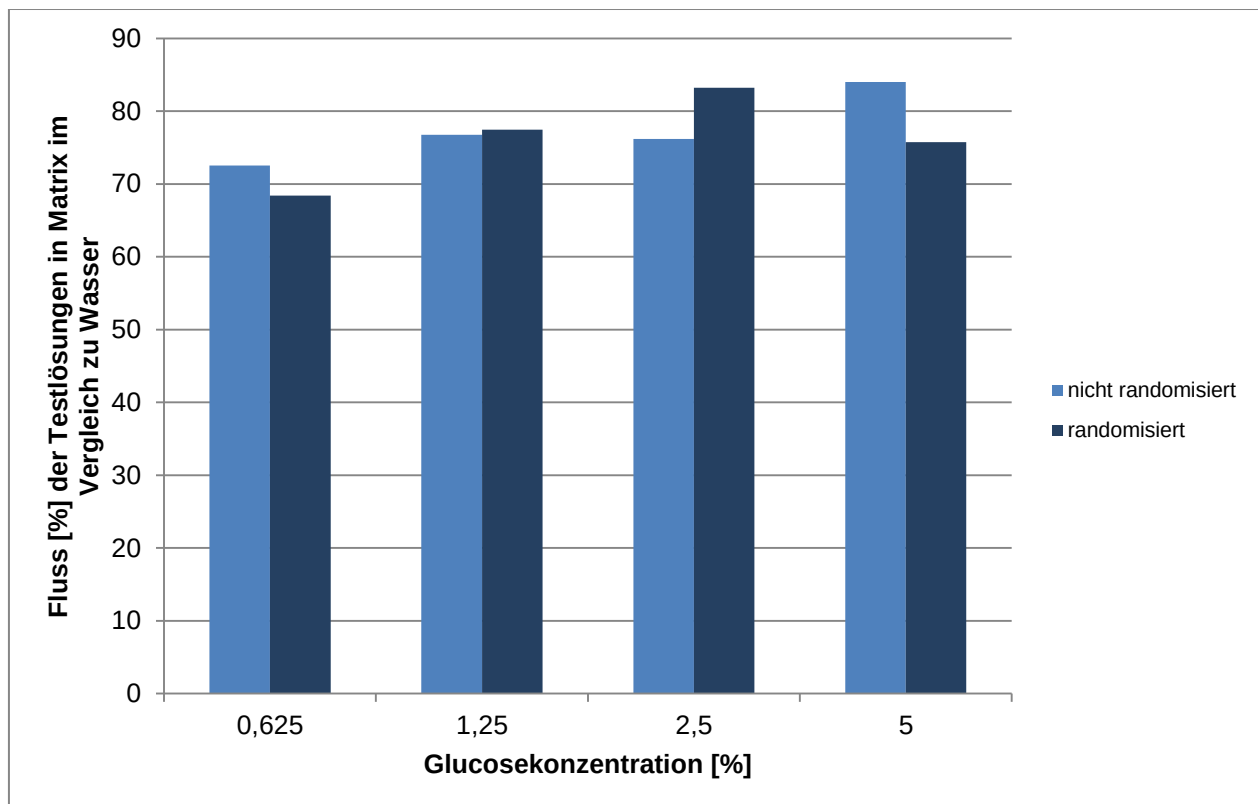


Abbildung 59: Fluss [%] der Testlösungen in Matrix im Vergleich zu Wasser unter Verwendung der verschiedenen Glucosekonzentrationen (randomisierte und nicht randomisierte Versuchsdurchführung).

Man kann anhand der Ergebnisse erkennen, dass der Fluss von Wasser unter Verwendung der Laktat Matrix, unabhängig vom Versuchsplan und unabhängig von der Glucosekonzentration, ca. 70 bis 80% des Flusses bei Wasser beträgt.

Tendenziell liegen die Flüsse während der randomisierten Versuchsdurchführung insgesamt höher als bei nicht randomisierten, was aber auch an der Verwendung einer unterschiedlichen Membrancharge liegen könnte. Dieser Effekt wird in weiteren Versuchsauswertungen (siehe Abbildung 60) nochmals genauer erläutert.

Eine weitere mögliche Erklärung für den unterschiedlichen Fluss zwischen den beiden Lösungsmitteln Wasser und Laktat Matrix mit einer entsprechenden Glucosekonzentration könnte die sogenannte Konzentrationspolarisation auf der Zulaufseite der Membran sein.

Allgemein kann bei Membrantrennverfahren sich eine Deckschicht an der Membran aufbauen und als zusätzlicher Widerstand wirken. Dies würde allerdings ein Aufbauen der Deckschicht voraussetzen, wodurch eine zeitliche Veränderung des Flusses über die Membran messbar gewesen wäre. Eine Deckschicht baut sich beim Membrantrennverfahren außerdem hauptsächlich bei der „*dead end*“ Filtration, der klassischen Filtrationsart auf. In dem hier verwendeten Testsystem wurde jedoch eine Querstromfiltration verwendet, was ein Aufbauen eines Filterkuchens verhindert. Eine Konzentrationspolarisation wäre hier eine mögliche Erklärung und könnte sich auf den Fluss an einer Membran direkt zum Versuchsstart bemerkbar machen. Bei der Konzentrationspolarisation besteht an der Membran eine erhöhte Konzentration einer Substanz, wodurch sich die osmotische Druckdifferenz im Vergleich zu der durch die Testlösung hervorgerufene Druckdifferenz verändert.^{[90],[91]} Die erhöhte Konzentration an der Membran könnte sich zum einen aufgrund der Glucose in der Lösung aufbauen aber auch aufgrund der Zusammensetzung der Laktat Matrix.

Wäre die Glucose die mögliche Ursache für die Konzentrationspolarisation, so hätte man bei der Auswertung des prozentualen Vergleiches (Matrix zu Wasser, siehe Abbildung 59) einen Effekt sehen müssen. Bei steigender Konzentration hätte der Effekt bzw. die prozentuale Differenz stärker ausgeprägt sein müssen.

Um einen möglichen Effekt der Konzentrationspolarisation auf die UF-Leistung zu detektieren, könnte man im Rahmen eines weiteren Versuchsdesigns den Fluss über die Membran bei einem höheren Querstrom analysieren. Allgemein gilt, dass der Effekt der Konzentrationspolarisation bei Querstromfiltration gering ist.^[90] Würde man die Umdrehungszahl der Pumpe in Testsystem B erhöhen, so müsste der Effekt einer möglicherweise höheren Konzentration an der Membran verringert werden und somit der Fluss in den Versuchen mit Laktat Matrix und Wasser sich annähern.

Allgemein kann der Fluss an einer Membran durch die Ionenstärke, die Viskosität des Lösungsmittels oder durch den pH Wert beeinflusst werden. Bei der Aquaporinmembran findet ausschließlich ein Transport von Wassermolekülen statt, allerdings könnte auch hier der Fluss abhängig vom pH Wert bzw. der vorhandenen Ionenkonzentration sein, was bereits in der Literatur bezüglich AQP0 beschrieben ist.^[92] Im Folgenden (Abbildung 60) werden die Effekte bei Verwendung unterschiedlicher Membranchargen nochmals genauer erläutert.

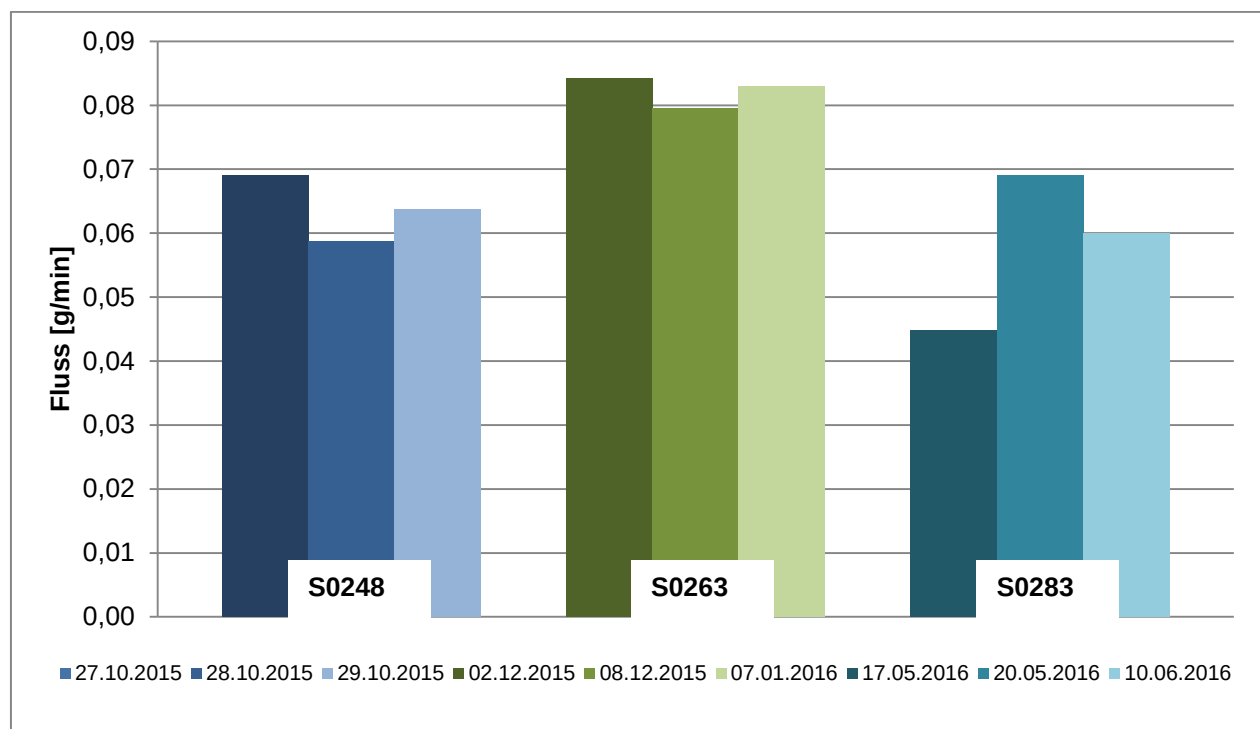


Abbildung 60: Fluss [g/min] bei einer 5%igen Glucoselösung in Wasser unter Verwendung unterschiedlicher Membranchargen.

Abbildung 60 ist eine Gegenüberstellung der Flüsse [g/min] unter Verwendung dreier verschiedener Membranchargen (S0248, S0263 und S0283) bei einer 5%igen Glucoselösung in Wasser zu entnehmen. Es sind jeweils die Steigungen aus drei Einzelversuchen dargestellt, welche über eine Versuchsdauer von zwei Stunden, zwischen 30 und 150 Minuten berechnet wurde (mittlere Messbereich). Anhand der Legende wird das Versuchsdatum ersichtlich, die Versuche mit der Membran S0248 wurden an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, die Versuche mit den beiden anderen Membran, verstreut jeweils über einen Zeitraum von einem Monat.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass es zu großen Schwankungen unter Verwendung der gleichen Membran unter gleichen Versuchsbedingungen kommen kann (siehe Membran S0283). Aus diesem Grund sollte auf jeden Fall eine Dreifachbestimmung in Versuchen mit einer Aquaporinmembran durchgeführt werden.

Weitere Gründe für solche starken Schwankungen könnten schwankende Umgebungstemperaturen im Labor sein. Dieser Einfluss kann durch die Temperierung in *in vitro* Testsystem C, der Weiterentwicklung der Membrantransportmodelle, umgangen werden.

Vergleicht man die Flüsse zwischen den verschiedenen Membranen, so kann man auch hier deutliche Unterschiede bis zu 20% erkennen. Dies erklärt nochmals die Ergebnisse aus Abbildung 56, den Unterschied zwischen randomisierten und nicht randomisierten Versuchen unter Verwendung einer unterschiedlichen Membrancharge. Laut Aussage vom Hersteller der Aquaporinmembran, kann derzeit noch keine Aussage getroffen werden, über den Anteil der aktiven Aquaporinvesikel in der Membran. Somit kann man im Rahmen der Ergebnisauswertung lediglich einen Vergleich ziehen, zwischen Ergebnissen, welche mit Hilfe der gleichen Membrancharge erzeugt wurden. Die hydraulische Leitfähigkeit der Aquaporinmembran muss also in Hinblick auf Membranparameter für jede Membran neu evaluiert werden. Die Bestimmung kann zum einen mit Hilfe von *in vitro* Testsystem C (siehe Kapitel 8.2.1) über die hydrostatische Druckdifferenz erfolgen oder über die osmotische Druckdifferenz mit Hilfe von *in vitro* Testsystem B.

Der Reflektionskoeffizient von Substanzen an einer Aquaporinmembran beträgt 1, der Fluss [g/min] kann automatisch aufgezeichnet werden, die hydrostatische Druckdifferenz beträgt aufgrund des Testaufbaus 0, somit kann bei gegebener osmotischer Druckdifferenz aus dem Filtratfluss die hydraulische Leitfähigkeit für zukünftige Versuche auch anhand von *in vitro* Testsystem B berechnet werden. Für die Bestimmung der osmotischen Druckdifferenz müsste während der Versuche die Osmolalität bestimmt werden. Es muss allerdings beachtet werden, dass die hydraulische Leitfähigkeit auch von Effekten wie Matrixzusammensetzung oder pH Wert der Lösung beeinflusst werden kann.

In Hinblick auf die mehrmalige Verwendung der Membran wird ebenfalls anhand von Abbildung 60 deutlich, dass keine tendenzielle Veränderung (Abschwächung oder Verstärkung des transmembranen Flusses) über die Nutzungsdauer zu erkennen ist. Durch das Spülen mit destilliertem Wasser scheint eine Regenerierung der Membran ermöglicht zu werden, wodurch eine mehrmalige Verwendung durchführbar ist.

8 Experimenteller Teil *in vitro* Testsystem C

In vitro Testsystem C basiert auf dem 3-Poren Modell, da hier verschiedene Membranen aus dem vorangegangenen Kapiteln kombiniert werden und zusätzlich noch mit weiteren Membranen ergänzt werden. Somit soll gleichzeitig die osmotische Aktivität von verschiedenen Substanzen durch die drei verschiedenen Arten Poren der Blutgefäße simuliert werden. In Kapitel 8 werden die zusätzlichen Materialien und Methoden für *in vitro* Testsystem C genauer erläutert. Im Methodenteil werden Versuchsreihen für die Bestimmung von Membranparametern beschrieben sowie die Durchführung von Ultrafiltrationsversuchen mit verschiedenen Membranen.

8.1 Material

Bei den Experimenten mit dem *in vitro* Testsystem C werden neben den bereits beschriebenen Cellulosemembranen bzw. Aquaporinmembranen weitere Membranen von Sartorius AG eingesetzt, welche im Folgenden genauer charakterisiert werden. Die osmotische Aktivität wird anhand verschiedener Substanzen getestet. Außerdem wird mit Hilfe von Modellsubstanzen die Permeation jener Substanzen an ausgewählten Membranen untersucht, um somit eine Aussage über die Porengröße treffen zu können. Des Weiteren wird der Effekt verschiedener Agonisten und Antagonisten an einer Aquaporinmembran analysiert, die von dem AK Herr Prof. Dr. Andreas Speicher, Universität des Saarlandes (UdS) zur Verfügung gestellt wurden.

8.1.1 Membranen für Testsystem C

Zusätzlich zu den bereits in *in vitro* Testsystem A und B beschriebenen Membran von Carl Roth und Aquaporin A/S, werden in *in vitro* Testsystem C verschiedenen Membranen von der Sartorius AG verwendet.

Als Membranmaterialien werden Cellulosetriacetat (CTA), regenerierte Cellulose (Hydrosart) sowie Polyethersulfon (PES) eingesetzt. Die Membranen werden typischerweise eingesetzt, um Lösungen aufzukonzentrieren bzw. auf zu reinigen.^[93] Laut Herstellerangaben können alle Membranmaterialien bei Temperaturen bis zu 50 °C eingesetzt werden. Der Durchmesser der verwendeten runden Membranen beträgt 47 mm. Zur Evaluierung der geeigneten Membran repräsentativ für die kleinen bzw. großen Poren der Blutgefäße im Peritoneum werden Membranen mit verschiedenen MWCOs verwendet. Mit Hilfe von Modellsustanzen mit bekanntem hydrodynamischem Radius wird deren Permeation an den Membranen untersucht (siehe Kapitel 8.2.2). In Tabelle 13 sind die Herstellerangaben zu den verwendeten Membranen von Sartorius (Membranmaterial, MWCO in kDa, Membrandicke in µm) aufgelistet.

Tabelle 13: Untersuchte Sartorius Membranen mit dazugehörigem Membranmaterial sowie MWCO [kDa].

Membranmaterial	MWCO [kDa]	Dicke [µm]
Hydrosart	10	180
PES	10	120
CTA	10	120
CTA	20	120
Hydrosart	30	120
PES	30	120
PES	50	120
PES	100	120

Allgemein werden Membranen aus regenerierter Cellulose aufgrund ihrer chemischen Struktur und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an den freien Hydroxylgruppen als hydrophil eingestuft. Regenerierte Cellulosemembranen werden durch Ausfällen und Regeneration einer chemisch modifizierten Cellulose hergestellt.

Beim Cellulosetriacetat hingegen sind alle drei Hydroxygruppen der Glukosemonomere verestert. Anstelle der Hydroxygruppen befinden sich nun am den Glukosebausteinen Acetatreste. Membranen aus PES sind thermisch stabiler als Cellulosemembranen und besitzen einen breiteren Toleranzbereich beim pH-Wert Bereich (1-14).^[60]

Die PES Membranen von Sartorius haben eine hohe Filtrationsflussrate und sind eher als hydrophob einzuordnen. Sie können in einem pH-Bereich von 1-14 eingesetzt werden. CTA-Membranen von Sartorius können in einem pH Bereich zwischen pH 4 und 8 verwendet werden. Membranen aus regenerierter Cellulose besitzen eine hohe chemische Stabilität und eine besonders niedrige Proteinbindung. Sie besitzen ebenfalls einen breiten pH Bereich von 2-14, in welchem sie Anwendung finden können.^[93]

8.1.2 Modellsubstanzen

Es werden in *in vitro* Testsystem C zur Quantifizierung der osmotischen Leistung wie in Testsystem A und B Glucose sowie Polyglucose (Icodextrin) verwendet. Des Weiteren wird die Laktat Matrix als Lösungsmittel und als Außenmedium eingesetzt, sowie als kolloidosmotische Substanz im Außenmedium BSA.

Im Rahmen der Permeationsversuche für das *Screening* geeigneter Membranen für die Nachbildung kleiner und großer Poren werden verschiedene Modellsubstanzen eingesetzt. Neben den bereits beschriebenen Dextranen und Polyethylenglycolen wird auch hochverzweigtes Polyglycerol (HPG) mit einer molaren Masse von 6000 g/mol eingesetzt. HPG wurde aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Holger Frey von der Johannes Gutenberg Universität (JGU) in Mainz bezogen. HPGs werden durch ein Polymerisationsverfahren hergestellt, indem zum Startmolekül Trimethylolpropan Glycidol bei 95 °C hinzugefügt wird.

Sie besitzen wie Polyethylenglycole eine enge molare Massenverteilung, haben in Wasser und anderen organischen Lösemitteln eine gute Löslichkeit und besitzen eine kompakte kugelförmige Struktur.^[94]

Tabelle 14 zeigt eine Übersicht der verwendeten Substanzen für die Diffusionsversuche, sowie laut Angaben der Hersteller zahlenmittlere, gewichtsmittlere molare Masse bzw. Molmassenverteilung in g/mol. Die Werte der intrinsischen Viskosität η_i in Wasser bei 20 °C wurden an der FSU Jena bestimmt.

Tabelle 14: Verwendete Modellschubstanzen in *in vitro* Testsystem C, Hersteller, M_n , M_w und Molmasseverteilung [g/mol] sowie intrinsische Viskosität η_i [cm³/g].

Substanz	Hersteller	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	Molmassenverteilung [g/mol]	η_i [cm ³ /g]
PEG 10.000	Merck Millipore	/	/	9000-12.500	23,20
PEG 20.000	Merck Millipore	/	/	~ 20.000	40,10
Dextran T5	Pharmacosmos A/S	3307	4887	/	6,00
Dextran T10	Pharmacosmos A/S	6469	10227	/	8,40
Dextran T60	Pharmacosmos A/S	41537	66328	/	23,20
Dextran T500	Pharmacosmos A/S	84744	428470	/	43,20
HPG 6000	JGU Mainz	6023	11637	/	5,30

8.1.3 Agonisten und Antagonisten zum Testen an der Aquaporinmembran

Mit Hilfe von *in vitro* Modell C und den darin eingebauten Aquaporinmembranen werden verschiedenen Agonisten und Antagonisten getestet. Die Testsubstanzen stammen aus dem AK der Organischen Chemie von Herrn Prof. Dr. Andreas Speicher von der Universität des Saarlandes. Im Rahmen der Fortgeschrittenen Arbeit von Herrn Daniel Lamberty (DL) und der Bachelorarbeit von Frau Mirjam Jakob (MJ) wurden ausgehend von bekannten Agonisten und Antagonisten aus der Literatur verschiedene Derivate synthetisiert, welche in der vorliegenden Arbeit an Aquaporinmembranen auf ihre Aktivität getestet werden. Herr Lamberty beschäftigte sich mit der Synthese des bekannten Agonisten AqF026 (siehe Tabelle 15) sowie weiterer Methylester-Derivate, Frau Jakob mit der Synthese des Antagonisten AqB013 und Bumetanid-Derivaten (siehe Tabelle 16).^[95]

Tabelle 15: Übersicht über Agonisten der UdS, AK Speicher, synthetisiert von Herrn Daniel Lamberty.

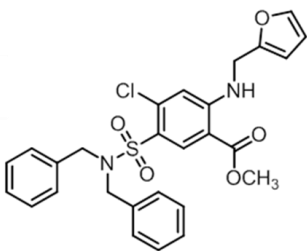
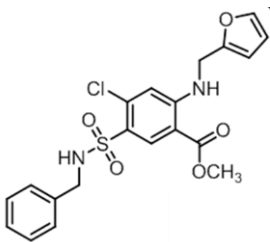
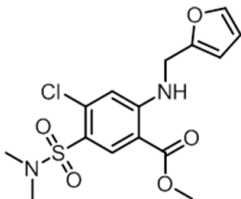
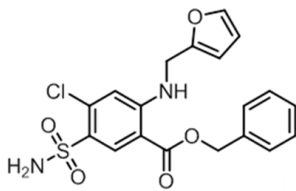
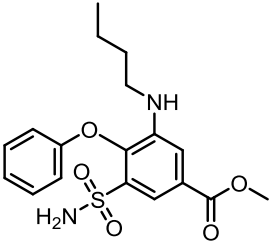
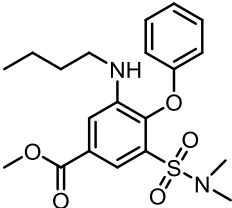
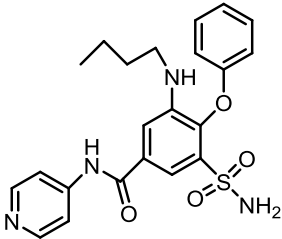
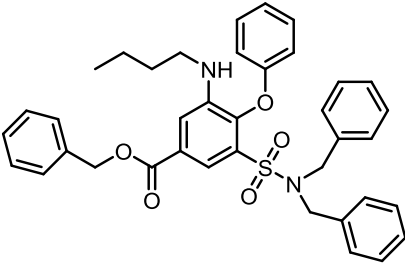
Probe	Substanz	Strukturformel	Molare Masse [g/mol]
DL_V02a	N,N-Dibenzyl-Derivat (1a) disubstituierten Produkt (AqF026)		525,02
DL_V02b	AqF026 (1)		434,89
DL_V05	N,N-Dimethyl-Derivat (1c)		372,82
DL_V06 (1. Fraktion)	Rohprodukt Benzylester-Derivat		420,05
DL_V06 (2. Fraktion)			

Tabelle 16: Übersicht über Antagonisten der UdS, AK Speicher, synthetisiert von Frau Mirjam Jakob.

Probe	Substanz	Strukturformel	Molare Masse [g/mol]
MJ6.1	Methylester (12)		378,44
MJ6.3			
MJ7.3	N,N-Dimethylmethylester (15)		406,5
MJ9.1	AqB013 (4)		440,52
MJ9.3			
MJ10.1	N,N-Dibenzylbenzylester (25)		634,79

8.2 Methoden

Im Methodenteil 8.2 dieser Arbeit wird die Durchführung der Versuche beschrieben, welche mit Hilfe des *in vitro* Testsystems C durchgeführt werden. Dazu zählt zum einen die Bestimmung von spezifischen Membranparametern, zur Überprüfung der Simulationsergebnisse von Membranstofftransporten durch experimentelle Daten. Ein weiterer Aufgabenbereich ist das *Screening* von Membranen, die möglichst repräsentative Ergebnisse für kleine und große Poren liefern, sowie die Durchführung von UF-Versuchen mit osmotischen Agenzien unter Kombination verschiedener Membranen.

In vitro Testsystem C wurde bei Fresenius Medical Care am Standort St. Wendel in Zusammenarbeit mit der hausinternen Lehrwerkstatt konstruiert und gefertigt. Abbildung 61 zeigt einen Ausschnitt aus den technischen Zeichnungen, welche zur Fertigung verwendet wurden.

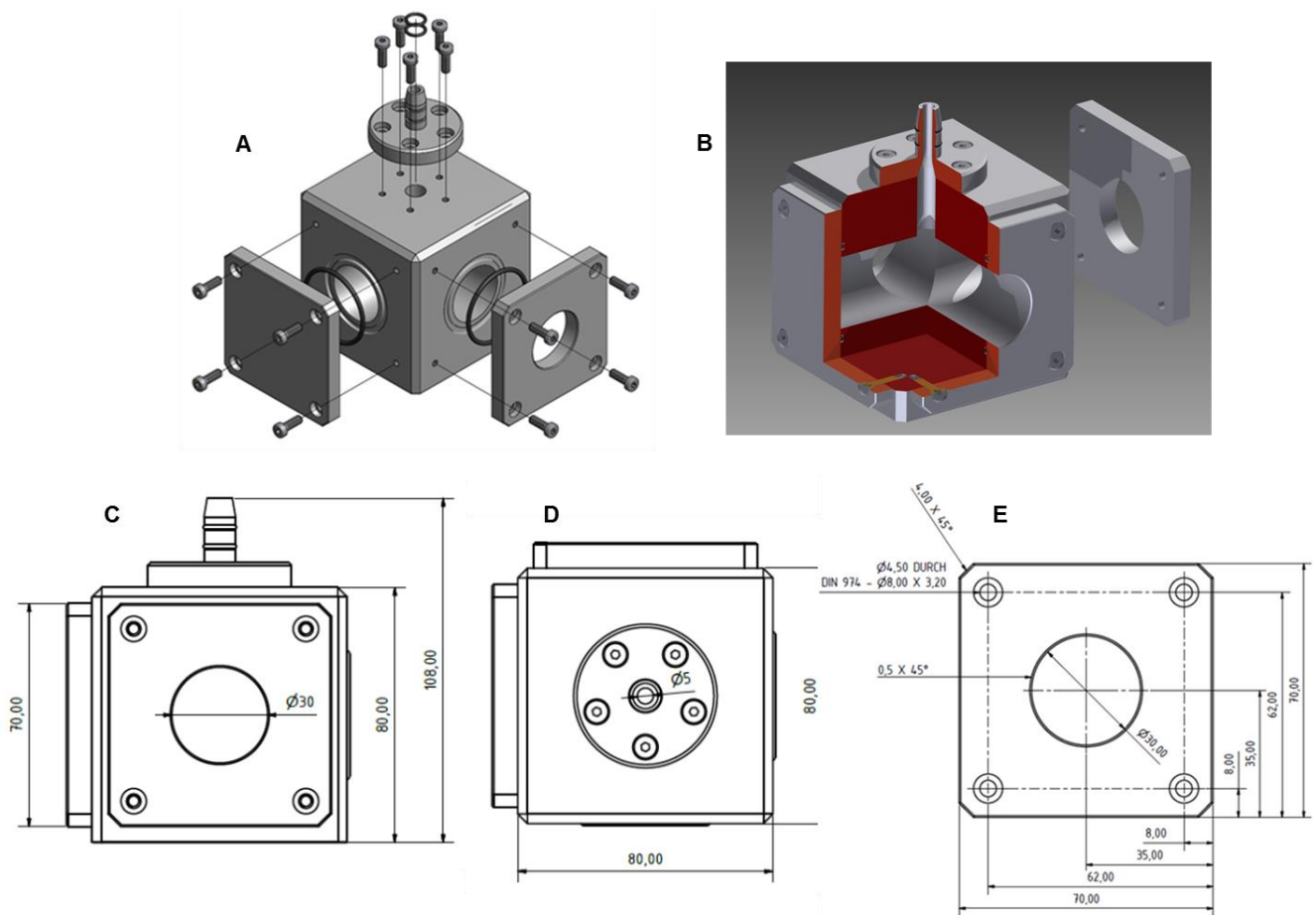


Abbildung 61: Technische Zeichnung sowie 3-D-Abbildung von *in vitro* Testaufbau C
 (A: Membranwürfelexplosion, B: Ansicht innen, C: Ansicht von der Seite, D: Ansicht von oben, E: Seitenteil zum Abdichten); die Zahlenwerte verstehen sich als Längenangaben in mm.

Anhand von Abbildung 61 ist zu erkennen, dass die Möglichkeit besteht bis zu vier verschiedene Membranen an den Seiten anzubringen. Die Abdichtung der Membranen erfolgt mit Hilfe von eingebauten O-Ringen sowie Verpressen mit den Seitenteilen. An der oben liegenden Seite des Würfels ist ein Flansch platziert, an welchem eine Bürette (Steigrohr) angebracht werden kann (siehe Abbildung 62). Die Abdichtung erfolgt ebenfalls über O-Ringe, welche am Flansch angebracht sind.

Der Würfel, wie man anhand von Abbildung 61 B erkennen kann, ist von jeder Seite durchbohrt worden, der Durchmesser der Bohrung beträgt 30 mm. Das Gesamtvolumen und somit auch das Wasserverdrängungsvolumen des Würfels betragen ca. 580 ml.

Dies wurde in Vorversuchen bestimmt, indem das Gewicht des Würfels (1565 g, annäherungsweise) durch die Dichte des Materials (Aluminium 2,7 g/ml) dividiert wurde. Das Füllvolumen von *in vitro* Testsystem C wurde in Vorversuchen bestimmt und beträgt ca. 100 ml. Zur Ermittlung des Volumens wurden die 4 Seitenflächen mit Acrylglasscheiben abgedichtet und das Leergewicht bestimmt. Anschließend wurde das Testsystem mit Wasser (T= 20 °C) gefüllt und wieder gewogen. Aus der Gewichts Differenz von 100 g wurde auf das Volumen zurückgerechnet, wobei vereinfacht die Dichte auf 1 g/cm³ gesetzt wurde.

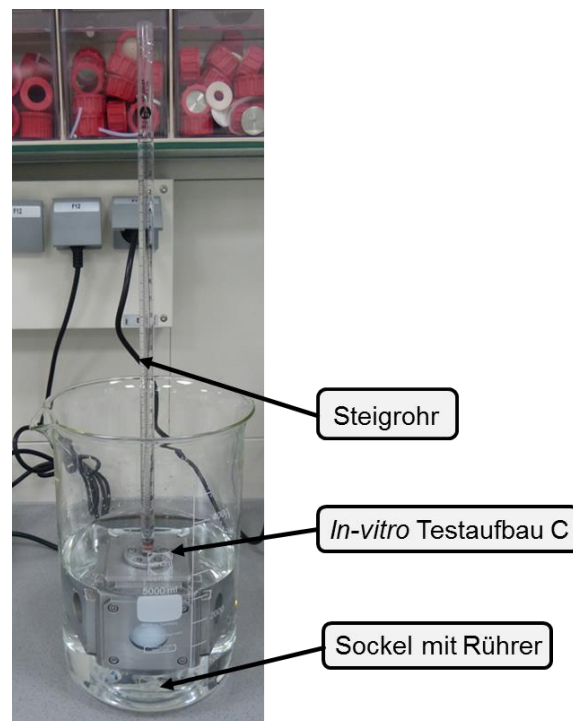


Abbildung 62: *In vitro* Testsystem C.

Um Versuche mit Hilfe von *in vitro* Testaufbau C durchführen zu können, müssen zunächst die gewünschten Membranen, welche zuvor in destilliertem Wasser gewässert werden, bzw. Leerseiten aus Acrylglas an den Seitenwänden festgeschraubt werden.

Anschließend erfolgt das Befüllen des Würfels mit dem gewünschten Innenmedium mit Hilfe von einer Spritze (Omnifix, 20 ml/Luer Solo, B.Braun) sowie einer Kanüle (Sterican, 1,20-40 mm, B.Braun).

Es muss während dem Befüllen darauf geachtet werden, dass möglichst alle Luftblasen aus dem Würfel entfernt werden und sich somit keine Blasen an den Austauschflächen, den Membranen befinden. Nach Befüllen des Würfels kann dann die Bürette am Flansch angebracht werden.

Es können Büretten aus Acrylglas (Nalgene, Thermo Scientific) mit verschiedenem Füllvolumen am Testsystem angebracht werden, welche in Tabelle 17 aufgelistet sind. Je nach Wahl der Bürette muss zuvor der passende Flansch an *in vitro* Testaufbau C angebracht werden. Der Innendurchmesser [cm] sowie die korrespondierende Höhe [cm] zu einem Milliliter Volumen wurden mit Hilfe eines Messschiebers überprüft und sind in Tabelle 17 ebenfalls aufgelistet.

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Büretten (Steigrohre) in *in vitro* Testaufbau C.

Kapazität [ml]	Einteilung [ml]	Toleranz [± ml]	Innendurchmesser [cm]	Korrespondierende Höhe [cm] zu 1 ml Volumen (Umrechnungsfaktor)
100	0,2	0,2	1,48	0,58
50	0,1	0,1	1,1	1,05
25	0,1	0,06	0,95	1,4

Zur Überprüfung des Umrechnungsfaktors zwischen Volumen und korrespondierender Höhendifferenz, wird mit Hilfe der bestimmten Maße und der Formel zur Volumenberechnung (siehe Gleichung 29) von Zylindern, das Volumen überprüft (siehe Tabelle 18)

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

Gleichung 29

V	Zylindervolumen [ml]
π	Kreiszahl (Pi, mathematische Konstante)
r	Zylinderradius [cm]
h	Zylinderhöhe [cm]

Tabelle 18: Überprüfung der Volumenkapazität der Büretten in Testaufbau C anhand der bestimmten Maße.

Bürettenkapazität [ml]	Volumenberechnung nach Gleichung 29	Ergebnis der Volumenberechnung [ml]
100	$V = \pi \cdot \left(\frac{1,48}{2}\right)^2 \cdot 0,58$	0,997
50	$V = \pi \cdot \left(\frac{1,1}{2}\right)^2 \cdot 1,05$	0,998
25	$V = \pi \cdot \left(\frac{0,95}{2}\right)^2 \cdot 1,4$	0,992

Als Behälter für das Außenmedium werden in der vorliegenden Arbeit je nach Anforderung verschiedene Gefäße verwendet. Die genaue Beschreibung der Gefäße findet in den entsprechenden Kapiteln statt. Es wird zum einen ein Becherglas mit einem Volumen von 5 Liter sowie speziell in der Werkstatt gefertigte Außengefäße verwendet. Entsprechend der Versuchsreihe wird vor Beginn des Versuches ein definiertes Volumen vorgelegt bzw. es wird eine definierte Füllhöhe oder eine Höhendifferenz zwischen Innenmedium (Füllstand des Steigrohres) und Außenmedium eingestellt.

Die Durchmischung des Außenmediums wird realisiert durch ein Rohr (Länge 3 cm, Außendurchmesser 8 cm, 8 Löcher mit $\varnothing$ von 1 cm) aus Polycarbonat. Das Rohrstück befindet sich unter dem Würfel und in das Rohr wird zur Durchmischung ein Magnetrührstäbchen gegeben (Typ Kreuz, PTFE 10·30 mm) (siehe Abbildung 62). Das Volumen beider Bestandteile anhand ihrer Wasserverdrängung beträgt ca. 40 ml.

Eine weitere Variable in den Versuchen mit Hilfe von *in vitro* Testsystem C ist die Temperatur. Es werden Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt sowie temperierte Versuche mit Hilfe eines Magnetrührers (RCT basic, Fa. IKA) und einem elektronischen Kontaktthermometer (ETS-D5, Fa. IKA).

8.2.1 Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit von Membranen

Die hydraulische Leitfähigkeit (L_p) ist ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Membran. Die hydraulische Leitfähigkeit berechnet sich aus dem Fluss über eine definierte Membranfläche bei definierter Druckdifferenz [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$]. Wird die hydraulische Leitfähigkeit mit der Membranfläche S (*surface*) multipliziert, erhält man einen Filtrationskoeffizienten, die hydraulische Permeabilität ($L_p \cdot S$), welcher in der Dialysetechnik und im Rahmen des 3-Poren Modell von B. Rippe in der Einheit $\text{ml}/(\text{min} \cdot \text{mmHg})$ angegeben wird.^{[96],[97],[98]} Die hydraulische Leitfähigkeit von Membranen kann nach dem Kedem und Katchalski Modell theoretisch bestimmt werden.^{[98],[99]} Zur experimentellen Bestimmung wird die Gleichung 5, welche bereits im Theorieteil genauer erläutert wurde, verwendet und nach L_p umgestellt (siehe Gleichung 30)

$$L_p = \frac{J_v}{\Delta p - \sigma \cdot \Delta \Pi}$$

Gleichung 30

J_v	Volumenfluss pro Fläche [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]
L_p	hydraulische Leitfähigkeit [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$]
Δp	hydraulische Druckdifferenz [Pa]
σ	Reflektionskoeffizient [-]
$\Delta \Pi$	osmotische Druckdifferenz [Pa]

Setzt man keine osmotisch aktive Substanz im Membranprozess ein (OPD, *osmotic pressure driven*), sondern nur destilliertes Wasser, so wird die osmotische Druckdifferenz $\Delta\pi$ in Gleichung 30 gleich 0.^[98] Für den Filtratfluss ist somit nur noch die hydrostatische Druckdifferenz verantwortlich (HPD, *hydraulic pressure driven*). Somit kann die hydraulischen Leitfähigkeit nach Gleichung 31 berechnet werden, wobei L_p durch den Volumenfluss von reinem Wasser pro Membranfläche und definierter Druckdifferenz bestimmt werden kann.

$$-L_p = \frac{J_v}{\Delta P}$$

Gleichung 31

In vitro Testsystem C wird für die Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit nach dem beschriebenen Verfahren eingesetzt, da bei einer bekannten Membranfläche, sequenziell die Flüsse bei unterschiedlichen hydrostatischen Druckdifferenzen verursacht durch die unterschiedlichen Höhendifferenzen (Flüssigkeitsspiegel im Außenmedium zum Flüssigkeitsspiegel im Innenmedium, Steigrohr) bestimmt werden können. Der L_p Wert der Membranen wird zum einen bei Raumtemperatur sowie bei 37 °C bestimmt, um mögliche Temperatureffekte zu detektieren.

In Abbildung 63 ist das Prinzip schematisch anhand von einer Skizze dargestellt und außerdem der Aufbau anhand von einem Bild gezeigt. Zunächst wird bei allen Seitenwänden des *in vitro* Testsystems die gleiche Membran eingebaut. Anschließend wird der Würfel mit destilliertem Wasser gefüllt, die Bürette auf dem Flansch angebracht und das Testsystem auf den Sockel im Becherglas (Abbildung 63) gestellt. Das zylindrische Becherglas hat eine Becherglaskonstante von 0,0047 cm/ml, welche in Vorversuchen durch schrittweises Füllen ermittelt wurde. Das heißt 1000 ml bewirken einen Anstieg des Wasserspiegels um 4,7 cm. Zur Kontrolle des Füllvolumens ist an der Außenseite des Becherglases ein Maßband angebracht (siehe Abbildung 63).

Für die Versuchsreihe wird eine 25 ml Bürette (Umrechnungsfaktor 1,4 cm/ml) verwendet, welche bis zu ihrer 0 ml-Markierung mit destilliertem Wasser gefüllt wird. Die 25 ml Markierung der Bürette liegt deckungsgleich auf dem Ende des Flansches. Anschließend wird destilliertes Wasser (1900 ml) in das Becherglas eingefüllt, sodass die äußere Füllhöhe 12,3 cm beträgt und das Testsystem oberhalb des Flansches unter Wasser ist, die 25 ml Markierung der Bürette oberhalb des Wasserspiegels (siehe Abbildung 63). Die Höhendifferenz zwischen dem Innenvolumen bei der 0 ml-Markierung und dem äußeren Volumen beträgt zu Beginn des Versuches 36,24 cm, was durch Markieren an der Acrylbürette ermittelt wurde.

Während der Durchführung des Versuches können unter Verwendung einer 25 ml Bürette maximal 25 ml Wasser vom Innenmedium in das Außenmedium durch die Membranfläche filtriert werden. Das bedeutet eine maximale Zunahme des äußeren Flüssigkeitsspiegels von ca. 0,12 cm (Volumen der Bürette·Becherglaskonstante; 25 ml·0,0047 cm/ml). Aufgrund der geringen Änderung von 0,3% im Vergleich zur Änderung der Höhe der Flüssigkeitssäule in der Bürette wird diese Änderung in der späteren Berechnung von L_p nicht berücksichtigt.

Erfolgt die Bestimmung des L_p -Wertes bei 37 °C, wird mit Hilfe eines Magnetrührers und Thermostates die Temperatur im Becherglas auf 37 °C reguliert und erst nach Erreichen des Sollwertes der Versuch gestartet. Die Temperatur des Innenmediums ist ebenfalls 37 °C, da die Flüssigkeit eine ausreichend lange Verweilzeit im Testsystem hat, bevor sie durch die Membran permeiert.

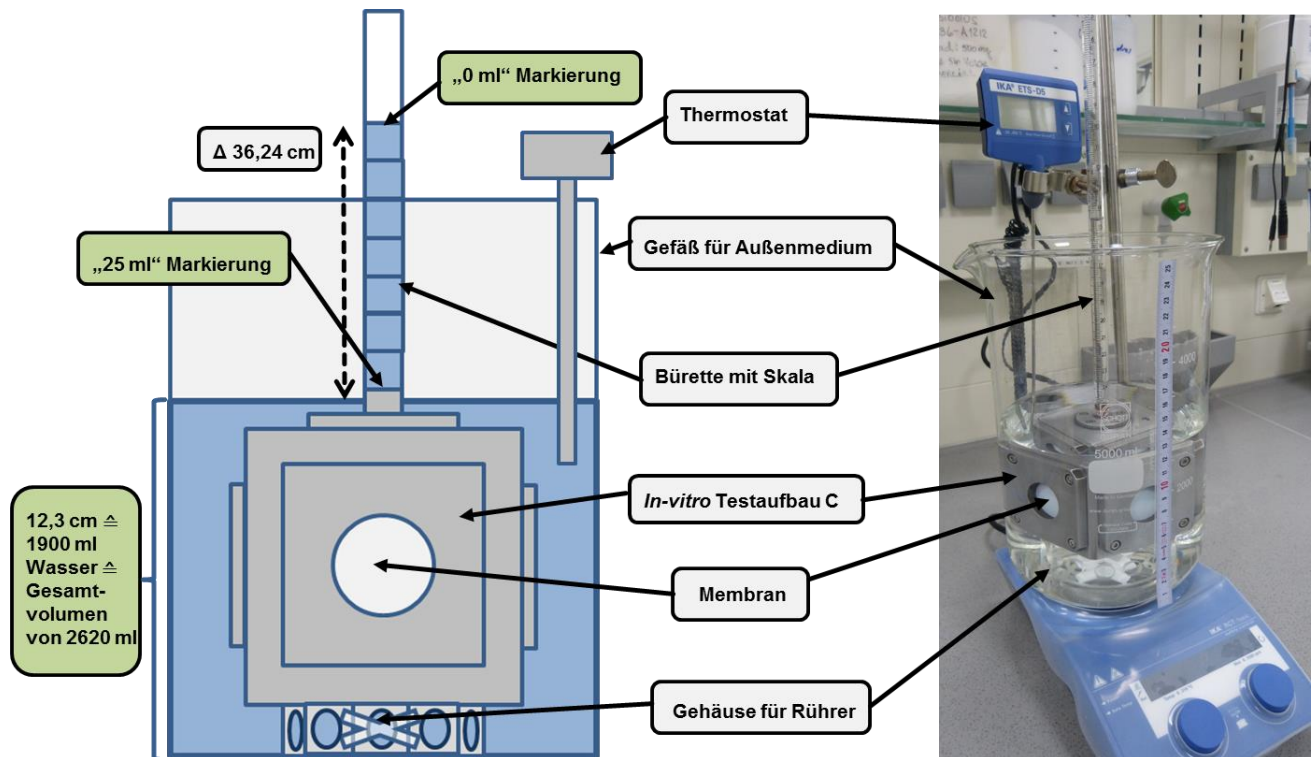


Abbildung 63: Aufbau von *in vitro* Testsystem C zur Detektion der hydraulischen Leitfähigkeit L_p von Membranen (nicht maßstabsgetreu gezeichnet).

Während der Durchführung der Experimente wird über die Zeit die Änderung des Füllstandes in der Bürette gemessen, um somit den Fluss [ml/min] (Änderung des Bürettenvolumens pro Zeiteinheit) bei definierter Druckdifferenz [cmH₂O] zwischen Innenmedium zu Außenmedium und Membranfläche [cm²] berechnen zu können (siehe Gleichung 32)

$$L_p = \frac{\frac{\Delta \text{Bürettenvolumen}}{\Delta \text{Zeit}}}{((36,24 - \Delta \text{Höhendifferenz} / 2) \cdot 0,735538814) \cdot \text{Membranfläche}}$$

Gleichung 32

L_p	hydraulische Leitfähigkeit [$\text{ml} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$]
$\Delta \text{Bürettenvolumen} / \Delta \text{Zeit}$	Fluss [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]
36,24	Druckdifferenz zwischen Innenmedium und Außenmedium [cmH_2O] zum Zeitpunkt t_0
$\Delta H_{\text{höhendifferenz}} / 2$	mittlere Druckdifferenz [cmH_2O] zwischen Zeitpunkt t_x und t_{x-1} im Innenmedium
0,735538814	Umrechnungsfaktor von 1 cmH_2O zu 1 mmHg
Membranfläche	Membranfläche [cm^2]

Dabei wird die mittlere Druckdifferenz [cmH_2O], wie man anhand von Gleichung 32 erkennen kann, für die Berechnung verwendet und durch den Umrechnungsfaktor von 0,7355 von cmH_2O in mmHg umgerechnet. Der Versuch wird pro Membran dreimal durchgeführt. Die hydraulische Leitfähigkeit wird aus dem Mittelwert von 10 Änderungsvolumina innerhalb der Bürette in bestimmten Zeitintervallen bzw. Druckdifferenzen pro Versuch bestimmt. Anschließend wird der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus den drei Einzelversuchen mit jeweils 10 Messungen berechnet. Im Folgenden ist exemplarisch eine Teilberechnung dargestellt.

$$1,33 \cdot 10^{-4} \frac{\frac{\text{ml}}{\text{min}}}{\text{mmHg} \cdot \text{cm}^2} = \frac{\frac{0,1 \text{ ml} - 0 \text{ ml}}{1 \text{ min} - 0 \text{ min}}}{(((36,24 \text{ cmH}_2\text{O} - (0,14 \text{ cmH}_2\text{O} - 0 \text{ cmH}_2\text{O}) / 2)) \cdot 0,7355 \frac{\text{mmHg}}{\text{cmH}_2\text{O}}) \cdot 28,27 \text{ cm}^2}$$

Demnach ergibt sich bei einem Fluss von 0,1 ml/min bei einer mittleren hydraulischen Druckdifferenz von 36,17 cmH_2O und einer Membranfläche von 28,272 cm^2 eine hydraulische Leitfähigkeit von $1,33 \cdot 10^{-4} \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$.

8.2.2 Filtrationsversuche an Membranen mit Modellsubstanzen

Mit Hilfe von *in vitro* Testsystem C, den aufgeführten Dialysemembranen von Sartorius (siehe Tabelle 13) sowie ausgewählten Modellsubstanzen (siehe Tabelle 14) werden Permeationsversuche durchgeführt, um repräsentative Membranen auszuwählen, die möglichst gut die Filtrationseigenschaften der kleinen und großen Poren der Blutgefäße im Peritoneum nachbilden, um diese dann in Testsystem C für Ultrafiltrationsversuche zu verwenden.

Wie bereits in Kapitel 8.1.1 beschrieben, werden UF-Membranen nach ihrem MWCO charakterisiert. Nach dem 3-Poren Modell von Bengt Rippe besitzen die kleinen Poren der Blutgefäße einen Durchmesser von 86 Å (8,6 nm), die großen Poren einen Durchmesser von 500 Å (50 nm).^[100]

Um nun Membranen mit vergleichbaren Poren in diesem Größenbereich zu finden, muss zunächst eine Größenbestimmung der vorhandenen Modellsubstanzen durchgeführt werden. Die Größenbestimmung, bzw. die Berechnung des hydrodynamischen Radius, wird zum einen mit Hilfe der intrinsischen Viskosität sowie der zahlenmittleren molaren Masse (siehe Tabelle 14) nach Gleichung 33 wie folgt berechnet.^[101]

$$r_h = \left(\frac{3 \cdot \eta \cdot M_n}{10 \cdot \pi \cdot N_A} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Gleichung 33

r_h	hydrodynamischer Radius [nm]
η	intrinsische Viskosität [cm ³ ·g ⁻¹]
M_n	zahlenmittlere molare Masse [g·mol ⁻¹]
π	Kreiszahl (Pi, mathematische Konstante)

N_A

Avogadro-Konstante ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

Diese berechneten Werte werden mit Messergebnissen der Partikelgröße durch dynamische Lichtstreuung mit Hilfe des Zetasizers NANO ZS (Malvern) verglichen. Für diese Messung wird das Prinzip der Brownschen Molekularbewegung genutzt. Während der Messung wird die Probe mit einem Laser bestrahlt und die Frequenz der Intensitätsschwankung des Streulichts erfasst. So kann die Brownsche Molekularbewegung der Partikel erfasst werden und diese in Relation zur Partikelgröße durch die Stokes-Einstein-Beziehung gesetzt werden.^[102] Wie in Gleichung 34 zu erkennen, verhält sich die Diffusionskonstante umgekehrt proportional zum Partikelradius.

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Gleichung 34

D	Diffusionskonstante [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]
k	Boltzmannkonstante [$\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$]
T	absolute Temperatur [K]
π	Pi
η	dynamische Viskosität des Lösungsmittels [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]
r_h	hydrodynamischer Radius der diffundierenden Teilchen [m]

Für die Messung werden die Testsubstanzen (siehe Tabelle 14) in einer Konzentration von 10 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst. Es werden jeweils 1 ml der Testlösung in die Acrylküvette pipettiert, diese in die Messkammer platziert und bei 25 °C gemessen.

Als Messmodus kann die Intensität [%], das Volumen [%] oder die Anzahl [%] gegen die Partikelgröße [nm] gewählt werden, um somit die Partikelgrößenverteilung in der Probe zu erfassen. Des Weiteren muss der Brechungsindex der Substanzen eingegeben werden, um eine interne Umrechnung der Intensität in Volumen bzw. Anzahl zu ermöglichen. Für die Vermessung der Polyethylenglycole und hochverzweigten Polyglycerole wird hier 1,47 gewählt, für die Vermessung der Dextrane 1,34.^{[103],[104]} Als Brechungsindex für das Lösungsmittel Wasser wird 1,33 eingestellt, des Weiteren wird die dynamische Viskosität des Lösungsmittels Wasser bei 25 °C mit einem Wert von 0,8872 mPa·s eingegeben. Es wird jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend der Mittelwert der Partikelgröße berechnet.

In der Auswertung (siehe Kapitel 9.2.1) werden die Ergebnisse beider Methoden gegenübergestellt und mit Literaturdaten verglichen.

Für die Diffusionsversuche bzw. Filtrationsversuche an den unterschiedlichen Membranen werden zum einen Modellschubstanzen gewählt, deren Partikelgröße unterhalb der Porengröße der Membran liegt und somit die Membran passieren sollten sowie Modellschubstanzen, welche größer sind und somit von der Membran zurückgehalten werden sollten. Aufgrund der Trenncharakteristik der Membranen für ausgewählte Modellschubstanzen, findet anschließend die Auswahl der repräsentativen Membranen für kleine und große Poren statt.

Für die Versuchsdurchführung werden an *in vitro* setup C an allen 4 Seiten die gleichen Membranen eingebaut. Diese werden zuvor für mindestens eine Stunde in destilliertem Wasser gelagert bzw. konditioniert, um das Glycerin aus dem Filter auszuspülen. Für die Diffusionsexperimente werden die Filter mit der filtrationswirksamen Schicht (Selektivschicht) zur Innenseite des Würfels eingebaut. Somit soll verhindert werden, dass die Modellschubstanzen sich in der Stützschieht ablagern bzw. adsorbieren, sondern direkt von der Selektivschicht zurückgehalten werden oder die Membran passieren können.

Es werden anschließend 600 ml destilliertes Wasser in das kleinvolumige Außengefäß gefüllt und mit Hilfe eines Magnetrührers (400 rpm) und Thermostates auf 37 °C temperiert. Das Außengefäß (siehe Abbildung 64) wurde in der Werkstatt von Fresenius Medical Care angefertigt.

Die Seitenwände bestehen aus Polycarbonatplatten, die Bodenplatte zur besseren Wärmeübertragung und Ermöglichung der Temperierung auf einem temperierbaren Magnetrührer aus rostfreiem Stahl. Das Außengefäß hat eine innere Kantenlänge von 10 cm und ist somit nur geringfügig größer als die Außenmaße des Test-setups C mit 9,5 cm. Durch das verringerte Außenvolumen soll die Empfindlichkeit der passierten oder permeierten Modellschubstanzen erhöht werden.

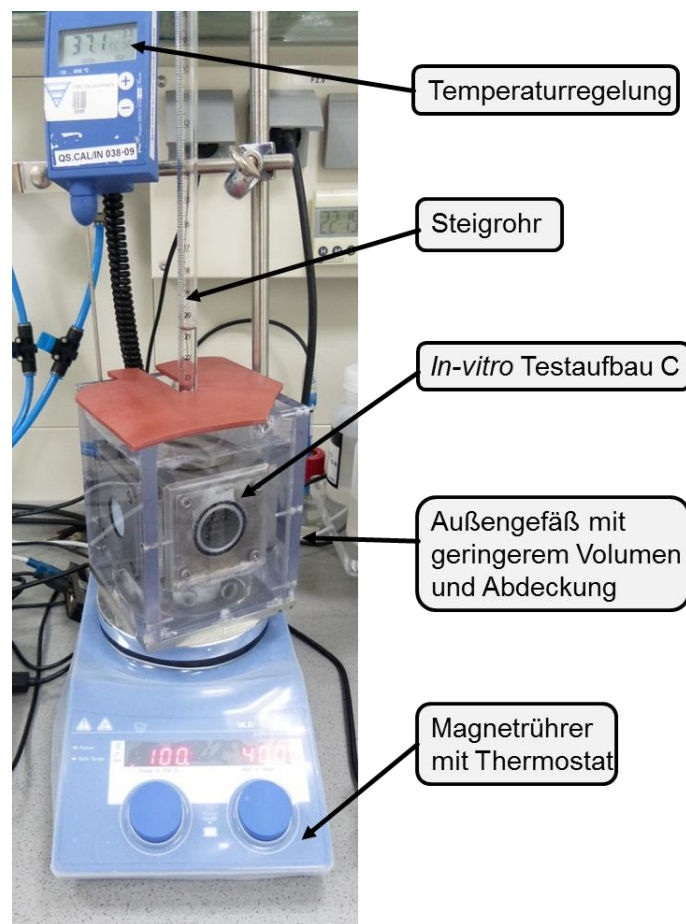


Abbildung 64: Versuchsaufbau für Diffusionsversuche mit Modellschubstanzen.

Von den Testsubstanzen (siehe Tabelle 14) werden 5%-ige Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt und mit Hilfe einer Spritze (Omnifix, 20 ml/Luer Solo, B.Braun) sowie einer Kanüle (Sterican, 1,20-40 mm, B.Braun) möglichst luftblasenfrei in das Innere des Testsystems eingebracht. Das Innenvolumen des Würfels beträgt ca. 100 ml. Anschließend wird die Bürette am Testsystem angebracht, um damit einen Anstieg des inneren Volumens aufgrund des osmotischen Druckes der Testlösung während des Versuches zu ermöglichen und zu detektieren. Mit der Bürette kann zu Versuchsende außerdem das Volumen abgelesen werden und somit das Gesamtinnenvolumen berechnet werden. Dieses ist entscheidend, um in der Auswertung der Daten Rückschlüsse auf das Rückhaltevermögen der Membran treffen zu können.

Der Versuch wird gestartet, indem das vorbereitete, gefüllte *in vitro* Testsystem C in dem vortemperierte Außengefäß platziert wird. Das Außengefäß wird während der Aufheizphase sowie während des Versuches mit einer speziell zugeschnittenen Gummiplatte abgedeckt, um Verdunstungsverluste zu vermindern. Nach 24 Stunden wird der Versuch gestoppt, das Bürettenvolumen notiert und das Innenmedium sowie Außenmedium in Schottflaschen gefüllt. Für die Auswertung der Daten wird mit Hilfe des Onkometers die Konzentration der verwendeten Testsubstanzen im Innen- und Außenmedium bestimmt (siehe Kapitel 4.2.4). Es wird von jeder in den Diffusionsversuchen eingesetzten Stammlösung eine Kalibriergerade erstellt, um damit die Konzentration im Innenmedium und Außenmedium nach 24 Stunden zu bestimmen. Von den Messungen der Testlösungen und Verdünnungsreihen wird jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt, sowie Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Mit Hilfe der Angabe des Bürettenvolumens (V_B) nach 24 Stunden und einem Startvolumen von 100 ml wird außerdem die Konzentration nach 24 Stunden bestimmt (bei einer Startkonzentration von 5%) unter der Annahme, dass die Substanz vollständig von der Membran zurückgehalten wird ($R=1$) (siehe Gleichung 35).

$$\text{conc}(t = 24)_{R=1} = \frac{5}{(100 + V_B)} \cdot 100$$

Im Rahmen der Auswertung wird zum einen die Konzentration im Außenmedium bestimmt und die tatsächliche Konzentration im Innenmedium betrachtet im Vergleich zur berechneten Konzentration unter der Annahme, dass die Modellschubstanz die Membran nicht passieren kann. Anhand der Differenz beider Werte kann eine Aussage getroffen werden, in welchem Bereich die Porengröße der Membran im Vergleich zur Partikelgröße der Modellschubstanzen liegt und ob sich die Membranen als kleine Poren Membranen bzw. große Poren in den Ultrafiltrationsversuchen im *in vitro* 3-Poren Modell eingesetzt werden kann. Es ist jedoch nicht garantiert, dass eine technische Membran mit ähnlichen Porengrößen notwendigerweise auch vergleichbare Filtrationsergebnisse liefern würde.

8.2.3 Ultrafiltrationsversuche in *in vitro* Testsystem C

Mit Hilfe von *in vitro* Testsystem C werden Ultrafiltrationsversuche durchgeführt, um die osmotischen Aktivitäten von Testsubstanzen in einem 3-Poren-Modell unter standardisierten Laborbedingungen zu untersuchen. In Abbildung 65 ist der Versuchsaufbau dargestellt. Für die Durchführung der Ultrafiltrationsversuche wird *in vitro* Testaufbau C in einer modifizierten Version verwendet. In *in vitro* Testsystem C ist zusätzlich ein Drucksensor (Transmitter CPT6200, Firma Wika) eingebaut, welcher einen Druckbereich von 0-100 mbar detektieren kann. Der Drucksensor besitzt eine Messgenauigkeit von 0,1% ihres Maximalwertes. Der Drucksensor ist auf der Kopfseite des Würfels eingebaut, um den Kontakt zum Innenmedium zu gewährleisten, ohne jedoch eine Auswirkung auf die seitlichen Membranflächen auszuüben. Mit Hilfe des Drucksensors kann der Füllstand im Steigrohr (Bürette) automatisch über die Zeit aufgezeichnet werden.

Die Messgenauigkeit beträgt 0,1 mbar, was einer Höhendifferenz von 0,102 cm Wassersäule entspricht. Zusätzlich ist auf der Kopfseite der Messzelle eine Probenentnahmemöglichkeit installiert worden über ein Septum (Silikon creme/PTFE beige, 3,2 mm Stärke), um während der Ultrafiltrationsversuche Proben mit Hilfe einer Spritze aus dem Innenmedium zu entnehmen (siehe Abbildung 66).

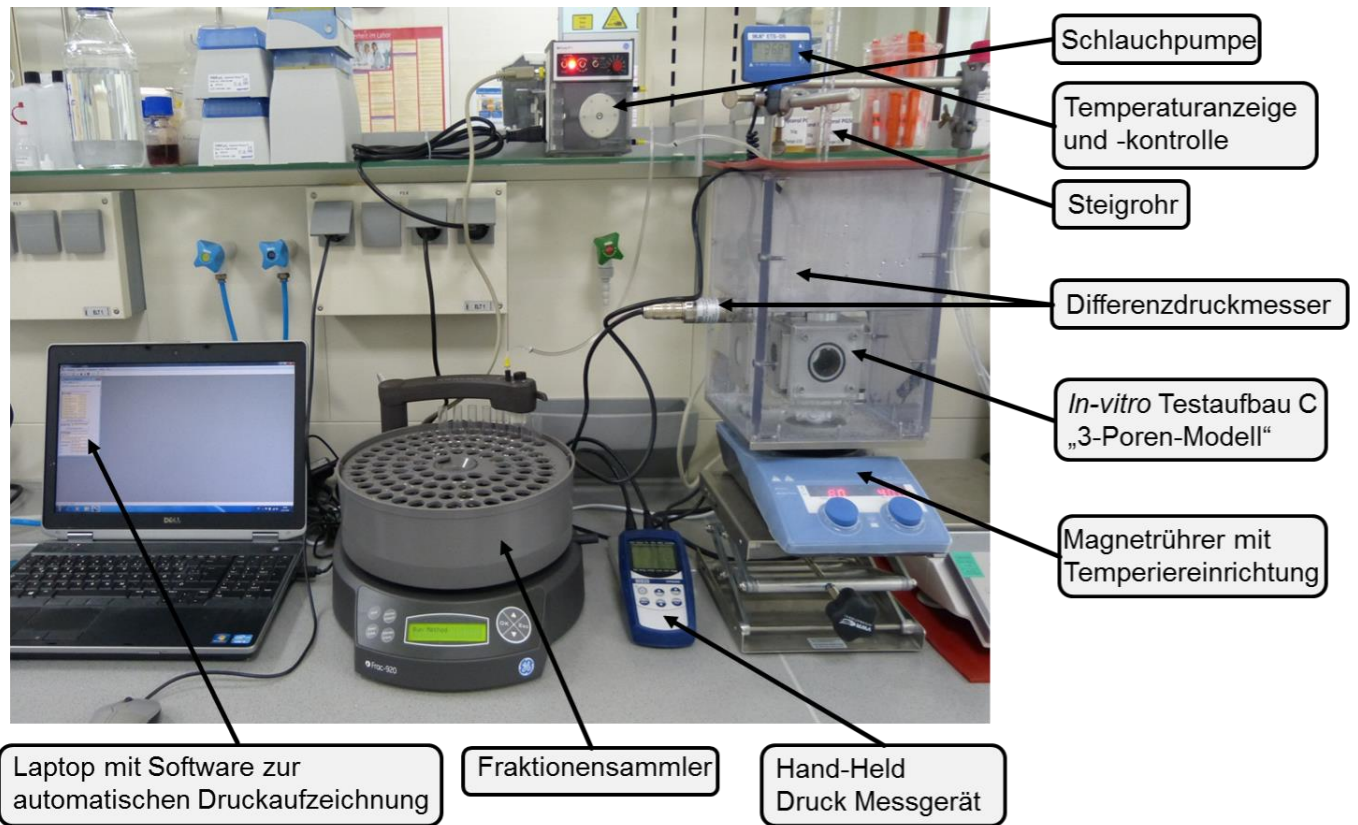


Abbildung 65: Versuchsaufbau zur Durchführung von Ultrafiltrationsversuchen in einem „3-Poren *in vitro* Testsystem“.

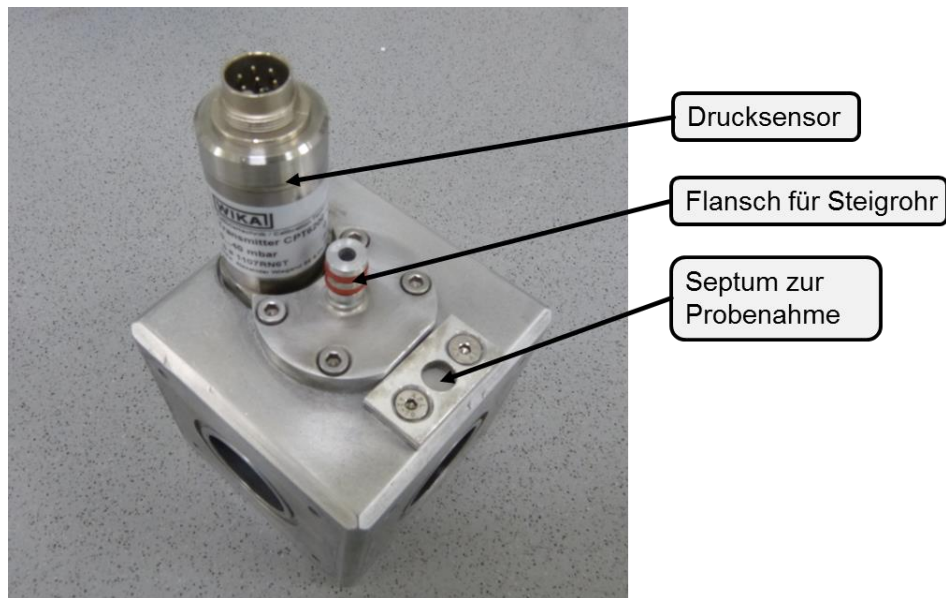


Abbildung 66: Ansicht von oben *in vitro* Testsystem C mit Druckaufnehmer, Flansch für Steigrohr sowie Septum zur Probenentnahme.

Für die automatische Füllstandsaufzeichnung im Steigrohr wird ein Hand-Held Druck Messgerät (Typ CPH6200, Wika) verwendet, über welches während des Versuches der Druckverlauf aufgezeichnet werden kann, danach in das Bürettenvolumen umgerechnet werden kann. Die Druckaufzeichnung erfolgt mit der Software GSoft (Wika) in Zeitintervallen von jeweils einer Minute. Um eine Beschädigung des Drucksensors, bzw. der integrierten Membran zu verhindern, darf sich aus der Höhe des Steigrohres angegebene hydrostatische Druck nicht den erlaubten Maximaldruck des Sensors überschreiten. Somit muss bei Verwendung des 100 mbar Drucksensors ein entsprechendes Steigrohr mit einer Länge von kleiner als 100 cm verwendet werden.

Ein weiterer Bestandteil des modifizierten *in vitro* Testaufbaus C ist ein weiteres Außengefäß. Die Seitenwände des Außengefäßes bestehen aus Polycarbonatplatten, die Bodenplatte aus rostfreiem Stahl. Dies dient zur besseren Wärmeübertragung und ermöglicht eine Temperierung mittels Thermostat und Durchmischung mittels Magnetrührer. Das Außengefäß hat eine innere Kantenlänge von 18 cm und einen Höhe von 26 cm.

An der Wand des Außengefäßes ist ebenfalls ein Drucksensor angebracht (Referenzdrucksensor), um damit den Füllstand bzw. den Differenzdruck zwischen Sensor 1 im Inneren des Würfels und Sensor 2 im Außengefäß zu detektieren. Für den Differenzdruck sollten die Sensoren auf gleicher Höhe sein, sodass durch die Differenzdruckmessung ein Unterschied in der hydrostatischen Druckdifferenz zwischen Innen- und Außenmedium erfasst werden kann. Ein Verdampfen/Verdunsten des Außenmediums wird während der vorbereitenden Aufheizphase sowie während des Versuches verringert, indem das Außengefäß mittels einer speziell zugeschnittenen Gummiplatte abgedeckt wird.

Für eine automatische Probenahme aus dem Außenmedium wird ein Fraktionensammler (Frac 920, fraction collector, GE healthcare) sowie eine damit verbundene Schlauchpumpe (Peristaltic Pump P-1, GE healthcare) verwendet (siehe Abbildung 65). Der Fraktionensammler lässt sich unabhängig verwenden und programmieren und ermöglicht so je nach Bedarf das Sammeln von Fraktionen über eine bestimmte Zeit oder über ein festgelegtes Volumen.^[105]

Die angeschlossene Pumpe wird über ein Kommunikationskabel durch das Programm des Fraktionensammlers gesteuert.

Für die Versuchsdurchführung werden bei *in vitro* setup C an den Seitenflächen die Membranen angebracht, deren Zusammenstellung im Ergebnisteil den jeweiligen Versuchen zu entnehmen ist. Alle Membranen werden vor ihrer ersten Verwendung mindestens eine Stunde in destilliertem Wasser gelagert, um das Glycerin zu entfernen. Als Testlösungen werden Glucose und Icodextrin in verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Konzentrationen verwendet, die jeweilige Zusammensetzung ist den jeweiligen Auswertungen zu entnehmen.

Bevor der Versuch gestartet wird, muss zunächst 3 Liter Außenmedium in das Außengefäß gefüllt werden und mit Hilfe des Thermostates und Magnetrührers (400 rpm) auf 37 °C temperiert werden. Bei einem Außenvolumen von 3 Litern ist gewährleistet, dass *in vitro* Testsystem C sowie der Flansch vollständig während des Versuches mit Außenmedium bedeckt sind.

Während des Versuches kann je nach Verwendung der Büretten maximal 25 ml oder 50 ml vom Außenmedium ins Innenmedium permeieren, wodurch sich eine maximale äußere Füllstandsverringerung von 8 mm bzw. 15 mm ergibt. Während der Durchführung der Ultrafiltrationsversuche lässt sich trotz Abdeckung eine Verdunstung des Außenmediums nicht vollständig verhindern. Somit kommt es zu Füllstandsänderungen im Außenmedium, die mit dem Referenzdrucksensor detektiert werden.

Mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle kann die Testlösung in das Innere des Testsystems eingebracht werden. Das Innenvolumen des Würfels beträgt ca. 100 ml, nach vollständigem Befüllen des Würfels bis zur Flanschoberkante zeigt der Drucksensor einen Wert von 5,0(+/- 0,05) mbar an. Anschließend wird die Bürette am Testsystem angebracht und die Software zur automatischen Druckaufzeichnung gestartet, sodass durch die Druckänderung die Änderung der Füllstandshöhe im Steigrohr berechnet werden kann. Der Ultrafiltrationsversuch wird gestartet, indem das vorbereitete *in vitro* Testsystem C in das vortemperierte Außengefäß platziert wird und das Außengefäß mit der Abdeckung verschlossen wird. Die Versuchsdauer variiert je nach Versuch und ist den jeweiligen Ergebnissen zu entnehmen.

Im Rahmen der Kapitel 9.3 und Kapitel 9.4 Ergebnisauswertung und Diskussion der Ultrafiltrationsversuche und Effekte von Agonisten und Antagonisten werden die Ergebnisse der Ultrafiltration über die Zeit, welche mit Hilfe von Drucksensor 1 ermittelt werden, dargestellt und diskutiert. Die anderen Modifikationen (Referenzdrucksensor, Fraktionensammler sowie Septum zur Probenentnahme des Innenmediums) sind technisch umgesetzt und werden in weiterführenden Versuchsreihen benötigt (siehe Ausblick, Kapitel 11), was jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen würde.

9 Ergebnisse und Diskussion *in vitro* Testsystem C

Im experimentellen Teil von *in vitro* Testsystem C (siehe Kapitel 8) ist bereits beschrieben, dass das Testsystem eine Weiterentwicklung und Kombination von Testsystem A und B darstellt. Das Testsystem kann zum einen verwendet werden, um spezifische Membranparameter wie die hydraulische Leitfähigkeit einer Membran zu messen. Zum anderen bietet das Testsystem die Möglichkeit gleichzeitig drei verschiedenen Membranen repräsentativ für die verschiedenen Arten von Poren zu verwenden und die Stofftransporte während einer Dialysebehandlung mit verschiedenen osmotischen Agenzien zu simulieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert, welche im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden.

9.1 Ergebnisse der hydraulischen Leitfähigkeit von Membranen bei Raumtemperatur sowie 37 °C

Die hydraulische Leitfähigkeit (L_p) ist ein charakteristischer Kennwert der Membran. Er ist definiert über den Fluss über eine definierte Membranfläche bei definierter Druckdifferenz [$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$]. Die hydraulische Leitfähigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit bei allen potentiellen Membranen von Carl Roth (25 kDa) sowie von Sartorius (Tabelle 13) mit Hilfe der in Kapitel 8.2.1 beschriebenen Methode bestimmt. Die Versuche wurden mit Wasser zum einen bei Raumtemperatur sowie bei 37 °C durchgeführt, um einen möglichen Unterschied zu detektieren. Die hydraulische Leitfähigkeit wird wie bereits in Kapitel 8.2.1 beschrieben aus dem Mittelwert von 10 Änderungsvolumina innerhalb der Bürette pro Zeiteinheiten sowie Druckdifferenzen pro Versuch bestimmt. Anschließend wird der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus den drei Einzelversuchen mit jeweils 10 Messungen berechnet. Die Einheit der hydraulischen Leitfähigkeit erfolgt in $\text{ml} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse aller verwendeten Membranen bei Raumtemperatur sowie 37 °C dargestellt.

Tabelle 19: Ergebnisse der hydraulischen Leitfähigkeit der getesteten Membran beim Raumtemperatur sowie 37 °C.

Membran	Hersteller	Ergebnisse bei Raumtemperatur		Ergebnisse bei 37 °C	
		$L_p \cdot 10^{-4}$	$SD \cdot 10^{-4}$	$L_p \cdot 10^{-4}$	$SD \cdot 10^{-4}$
		[ml·min ⁻¹ ·1 cm ⁻² ·mmHg ⁻¹]			
CTA 10 kDa	Sartorius	1,019	0,10	1,374	0,08
Hydrosart 10 kDa	Sartorius	1,152	0,08	1,841	0,04
PES 10 kDa	Sartorius	2,977	0,24	5,283	0,64
CTA 20 kDa	Sartorius	2,609	0,11	6,835	< 0,00
Regenerierte Cellulose 25 kDa	C. Roth	0,051	0,02	0,030	< 0,00
Hydrosart 30 kDa	Sartorius	3,782	0,13	4,340	< 0,00
PES 30 kDa	Sartorius	7,152	0,56	8,781	0,17
PES 50 kDa	Sartorius	14,415	0,69	20,120	0,38
PES 100 kDa	Sartorius	14,553	0,08	18,139	< 0,00
Aquaporin	Aquaporin	0,111	0,03	0,124	0,03

Anhand von Tabelle 19 wird deutlich, dass die hydraulische Leitfähigkeit der Sartorius und Aquaporinmembran bei 37 °C höher sind als bei Raumtemperatur. Bei der CTA 20 kDa Membran führt eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C zu mehr als einer Verdopplung der hydraulischen Leitfähigkeit. Die Werte der regenerierten Cellulosemembran von Carl Roth liegen im Vergleich zu den Membranen von Sartorius bedeutend geringer. Der Fluss von Wasser bei gleichem Druckgradient ist viel geringer, was bei einer gleichen Porengröße auf eine geringere Porenanzahl pro Fläche bzw. eine deutlich dickere Membran hindeutet. Tendenziell lässt sich bei einer Erhöhung des MWCO einer Membran eine Erhöhung der hydraulischen Leitfähigkeit beobachten.

Zwischen der PES 50 und 100 kDa Membran hingegen findet keine starke Erhöhung des L_p Wertes bei Raumtemperatur mehr statt. Auch kann die Ursache eine niedrigere Porenanzahl pro Fläche bei einer 100 kDa Membran im Vergleich zu einer 50 kDa Membran sein. Bei der Bestimmung bei 37 °C findet man sogar eine leichte Verringerung der hydraulischen Leitfähigkeit bei 100 kDa im Vergleich zu 50 kDa.

Vergleicht man die hydraulische Leitfähigkeit zwischen unterschiedlichem Membranmaterial bei gleichem MWCO der 10 kDa Membranen, so kann man feststellen, dass die PES Membran die höchste und die CTA Membran die niedrigste Leitfähigkeit hat. Auch bei den 30 kDa Membranen zeigt die PES Membran im Vergleich zur Hydrosart Membran einen höheren Fluss bei gleicher Druckdifferenz. Allgemein sollte die hydraulische Leitfähigkeit von 20 °C auf 37 °C steigen, da die Viskosität von Wasser bei 20 °C mit einem Wert von ca. $1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ auf ca. $700 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ bei 37 °C abfällt, was sich als Faktor 1,43 auf die hydraulische Leitfähigkeit auswirken sollte. Weicht das Ergebnis hiervon stark ab, so spielen noch andere Effekte wie z.B. Dehnung der Membran eine Rolle (siehe Ergebnisse regenerierte Cellulose 25 kDa Membran von C. Roth).

Die Methode zur Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit der Membran liefert für alle verwendeten Membranen reproduzierbare Ergebnisse. Vor der Verwendung der Membranen kann somit überprüft werden, wie der Faktor der hydraulischen Leitfähigkeit das Ultrafiltrationsverhalten bei Verwendung osmotischer Agenzien in *in vitro* Testsystem C beeinflusst.

9.2 Experimentelle Bestimmung einer repräsentativen Membran für kleine und große Poren

Um geeignete Membranen für die Verwendung von UF Versuchen in *in vitro* Testsystem C zu finden, welche im Bereich der kleinen und großen Poren der Blutgefäße liegen, werden die in Kapitel 8.2.2 beschriebenen Diffusionsversuche mit speziell ausgewählten Modellsubstanzen durchgeführt. Im ersten Teil sind die Ergebnisse der Größenbestimmung mittels zweier verschiedener Methoden dargestellt (siehe Kapitel 9.2.1), im zweiten Teil der Auswertung (Kapitel 9.2.2) die Ergebnisse der Diffusionsexperimente.

9.2.1 Größenbestimmung der verwendeten Modellsubstanzen mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung sowie intrinsischer Viskosität

Die Größenbestimmung der Modellsubstanzen findet wie bereits in Kapitel 8.2.2 beschrieben über die dynamische Lichtstreuung mittels Zetasizer statt. Es wird jeweils eine Dreifachbestimmung einer Probe durchgeführt und Mittelwert sowie Standardabweichung anhand der Intensität, des Volumens und der Anzahl des Messsignals berechnet. In Abbildung 67 bis Abbildung 69 sind exemplarisch die Ergebnisse der Intensität [%], des Volumens [%] sowie der Anzahl [%] über Größe [nm] einer Messung mittels Zetasizer für PEG 20 kDa in Wasser dargestellt.

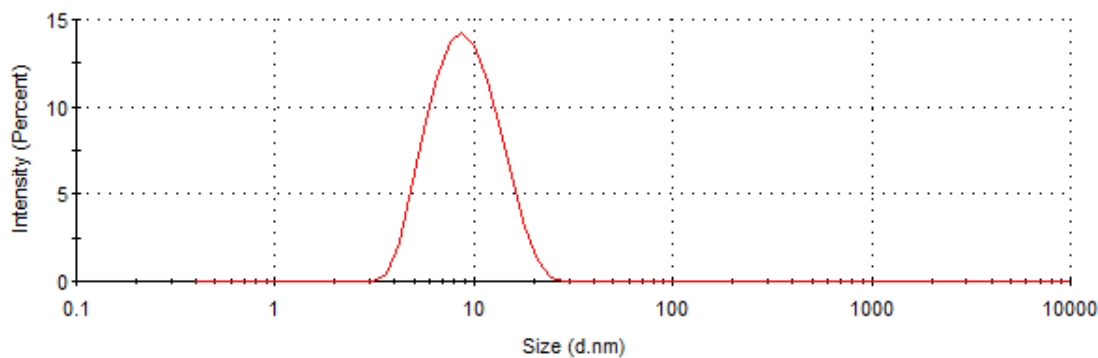


Abbildung 67: Intensität [%] gegen den hydrodynamischen Durchmesser [nm] von PEG 20.000 g/mol in Wasser, Messung mittels Zetasizer ergibt einen Durchmesser von 9,51 nm.

Man kann anhand der Abbildung 67 erkennen, dass PEG 20 kDa eine sehr enge Größenverteilung besitzt, ca. zwischen 3 und 20 nm mit einem mittleren Moleküldurchmesser von 9,51 nm. Der Wert kann jeweils der Auswertung in der Software entnommen werden. Bei der Auswertung der Ergebnisse über das Volumen bzw. die Anzahl kommt aufgrund der programminternen Auswertung zu einer Linksverschiebung des Signals. Aus diesem Grund wird als mittlerer Moleküldurchmesser ein Wert von 6,51 nm bzw. 5,12 nm vom Programm errechnet (siehe Beschriftung in Abbildung 68 und Abbildung 69).

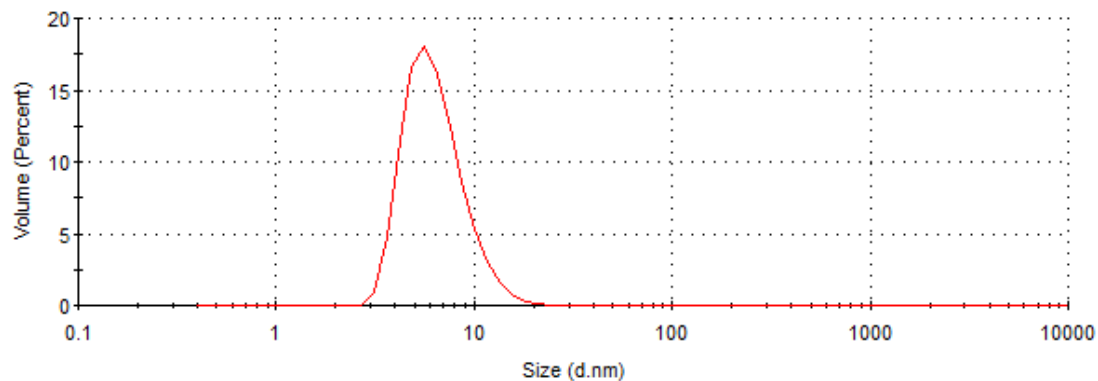


Abbildung 68: Volumen [%] gegen den hydrodynamischen Durchmesser [nm] von PEG 20.000 g/mol in Wasser, Messung mittels Zetasizer ergibt einen Durchmesser von 6,51 nm.

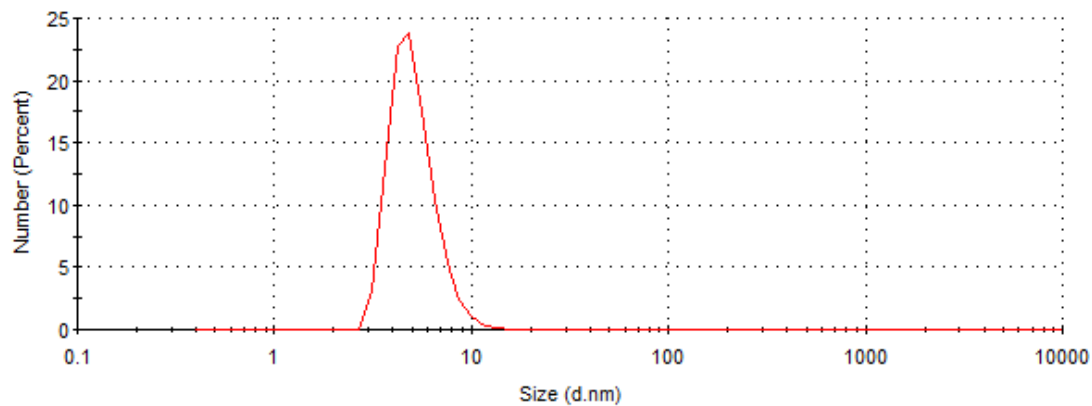


Abbildung 69: Anzahl [%] gegen den hydrodynamischen Durchmesser [nm] von PEG 20.000 g/mol in Wasser, Messung mittels Zetasizer ergibt einen Durchmesser von 5,12 nm.

Als Vergleichsmethode wird der hydrodynamische Radius der Modellsubstanzen mathematisch aus den bestimmten Werten der intrinsischen Viskosität und der zahlenmittleren molaren Massen (siehe Tabelle 14) mit Hilfe von Gleichung 33 berechnet. Im Folgenden ist exemplarisch eine Beispielrechnung für PEG 20 kDa aufgeführt. Demnach besitzt PEG 20 kDa einen hydrodynamischen Radius von 5,02 nm.

$$R_h = \left(\frac{3 \cdot 40,10 \frac{cm^3}{g} \cdot 20000 \frac{g}{mol}}{10 \cdot \pi \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \cdot mol^{-1}} \right)^{\frac{1}{3}} = 5,02 \text{ nm}$$

In Tabelle 20 sind die Mittelwerte des hydrodynamischen Durchmessers Ø mit der dazugehörigen Standardabweichung SD bestimmt mittels Zetasizer Nano ZS über die Intensität, das Volumen sowie die Anzahl dargestellt und als Vergleich der berechnete hydrodynamische Durchmesser über die zahlenmittlere molare Masse und die intrinsische Viskosität.

Tabelle 20: Ergebnisse des hydrodynamischen Durchmessers Ø der Modellsubstanzen mittels dynamischer Lichtstreuung sowie berechnet aus M_n und η_i .

Substanz	Ø [nm] (M_n und η_i)	Ø [nm] (Intensität)	SD [nm]	Ø [nm] (Volumen)	SD [nm]	Ø [nm] (Anzahl)	SD [nm]
PEG 10.000	6,65	5,42	1,05	4,75	0,53	4,28	0,26
PEG 20.000	10,06	9,14	0,34	6,57	0,16	5,28	0,26
HPG 6000	3,43	7,59	0,35	4,92	0,13	3,85	0,18
Dextran T5	2,93	3,85	0,02	3,16	0,14	2,70	0,19
Dextran T10	4,10	5,50	0,07	4,26	0,04	3,54	0,04
Dextran T60	10,69	12,58	0,77	9,52	0,10	7,87	0,38
Dextran T500	16,68	22,40	3,35	19,06	3,70	14,43	2,14

Betrachtet man die Werte des hydrodynamischen Durchmessers in Tabelle 20, bestimmt über die dynamische Lichtstreuung, so kann man erkennen, dass der Durchmesser, bestimmt über die Intensität, jeweils den größten Wert anzeigt. Es kommt dann jeweils bei dem Durchmesser, bestimmt über das Volumen und die Anzahl zu einer Linksverschiebung auf der logarithmischen Skala des Durchmessers.

Dies liegt daran, dass größere Partikel eine höhere Intensität des Streulichtes erzeugen, umgedreht kleinere einen geringen Anteil am Streulicht. Betrachtet man nun das Volumen bzw. die Anzahl, steigt der Anteil der Fraktion mit einem kleineren Durchmesser an. Die Umrechnung erfolgt intern über die Gerätesoftware unter Verwendung der Viskosität der vermessenen Substanz.

9.2.2 Ergebnisse der Diffusionsexperimente von Modellsubstanzen

Für die Diffusionsexperimente werden lediglich die Membranen von Sartorius (siehe Tabelle 13) verwendet, Membranen von Carl Roth besitzen im Vergleich eine viel geringere hydraulische Leitfähigkeit und somit eine geringere Porosität. Die Membranen von Sartorius besitzen außerdem eine bessere mechanische Stabilität und lassen sich besser in *in vitro* Testsystem C integrieren.

Wie bereits in Kapitel 8.2.2 findet die Auswertung der Diffusionsversuche anhand verschiedener Beurteilungskriterien statt. Es wird die gemessene Konzentration der Modellsubstanz nach 24 Stunden im Innenmedium bestimmt und im Vergleich zur berechneten Konzentration unter der Annahme, einer vollständigen Retention der Modellsubstanz gegenübergestellt. Zusätzlich wird die Konzentration im Außenmedium nach 24 Stunden gemessen, um eine Aussage über die Diffusionsfähigkeit der Modellsubstanzen über eine definierte Membran zu erhalten. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt wie bereits in Kapitel 4.2.4 beschrieben über Membranosmometrie.

Nach Tabelle 2 besitzen die kleinen Poren einen Durchmesser von 8 bis 10 nm, sodass im Rahmen der Diffusionsversuche PEG 10 kDa, 20 kDa sowie HPG 6000, Dextran T5 und T10 die potentiellen Membran für die kleinen Poren laut Tabelle 20 passieren sollte. Hingegen sollte Dextran T60 größer als die kleinen Poren sein und somit von der Membran zurückgehalten werden.

Für die Auswahl einer Membran repräsentativ für die großen Poren, wurde die Diffusion von Dextran T500 an einer 50 kDa und 100 kDa Membran untersucht. In Tabelle 21 sind alle Ergebnisse der Diffusionsversuche der verschiedenen Membranen und Testsubstanzen dargestellt.

Es ist jeweils die Differenz zwischen berechneter Konzentration unter der Annahme einer vollständigen Retention (siehe Gleichung 35) und den experimentell bestimmten Konzentrationen für die jeweilige Kombination aus Membran und Modellschubstanz dargestellt. Je größer die Differenz ist, umso stärker müsste die Diffusion ins Außenmedium sein. Um eine Auswahl der geeigneten Membranen zu treffen, wurde als Grenzwert für die berechnete Differenz 0,30 gewählt. Ein Wert $\geq 0,30$ weist auf die Diffusion der Modellschubstanz durch die Membran hin, ein Wert von $\leq 0,30$ bedeutet, dass ein erheblicher Anteil von der Membran reflektiert wird.

Tabelle 21: Ergebnisse der Diffusionsexperimente, absolute Differenz zwischen berechneter Konzentration [%] für $R=1$ und experimentell bestimmter Konzentration [%] der jeweiligen Kombination von Modellschubstanz und Membran.

Membran Modell- substanz	CTA 10 kDa	Hydrosart 10 kDa	PES 10 kDa	CTA 20 kDa	Hydrosart 30 kDa	PES 30 kDa	PES 50 kDa	PES 100 kDa
PEG 10.000 ($\geq 0,30$)	0,16	0,00	0,24	0,72	0,04	0,24		
PEG 20.000 ($\geq 0,30$)				0,44	0,36	0,30		
HPG 6000 ($\geq 0,30$)				0,82	0,24	0,22		
Dextran T5 ($\geq 0,30$)				1,58	0,06	0,74		
Dextran T10 ($\geq 0,30$)				0,52	0,30	0,78		
Dextran T60 ($\leq 0,30$)				0,10	0,06	0,05		
Dextran T500 ($\geq 0,30$)							0,00	0,42

Differenz von $\geq 0,30 \rightarrow$ Diffusion
Differenz von $\leq 0,30 \rightarrow$ Retention

Die Ergebnisse unter Verwendung der Polyethylenglycole mit einer molaren Masse von 10 kDa und 20 kDa zeigen, dass die Differenz unter Verwendung der CTA 20 kDa Membran am höchsten ist und somit auf eine Diffusion der Modells substanz durch die Membran deuten.

Um dies zu überprüfen, wurde die Konzentration der Modells substanz im Außenmedium nach 24 h bestimmt, wobei lediglich bei Verwendung der 20 kDa CTA Membran in Kombination mit PEG 10 kDa und PEG 20 kDa eine Konzentration von 0,16% bzw. 0,10% im Außenmedium mittels Onkometer zu detektieren war.

Bei der Verwendung der anderen Membranen konnte zwar eine Abnahme der Konzentration im Innenmedium ermittelt werden, jedoch konnten die verwendeten Modells substanz nicht im Außenmedium detektiert werden. Mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Testsubstanz die Membran adsorbieren bzw. sich in den Poren ablagern.

Anhand des Filtrationsspektrums in Abbildung 34 wird deutlich, dass Membranen mit einem MWCO von 10 kDa einen Durchmesser von ca. 5 nm besitzen sollten und Membranen mit einem MWCO von 20 kDa einen Durchmesser von ca. 10 nm. Anhand der Diffusionsergebnisse konnte gezeigt werden, dass PEG 20 kDa und 10 kDa eine Membran aus CTA mit einem MWCO von 20 kDa partiell oder vollständig passieren kann. Dieser Effekt könnte jedoch an der spezifischen Modells substanz und eventuellen Membran Substanz Wechselwirkungen liegen, sodass im Rahmen der Versuche noch weitere Modells substanz verwendet wurden. Es wurde HPG 6000 und Dextran T5 und T10 eingesetzt, die Untersuchungen wurden mit Membranen mit einem MWCO von mindestens 20 kDa durchgeführt. Die Ergebnisse sind ebenfalls Tabelle 21 zu entnehmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Differenz zwischen berechneter Konzentration für $R=1$ und gemessener Konzentration auch bei Verwendung von HPG 6000 den größten Wert von 0,82% bei der CTA 20 kDa Membran hat. Auch bei der Messung der Konzentration im Außenmedium, konnte lediglich unter Verwendung der CTA Membran eine Konzentration von 0,2% im Volumen von 600 ml detektiert werden.

Die Ergebnisse unter Verwendung von Dextran T5 zeigen ebenfalls, dass auch hier die höchste Differenz bei der CTA 20 kDa Membran gemessen wurde. Im Außenmedium konnte auch hier lediglich bei der CTA Membran nach 24 h eine Konzentration mittels Onkometer von 0,18% detektiert werden.

Unter Verwendung der Hydrosart 30 kDa und PES 30 kDa Membran konnte nach 24 h kein Dextran T5 im Außenmedium gemessen werden. Die Differenz der PES 30 kDa zeigt mit einem Wert von 0,74% jedoch ein hohes Ergebnis an, was wiederum auf Ablagerungen der Substanz in der bzw. auf der Membran hindeuten könnte.

Unter Verwendung von Dextran T10 als Modells substanz, konnte bei allen verwendeten Membranen eine Differenz von größer als 0,30 gemessen werden. Bei keiner der Versuche mit den Membranen konnte Dextran T10 nach 24 h im Außengefäß nachgewiesen werden, obwohl Dextran T10 laut Größenbestimmung (siehe Tabelle 20) einen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 4 bis 5 nm hat und damit deutlich kleiner ist, als z.B. PEG 10 kDa. Interessanterweise ist die Durchlässigkeit für diese Substanz bei einer PES Membran höher als bei Verwendung der CTA Membran. Wie aber bereits schon aufgrund früherer Arbeiten bekannt zeigten Polyethylenglycole im Vergleich zu hochverzweigten Polyglycerolen vermutlich aufgrund ihrer Struktur in Lösung ein besseres Membranübergangsverhalten.^[57] Somit könnte es bei Dextranen an sterischen bzw. morphologischen Effekten liegen, dass diese nicht durch die Membran permeieren bzw. diffundieren.

Um die Ergebnisse der Diffusionsversuche nochmals genauer zu erläutern ist in Abbildung 70 für die jeweilige potentielle Membran für die kleinen Poren und den verwendeten Modells substanz die berechnete Differenz dargestellt. Man kann anhand der Ergebnisse (a) sehen, dass die Permeation an einer 20 kDa Membran größenabhängig ist, je größer die Modells substanz, desto größer ist die Retention. Bei Verwendung einer Hydrosart 30 kDa Membran (b) zeigen sich ebenfalls größenabhängige Effekte. Die Permeation der verwendeten Modells substanz ist umso höher, je größer die Modells substanz sind. Dieses Ergebnis ist also genau umgekehrt als erwartet.

Die Ergebnisse der PES 30 kDa Membran (c) zeigen, dass die Permeation nicht größenabhängig ist, es zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Testsubstanzen.

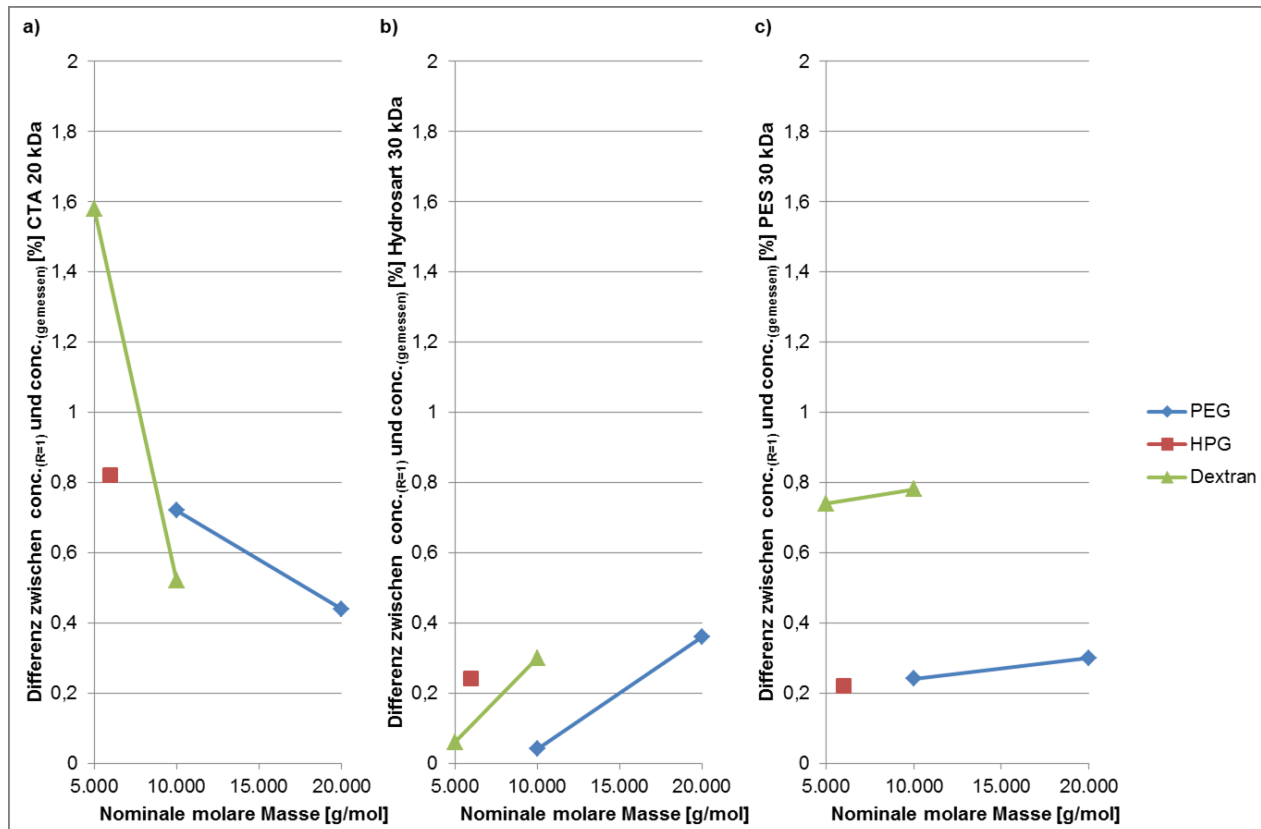


Abbildung 70: Ergebnisse der Diffusionsversuche für potentielle kleine Poren Membranen (a: CTA 20 kDa; b: Hydrosart 30 kDa; c: PES 30 kDa).

Im Rahmen der letzten Versuchsreihe für das *Screening* nach potentiellen Membranen für kleine Poren wurde mit der Testsubstanz Dextran T60 getestet, ob die Membranen diese Modellsubstanz reflektieren. Die Ergebnisse sind ebenfalls Tabelle 21 zu entnehmen.

Der hydrodynamische Durchmesser von Dextran T60 beträgt ca. 10 bis 12 nm und somit sollte diese Substanz von einer potentiellen Membran für die kleinen Poren reflektiert werden.

Diese Vermutung konnte mit Hilfe der Versuche bestätigt werden. Die verwendeten Membranen mit einem MWCO von 20 bzw. 30 kDa zeigten im Rahmen der Versuche eine minimale Differenz zwischen berechneter und bestimmter Konzentration, sodass man davon ausgehen kann, dass Dextran T60 von den verwendeten Membranen reflektiert wird.

In einer weiteren Testreihe wurden Versuche für die Bestimmung einer potentiellen „großen Poren“ Membran durchgeführt. Laut Tabelle 2 besitzen die großen Poren einen Durchmesser von 50 nm, was laut den entsprechenden Daten aus Abbildung 34 einer 100.000 kDa Membran entsprechen würde. Dextran T500 besitzt laut Größenbestimmung einen hydrodynamischen Radius von ca. 25 nm, somit sollte die verwendete Testsubstanz eine mögliche Membran repräsentativ für die großen Poren passieren können. In einer ersten Testreihe wurde eine 50 kDa Membran und 100 kDa Membran gewählt und die Diffusionsversuche mit Dextran T500 durchgeführt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 21 dargestellt.

Man kann anhand der Ergebnisse erkennen, dass die PES 50 kDa Membran zu kleine Poren hat und Dextran T500 vollständig reflektiert. Die Differenz [%] unter Verwendung der 100 kDa Membran und T500 beträgt 0,42%, was darauf hindeutet, dass die Substanz kleiner als die Poren der Membran ist. Die Differenz liegt jedoch unter 1%, was darauf hindeutet, dass ein großer Teil immer noch reflektiert wird und die Poren der Membran im Bereich des hydrodynamischen Durchmessers der verwendeten Testsubstanz liegen könnte.

Ein weiteres Kriterium der Membran für die großen Poren der Blutgefäße ist die Gewährleistung der Diffusion von Albumin. Aus diesem Grund wurde zusätzlich getestet, ob BSA eine 100 kDa PES Membran passieren kann. BSA wurde in Laktat Matrix als 5%ige Lösung eingesetzt, als Außenmedium Laktat Matrix und nach 24 h mit Hilfe des Brechungsindex die Konzentrationen im Innen- und Außenmedium überprüft. Es fand ein geringer Volumenanstieg im Steigrohr von 2,6 ml statt, die Konzentration nach 24 h lag bei 3,6%, abzüglich des Verdünnungseffektes bei 3,7%. Im Außenmedium mit einem Volumen von 600 ml konnte eine Konzentration von 0,15% detektiert werden.

Geht man von der ursprünglichen 5%igen Lösung als Startwert aus, so sind nach 24 h 74% der Substanz im Testsystem immer noch vorhanden, 18% konnten im Außenmedium detektiert werden und weitere 8% sind möglicherweise in der Membranschicht zurück geblieben. Aufgrund der Ergebnisse der Diffusionsversuche kann man als Fazit festhalten, dass die verwendete 20 kDa CTA Membran noch am ehesten im Bereich der kleinen Poren mit 8 bis 10 nm liegt und die 100 kDa PES Membran potentiell für den Einsatz als „große Poren Membran“ geeignet wäre.

Um die Ergebnisse der Diffusionsversuche besser erklären zu können und um die Membranen zu charakterisieren, wurden Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) bei Fresenius Medical Care, Werk St. Wendel (Anwendungstechnik) erstellt. Es wurden sowohl Aufnahmen der verwendeten Membran von der Ober- und Unterseite sowie der Querschnitt aufgenommen. Die Aufnahmen sind der CTA 20 kDa, Hydrosart 30 kDa und PES 30 kDa Membran sind im Folgenden dargestellt. Die Aufnahmen der restlichen Membranen sind dem Anhang zu entnehmen.

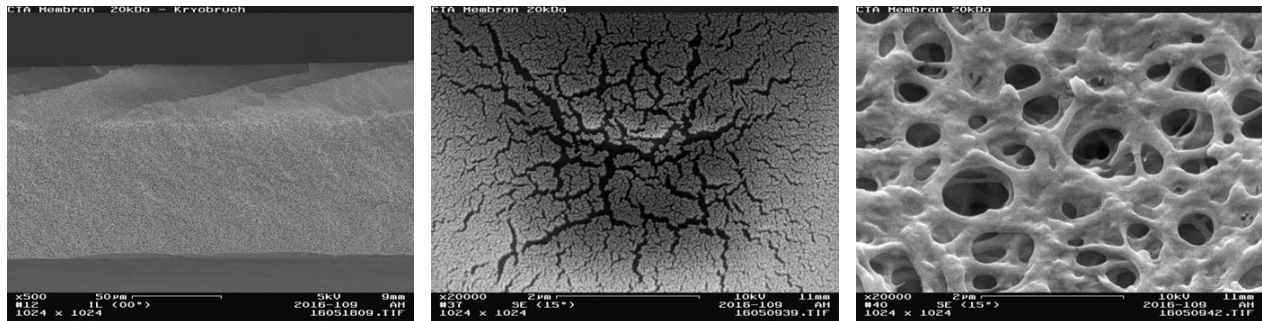


Abbildung 71: REM Aufnahme 20 kDa CTA Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite).

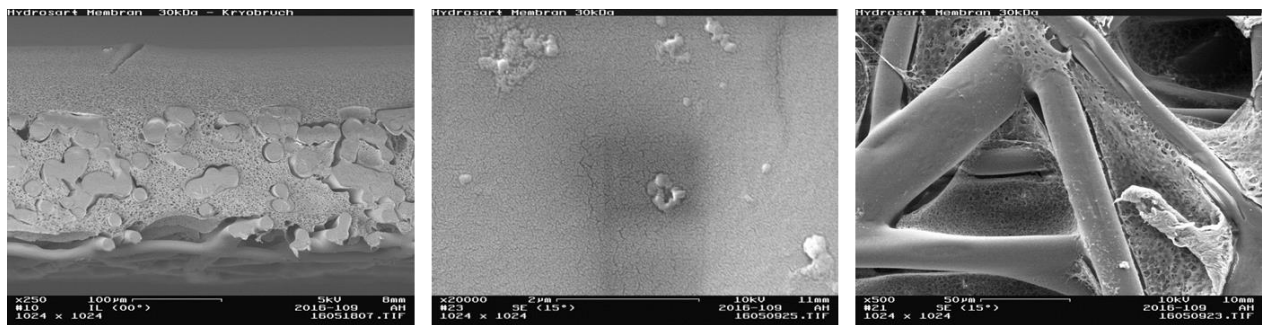


Abbildung 72: REM Aufnahme 30 kDa Hydrosart Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite).

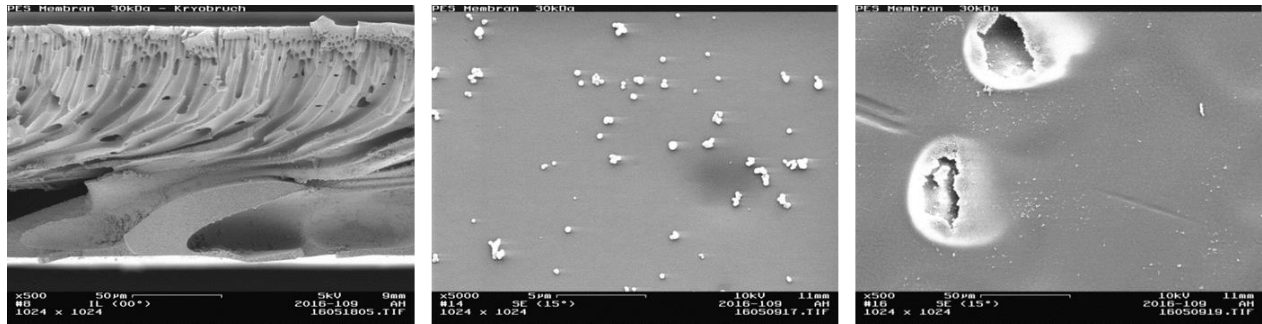


Abbildung 73: REM Aufnahme 30 kDa PES Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite).

Anhand der Aufnahmen der Kryobrüche wird deutlich, dass sowohl Hydrosart als auch PES Membranen eine stark asymmetrische Struktur (Stützschrift und selektive Schicht) haben und die Membran aus Cellulosetriacetat eine eher symmetrische Struktur zeigt.

Die Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM) zeigen, dass die CTA Membran einen eher symmetrischen Aufbau hat, allerdings besitzt die Membran keine klar definierten Poren, sondern eher eine Porenstruktur. Für die zukünftigen UF Versuche spielt vor allem die Membran für die kleinen Poren eine große Rolle, da sie auch im höchsten prozentualen Flächenanteil (ca. 95-99%) in den Versuchen eingesetzt werden soll. Die Membran für die großen Poren wird nur zu einem geringen prozentualen Anteil von ca. 1 bis 5% eingesetzt. In den ersten Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine 100 kDa PES Membran potentiell für den Einsatz geeignet wäre. Des Weiteren kann man zusammenfassend sagen, dass aufgrund der Diffusionsergebnisse die CTA 20 kDa Membran in ihren Filtrationseigenschaften und der Struktur in den REM-Aufnahmen am ehesten den kleinen Poren des Peritoneums entspricht und für die zukünftigen UF-Versuche verwendet wird.

9.3 Ultrafiltrationsversuche mit Glucose und Polyglucose zur Bestimmung der osmotischen Aktivität in *in vitro* Testsystem C

Zur Durchführung der ersten Ultrafiltrationsversuche mit Hilfe von *in vitro* Testsystem C wurde zur Aufzeichnung der Veränderung des inneren Füllvolumens im Steigrohr ausschließlich der eingebaute Drucksensor verwendet. Für die Versuche wurde das osmotische Agens in destilliertem Wasser gelöst und als Außenmedium jeweils Wasser verwendet. Im Rahmen der folgenden Ergebnisauswertung wurde zunächst überprüft, wie die in Testsystem B verwendete Aquaporinmembran sich in *in vitro* Testsystem C verhält und außerdem wurden vertiefende Untersuchungen zur Wiederverwendbarkeit bzw. Regeneration der Membran gemacht. Anschließend sind die Ergebnisse dargestellt, in welcher mit *in vitro* Testsystem C und einer Kombination aus Aquaporinmembran und „kleine Poren Membran“ UF Versuche mit osmotischen Agenzien durchgeführt wurden.

9.3.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Verwendung einer Aquaporinmembran in *in vitro* Testsystem C

In den folgenden Ergebnissen ist exemplarisch der Druckverlauf [mbar] gegen die Zeit [min] unter Verwendung von 2 eingebauten Aquaporinmembranen in Testsystem C bei einer Testlösung mit 5% Glucose in Wasser dargestellt. Die Änderung des Druckes korrespondiert mit der Volumenzunahme im Steigrohr (25 ml Bürette). Im Rahmen der Ergebnisauswertung wurde zusätzlich zwischen 20 und 100 min in den jeweiligen 10 Minutenabständen die Steigung anhand der Geradengleichung dargestellt. In Abbildung 74 sind die Ergebnisse des Ultrafiltrationsversuches dargestellt. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass unter Verwendung einer Glucoselösung und Aquaporinmembran in *in vitro* Testsystem C eine lineare Volumenzunahme über die Zeit erzeugt wird.

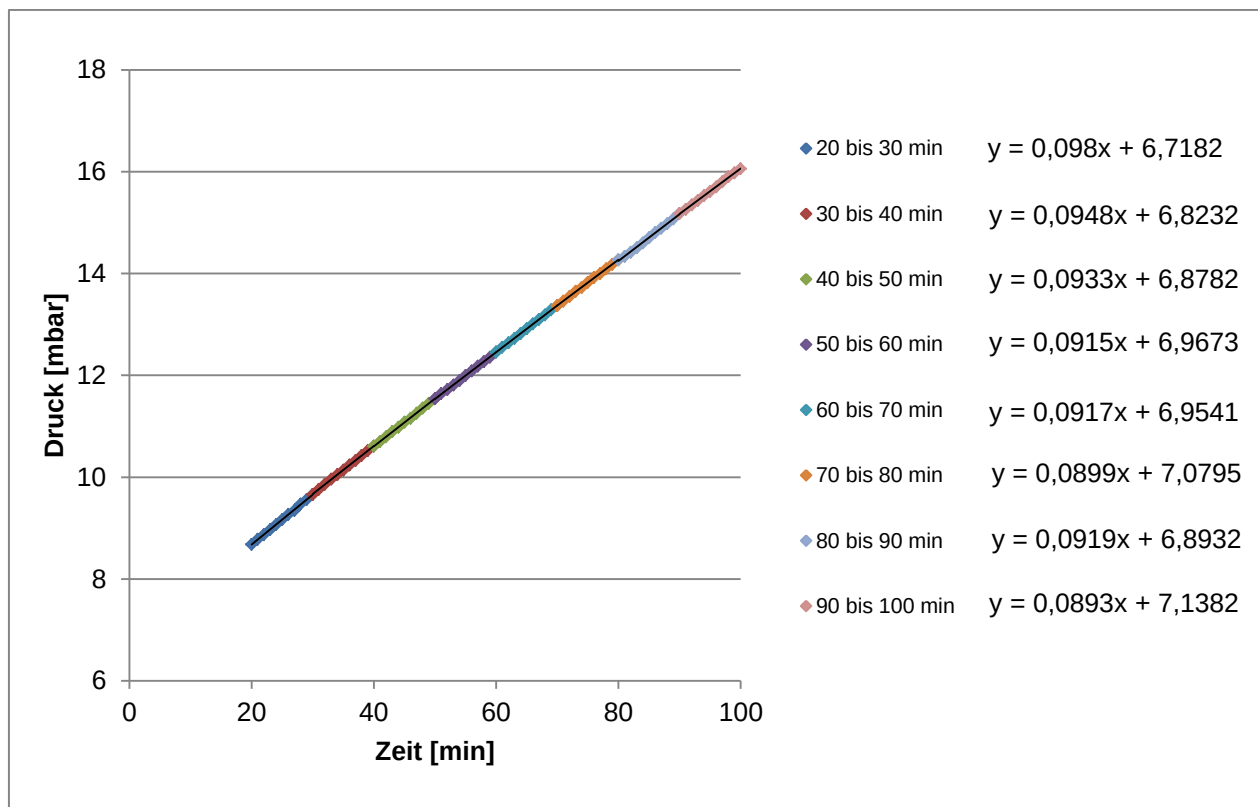


Abbildung 74: UF Versuch mit 2 Seiten Aquaporinmembran (S0264), 5% Glucose in Wasser, 37 °C (Druck [mbar] korrespondiert zur Volumenzunahme im Steigrohr gegen die Zeit [min]).

Betrachtet man die Steigung der einzelnen Zeitabschnitte anhand der Geradengleichung in Abbildung 74, so wird deutlich, dass die Steigung tendenziell mit zunehmender Zeit abnimmt. Während des Versuches wird Wasser aufgrund des osmotischen Gradienten vom Außenmedium ins Innenmedium aufgenommen, sodass es zu einer Verdünnung der 5%igen Glucoselösung kommt. Des Weiteren nimmt der hydrostatische Druck, bedingt durch den zunehmenden Füllstand im Steigrohr zu. Beide Faktoren bedingen die zeitliche Abnahme des Flusses über die Aquaporinmembran.

Um den Fluss über eine Aquaporinmembran für verschiedene Membranchargen, Reproduzierbarkeit, Regeneration und verschiedene weitere Einflussfaktoren zu überprüfen wurde bei einer 5%igen Glucoselösung in Wasser der Fluss bestimmt. Die Ergebnisse (Steigung [mbar/min], gemessen zwischen 30 und 90 min) gegen die Anzahl der Verwendung sind in Abbildung 75 dargestellt.

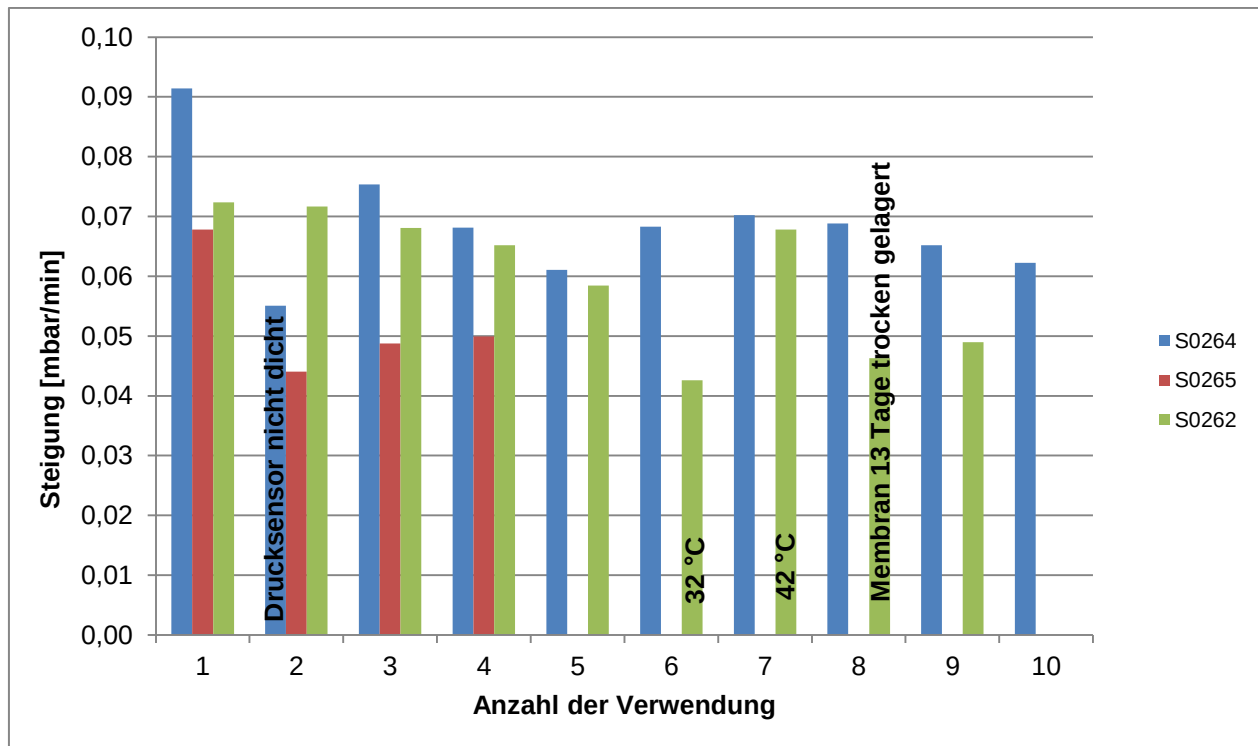


Abbildung 75: UF Versuche mit 2 Seiten Aquaporinmembran (S0264, S0265, S0262), 5% Glucose in Wasser (Steigung [mbar/min] gegen die Anzahl der Verwendung), Steigung berechnet aus 1 h zwischen 30 und 90 min.

Zur „Regeneration“ der Aquaporinmembran wurde nach einem UF Versuch die Membran dreimal mit ca. 2 l destilliertem Wasser gespült und in frischem destilliertem Wasser in einem 5 l Becherglas gelagert sowie über Nacht in destilliertem Wasser regeneriert. Zur Überprüfung des Einflusses von trockenen Lagerbedingungen wurde die Membran in einem Versuch für 13 Tage trocken gelagert und anschließend ein UF Versuch durchgeführt. Des Weiteren wurde der Einfluss von der Temperatur überprüft, indem diese um $\pm 5\text{ °C}$ im Vergleich zur Standardtemperatur von 37 °C variiert wurde (siehe Abbildung 75).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Fluss unter Verwendung der 3 verschiedenen Membranen bei der ersten Verwendung jeweils am höchsten ist. Vor allem bei den Chargen S0264 und S0265 sind Unterschiede zu erkennen. Die Regeneration der Membran findet statt, da auch bei Mehrfachverwendung (S0264) keine tendenzielle Abnahme oder Zunahme zu erkennen ist.

Bei der Versuchsdurchführung bei 32 °C bzw. 42 °C ist eine klare Erniedrigung bzw. Erhöhung im Fluss über die Aquaporinmembran zu erkennen. Dies könnte zum einen an dem Einfluss der Viskosität, welcher bereits im Rahmen der Ergebnisse der hydraulischen Leitfähigkeit diskutiert wurde, liegen bzw. an anderen strukturellen Änderungen bedingt durch die Temperaturänderung. Ebenfalls durch die Austrocknung der Membran findet eine klare Erniedrigung auch bei der zweiten Durchführung (Nr. 9) statt. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nochmals darzustellen, wurde jeweils der Mittelwert sowie Standardabweichung aus den Versuchen unter „Standardbedingungen“ (37 °C) berechnet und in Abbildung 76 jeweils von einer Membrancharge sowie als Mittelwert aus allen drei verwendeten Membranchargen dargestellt.

Der Fluss der drei einzelnen Membranchargen liegt unter den gegebenen Versuchsbedingungen zwischen 0,05 mbar/min und 0,07 mbar/min. Auch bei Verwendung derselben Membrancharge variiert der Fluss um ca. +/- 0,01 mbar/min, was auf kleine Unterschiede in der Reinigungseffizienz zurückzuführen ist. Um eine Versuchsreihe durchzuführen sollte also in zukünftigen Versuchen immer eine Mehrfachbestimmung durchgeführt werden und möglichst dieselbe Membrancharge verwendet werden, um die Ergebnisse zu vergleichen.

Der Unterschied zwischen den unterschiedlichen Membranchargen liegt an der unterschiedlichen hydraulischen Leitfähigkeit der Membran, verursacht durch Inhomogenitäten durch den Herstellungsprozess. Laut Angaben des Herstellers gibt es Variationen im Anteil der aktiven Aquaporine innerhalb der Membran.

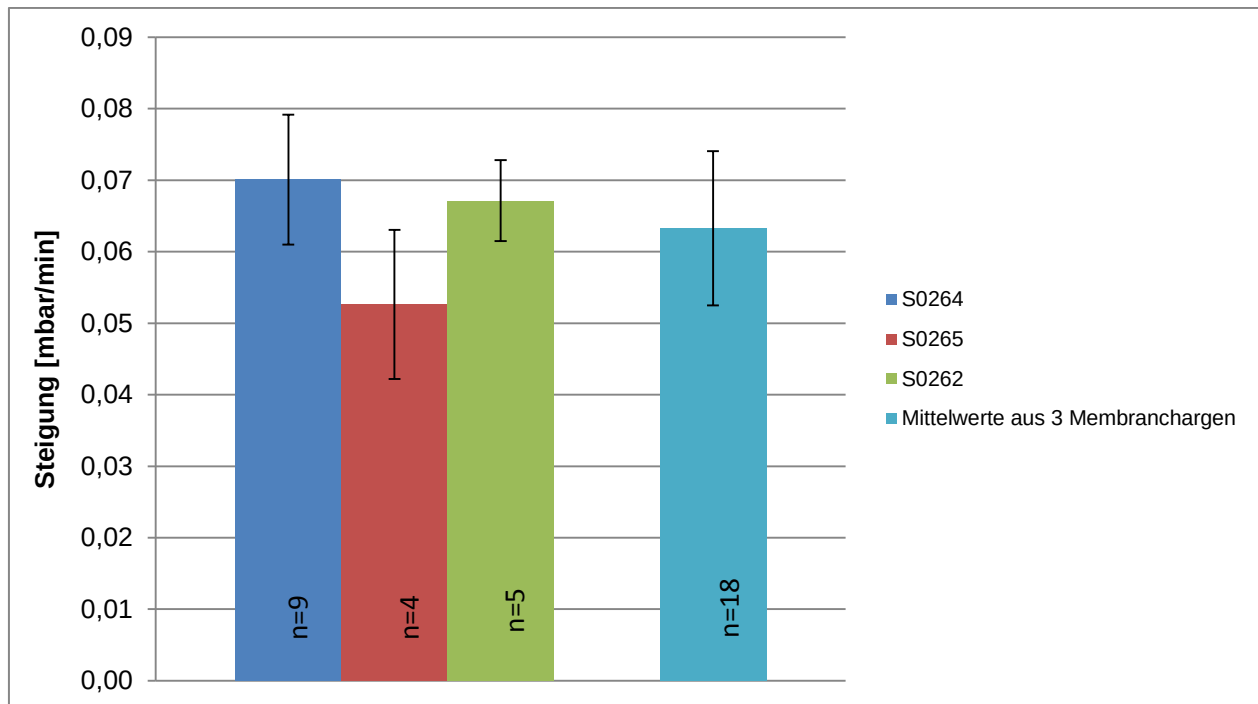


Abbildung 76: UF Versuche mit 2 Seiten Aquaporinmembran, 5% Glucose in Wasser, Darstellung Reproduzierbarkeit der Versuche, Steigung berechnet aus 1 h zwischen 30 und 90 min.

Zur Durchführung der UF Versuchen mit osmotischen Agenzien und einer zusätzlichen Membran für die kleinen Poren wurde im Folgenden die gleiche Membrancharge der Aquaporinmembran verwendet.

9.3.2 Ergebnisse der Ultrafiltrationsversuche mit Glucose und Polyglucose

Um nochmals den Effekt auf die Ultrafiltration von einer Membranen mit möglicherweise zu kleinen Poren im Vergleich zu der CTA 20 kDa Membran zu zeigen, wurde in der folgenden Versuchsreihe die CTA 10 kDa Membran gewählt. Als Testlösung wurde eine 2,5%ige Glucoselösung in Wasser verwendet, eine Seitenfläche mit einer Aquaporinmembran und jeweils 1 bzw. 2 Seitenflächen mit der entsprechenden CTA Membran bestückt, um auch den Effekt einer Variation im Flächenanteil der kleinen Poren zu analysieren. Die Ergebnisse der Änderung des Druckes [mbar] als Maß für die Volumenänderung bzw. Füllhöhe gegen die Zeit [min] sind in Abbildung 77 dargestellt.

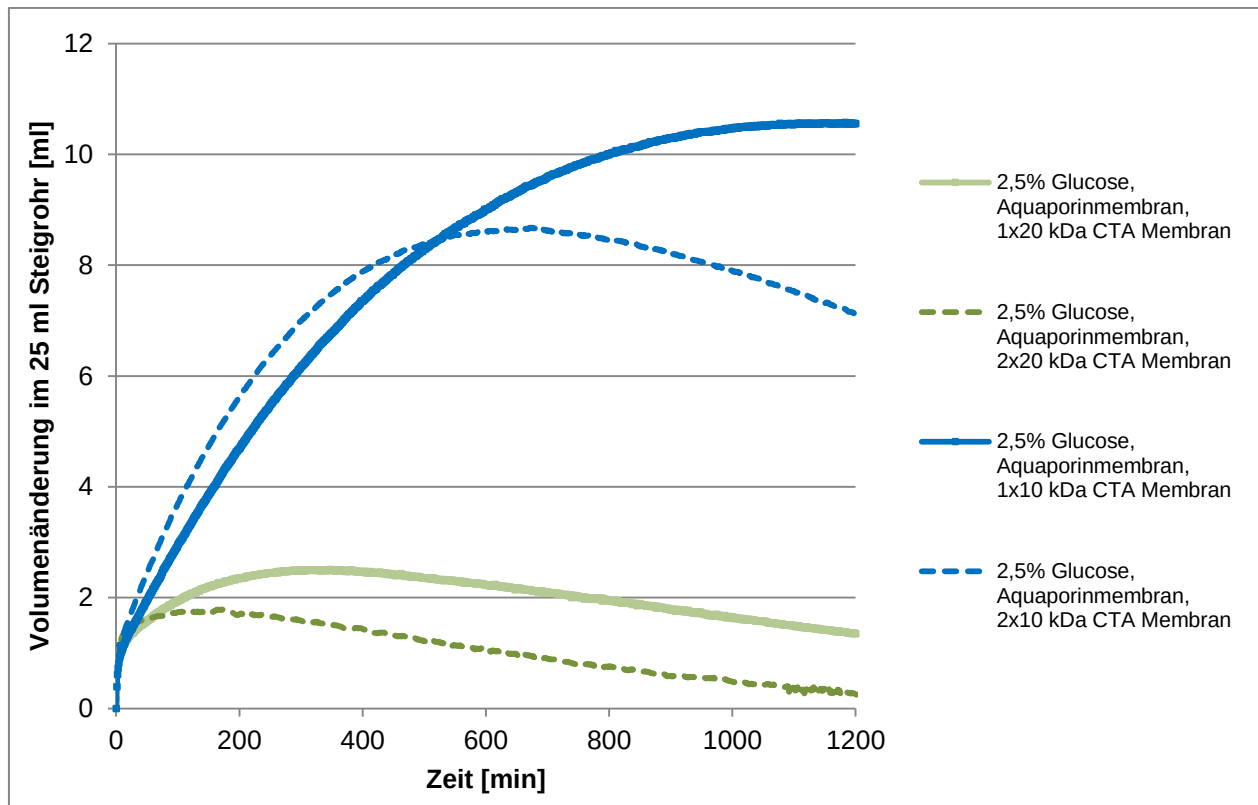


Abbildung 77: UF Versuch (Druck [mbar] gegen die Zeit [min] mit jeweils eine Seite Aquaporinmembran (S0266), Variation der Membranfläche (10 kDa CTA und 20 kDa CTA Membran), 2,5% Glucose in Wasser, Außenmedium Wasser, 37 °C.

Die blau markierten Datenreihen stellen jeweils die Versuche mit der 10 kDa Membran dar, die grün markierten mit der 20 kDa Membran, wobei gestrichelte Kurven die doppelte Membranfläche der potentiellen „kleinen Poren Membran“ haben. Bei Verwendung der gleichen Membranfläche, kleine Poren wie Aquaporinmembran, steigt bei Verwendung der 10 kDa Membran das Volumen kontinuierlich aber langsamer werdend auf 10 ml an. Bei der 20 kDa Membran wird nach etwas 200-300 min ein Maximum von ca. 2 ml erreicht, danach fällt das Füllvolumen wieder ab. Bei Verwendung der doppelten Membranfläche der 10 kDa Membran im Vergleich zur Aquaporinmembran wird eine maximale Volumenzunahme nach ca. 10 Stunden erreicht. Dies könnte daran liegen, dass der Reflektionskoeffizient von Glucose an einer 10 kDa Membran zu hoch ist und somit die Konzentration an Zucker länger aufrechterhalten bleibt, als am Peritoneum des Menschen.

Bei der doppelten Fläche der 20 kDa Membran im Vergleich zur Aquaporinmembran wird das Maximum bereits bei etwa 50-100 min erreicht, danach nimmt das Volumen innerhalb der 1200 min fast wieder auf das Ausgangsniveau ab. Wie im Theorieteil bereits beschrieben, finden beim Einsatz von Glucose als osmotisches Agens eine Volumenzunahme bis ca. 240 min statt (siehe Abbildung 18), anschließend findet eine Rückfiltration statt, sofern die Dialyselösung nicht vom Patienten ausgetauscht wird.

Betrachtet man die experimentellen Ergebnisse bei Verwendung der 20 kDa Membran, so ist erkennbar, dass das Ultrafiltrationsprofil qualitativ dem des Peritoneums eines Patienten ähnelt. Unter Verwendung von einer Seite der 20 kDa Membran wird ein Maximum nach ca. 300 min erreicht, bei zwei 20 kDa Membranen nach ca. 160 min. Ausblickend gilt es in weiteren Versuchsreihen zum einen den Reflektionskoeffizienten von Glucose an einer Membran zu bestimmen, welche den kleinen Poren des Peritoneums ähnelt (siehe Kapitel 11.3) sowie das richtige Membranflächenverhältnis von kleinen, großen Poren und Aquaporinen zu definieren.

Um ein geeignetes Verhältnis zwischen kleinen Poren und Aquaporinen zu evaluieren, könnte der *sodium sieving effect* unter Verwendung von Glucose als osmotisches Agens genutzt werden (siehe Abbildung 9).

Durch Variation der Flächenverhältnisse der Membranen und Überprüfung der Ultrafiltration sowie der Veränderung der Natriumkonzentrationen ließe sich der Versuchsaufbau so optimieren, dass die Stofftransporte denen eines bestimmten Dialysepatienten entsprechen.

Anhand von Abbildung 77 wird deutlich, dass die Verwendung der doppelten Membranfläche der CTA 20 kDa Membran im Vergleich zur Aquaporinmembran einen zu hohen Anteil an kleinen Poren darstellt. Aus der Literatur ist anhand von Untersuchungen der Patienten sowie von Computersimulationen (siehe Abbildung 8 und Abbildung 18) bekannt, dass unter Verwendung einer 3,86%igen Glucoselösung ein UF Maximum nach ca. 4 Stunden erreicht wird. Der Schnittpunkt der 3,86%igen UF Kurve von Glucose mit der 7,5%igen Icodextrinlösung liegt zwischen 500 und 600 min.

In den folgenden Versuchen wurde aus diesem Grund eine Variation in der Glucosekonzentration von 2,5% und 5% gewählt sowie eine 5%ige Icodextrinlösung eingesetzt, um die UF Verläufe zu vergleichen. Die Ergebnisse der Volumenänderung im 25 ml Steigrohr [ml] gegen die Zeit [min] sind in Abbildung 78 dargestellt.

Bei der Auswertung ist jedoch zu beachten, dass die Substanzen lediglich in destilliertem Wasser und nicht in einer Matrixlösung gelöst sind und im Außenmedium (Plasmaersatz) auch keine kolloidosmotischen Substanzen zugegeben wurden.

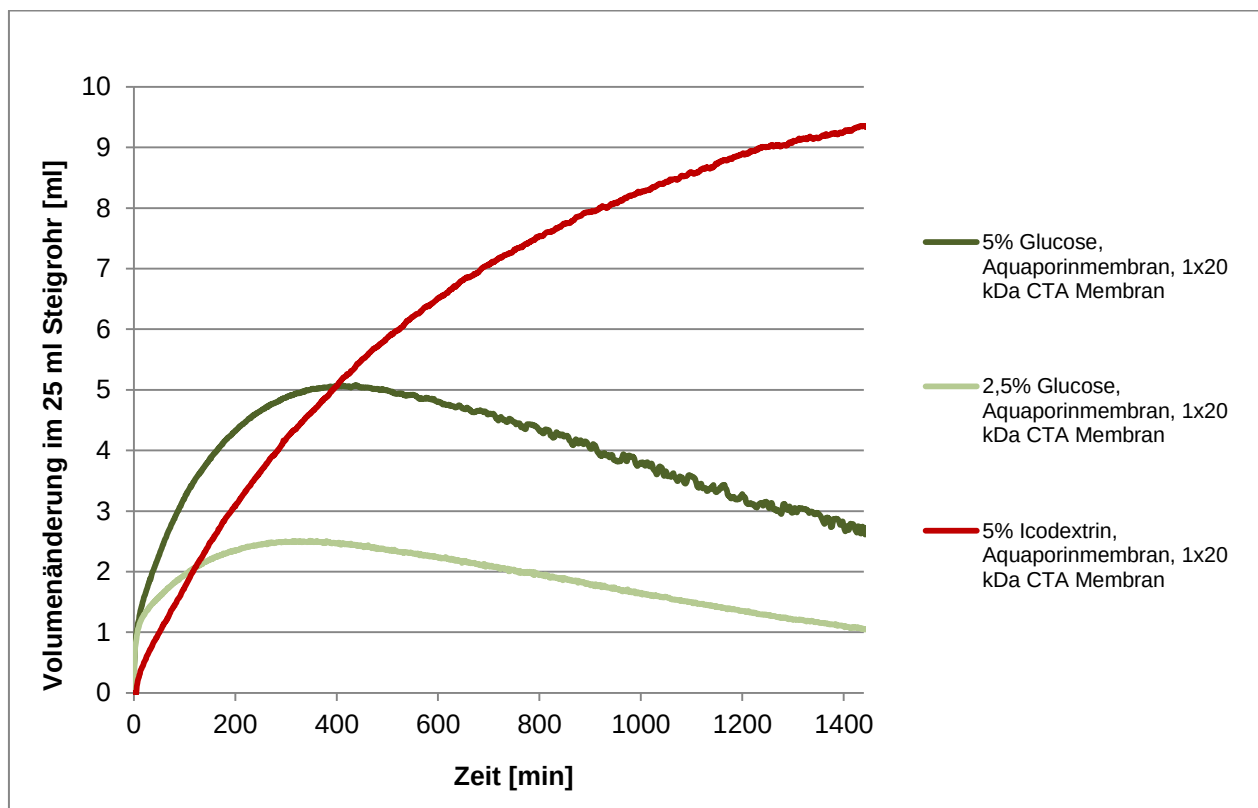


Abbildung 78: UF Versuche (Volumenänderung [ml] gegen die Zeit [min] mit jeweils eine Seite Aquaporinmembran (S0266), eine Seite CTA 20 kDa Membran, Testlösungen in Wasser, Außenmedium Wasser, 37 °C.

Erwartungsgemäß findet bei Kombination einer Aquaporinmembran mit einer 20 kDa Membran bei den beiden Glucoselösungen eine schnelle Ultrafiltration statt.

Nach ca. 300 bis 500 min wird konzentrationsabhängig ein Maximum erreicht und anschließend ist eine Rückfiltration aus dem Steigrohr in Richtung Außenmedium zu beobachten. Bei Verwendung der Icodextrinlösung findet eine langsame aber kontinuierlich ansteigende Ultrafiltration statt, die Steigung nimmt aber ebenfalls aufgrund des zunehmenden hydrostatischen Druckes im Steigrohr über die Zeit ab. Die UF Verläufe der Lösungen mit beiden osmotischen Agenzien sind qualitativ ähnlich den anhand von Computersimulationen berechneten Verläufen (Vergleich Abbildung 8).

Durch eine höhere Glucosekonzentration verschiebt sich das Maximum der Volumenänderung in Richtung zu längeren Verweilzeiten, außerdem ist zu Beginn eine stärkere Steigung in der UF Rate gegeben, was ebenfalls in Publikationen beschrieben ist (siehe Abbildung 79).

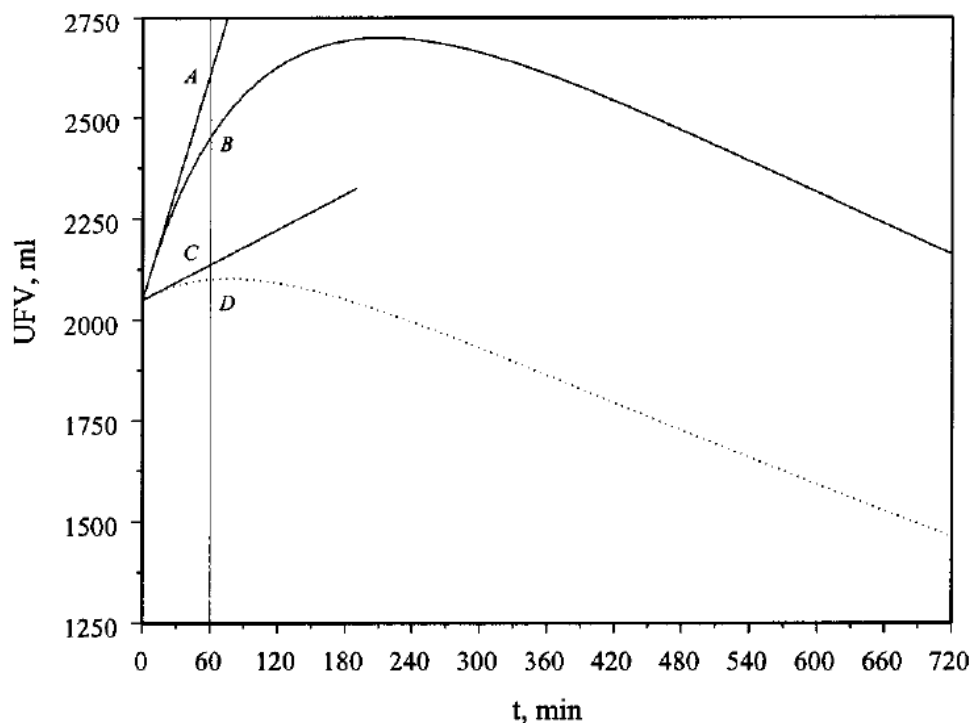


Abbildung 79: Ultrafiltrationsprofil unter Verwendung einer 3,86%igen Lösung (durchgezogene Linie) sowie einer 1,36%igen Lösung (gestrichelte Linie) mit Glucose als osmotischem Agens.^[97]

Die gute qualitative Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des *in vitro* Testsystem C und vergleichend verwendeten Literaturwerten lässt die Schlussfolgerung zu, dass mit diesem Testsystem eine gute experimentelle Beschreibung der Stofftransportvorgänge im Peritoneum gegeben ist.

9.4 Effekt von Agonisten und Antagonisten an einer Aquaporinmembran auf die Ultrafiltration unter Verwendung von Glucosetestlösungen

In vitro Testsystem C wurde in einer weiteren Versuchsreihe benutzt, um mögliche Effekte auf die Ultrafiltrationsleistung bedingt durch Agonisten bzw. Antagonisten zu detektieren. Es wurde auf Testsystem C zurückgegriffen, da zum einen das Füllvolumen im Würfelfinneren gering ist und somit nur wenig Testsubstanz für die Versuche notwendig ist, aber auch bedingt durch den Drucksensor eine sehr genaue Aufzeichnung der Füllvolumenänderung möglich ist.

Aufgrund der chargenbedingten Schwankungen der Aquaporinmembran wurde in Vorversuchen mit Hilfe der Vorstufe des Agonisten AqF026 Furosemid ein Versuchsdesign entwickelt und dieses im Rahmen dieser Arbeit auf den Antagonisten AqB013 angewendet.

Für die UF Versuche wurde jeweils eine Seite des Würfels mit einer Aquaporinmembran belegt, als Testlösung eine 5%ige Glucoselösung verwendet und die Membran vor der Verwendung mit dem Agonisten/Antagonisten bzw. der Referenzlösung bei 37 °C für 3 h inkubiert. Es wurde eine Stammlösung in DMSO (5 mM) des Antagonisten AqB013 hergestellt und diese für die Inkubation mit destilliertem Wasser auf 50 µM verdünnt. In der Literatur wird in diesem Konzentrationsbereich ein maximaler Effekt des Antagonisten beschrieben.^[106] Als Referenzwerte wurden drei weitere Versuche durchgeführt, Vorbehandlung der Membran, sowie Testlösung ist Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: Überblick UF-Versuche mit AqB013.

Versuchsbezeichnung	Vorbehandlung der Membran	Testlösung
Negativkontrolle 1. Hälfte	keine	5% Glucose in Wasser
Referenzversuch	1:100 DMSO in Wasser (3 h, 37 °C)	5% Glucose in Wasser
Negativkontrolle 2. Hälfte	keine	5% Glucose in Wasser
AqB013	50 μ M AqB013 (3 h, 37 °C)	5% Glucose in Wasser

Durch die Negativkontrolle ist gewährleistet, dass beide Hälften einer Membrancharge die gleiche Vorbehandlung bzw. Anzahl der Verwendung besitzen. Im Referenzversuch findet die Vorbehandlung der Membran nach dem gleichen Schema statt, jedoch ohne Antagonist AqB013. Die Ergebnisse des Flusses [ml/min] für verschiedene Zeitabschnitte ist in Abbildung 80 dargestellt.

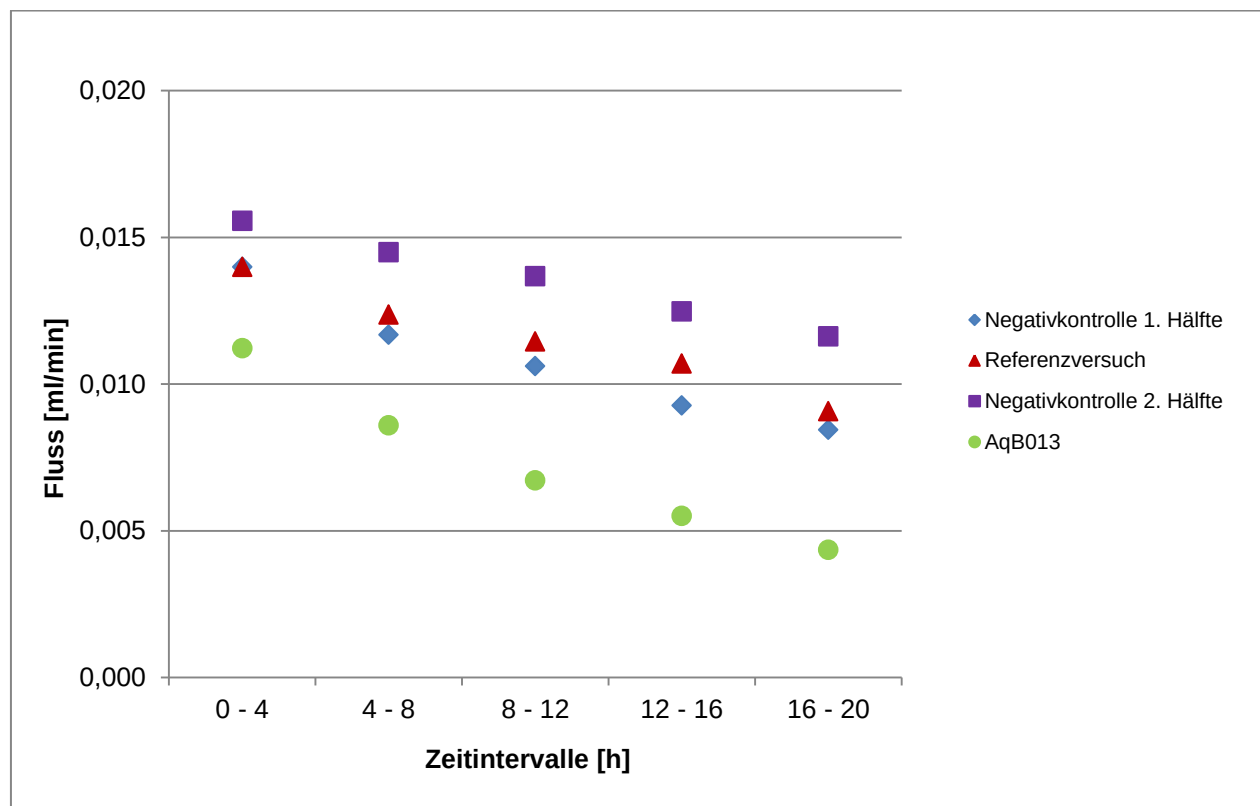


Abbildung 80: UF-Ergebnisse 50 μ M AqB013 an Aquaporinmembran (S0408).

Vergleicht man den Fluss des Referenzversuches mit dem des AqB013 Versuches, so kann man eine deutliche Verringerung erkennen, welche schon zu Beginn des UF-Versuches einsetzt. Durch die Inkubation der Aquaporinmembran mit der 50 μ M AqB013 Testlösung scheint eine Verringerung des Flusses über die Aquaporinmembran erzielt zu werden. Im Rahmen dieser Arbeit, konnte aus Zeitgründen die Durchführung des UF-Versuches nur einmal exemplarisch durchgeführt werden. Als Ausblick gilt es den Effekt aller in Tabelle 15 aufgezeigten Agonisten und Antagonisten zu untersuchen.

10 Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur Charakterisierung der Transportvorgänge am Peritoneum unter Berücksichtigung der beteiligten Transportwege an einer Peritonealmembran. Parallel wurde der Einfluss des osmotischen Agens charakterisiert und der Effekt der Lösung (z.B. Makromoleküle, Matrixeffekte). Die Untersuchungen fanden dabei mit verschiedenen Testsystemen statt, die basierend auf den Ergebnissen weiterentwickelt wurden. Dabei wurde die Komplexität sowohl von den Lösungen/Substanzen als auch von den Testsystemen schrittweise gesteigert (siehe Abbildung 81).

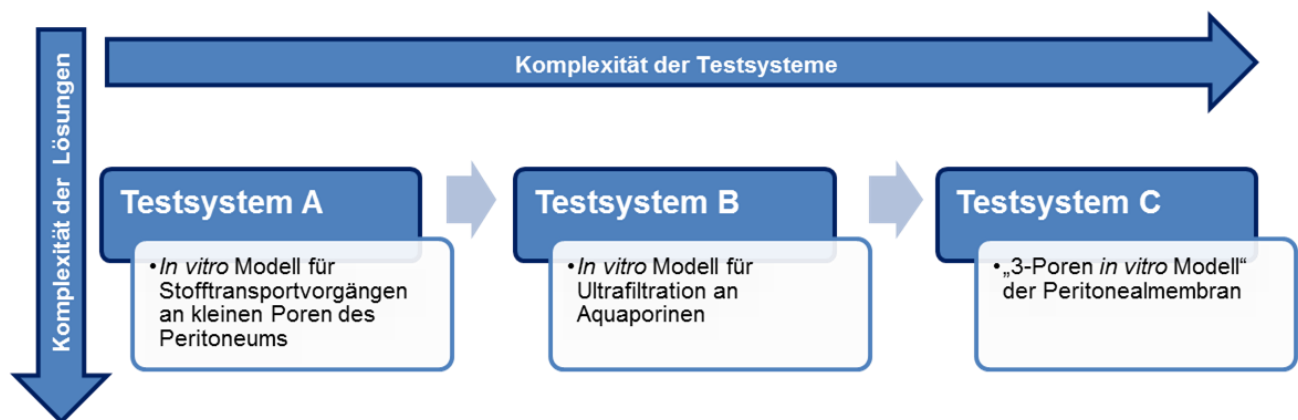


Abbildung 81: Übersicht der Testsysteme.

Es wurde das bereits bestehende *in vitro* Testsystem A genutzt, um zum einen osmotische Agenzien hinsichtlich ihrer Ultrafiltrationsleistung zu untersuchen und zum anderen als Vorstufe zum komplexeren Testsystem C weitere Effekte hinsichtlich des Transportes von Flüssigkeit sowie gelöster Substanzen zu analysieren. Substanzen mit höheren molaren Massen zeichneten sich durch längere aber langsame Ultrafiltrationsleistung aus, niedermolekulare Substanzen durch eine schnelle, aber nur kurze UF-Leistung.

In Zusammenarbeit mit der FSU Jena wurden verschiedene Stärkederivate synthetisiert, für den Einsatz als potentielle osmotische Agenzien. Es konnte mit Hilfe der Ultrafiltrationsversuche in *in vitro* Testsystem A gezeigt werden, dass die beiden Stärkederivate Sulfoethylstärke und Stärkepropylphosphonate (siehe Abbildung 82) schon ab einem Substitutionsgrad von 0,2 sehr hohe Ultrafiltrationsleistungen sowohl hinsichtlich der *short* als auch *long dwell* Effektes zeigten.

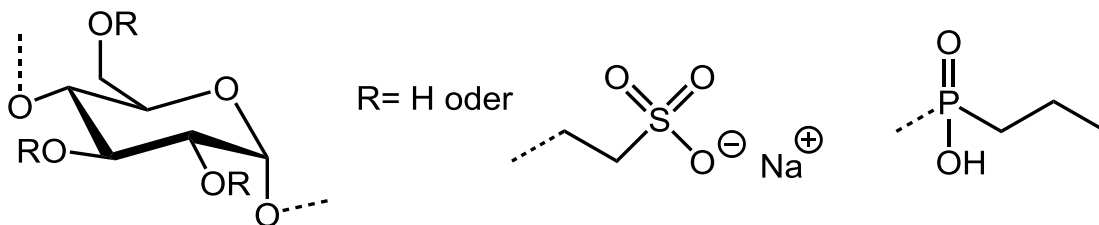


Abbildung 82: Chemische Struktur Stärkederivate (Sulfoethylstärke, linker Substituent; Stärkepropylphosphonat, rechter Substituent).

Hinsichtlich des molaren Massenbereiches der eingesetzten Stärke, konnte mit Hilfe der Dextranultrafiltrationsexperimente gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der verwendeten Membran und Verweilzeit die Ultrafiltration stark abhängig von der molaren Masse der verwendeten Substanz ist. Besonders vorteilhaft erwiesen sich im Rahmen der UF-Versuche Substanzen mit einer molaren Masse zwischen 2000 g/mol bis 5000 g/mol.

Mit Hilfe von *in vitro* Testsystem A wurden des Weiteren Untersuchungen durchgeführt, um die Ursache der sogenannten *backfiltration* unter Verwendung von Glucose als osmotisches Agens zu detektieren. Es konnte anhand der Versuche verdeutlicht werden, dass neben dem Gegendruck bei erhöhtem Füllvolumen der Membran vor allem die Höhe des kolloidosmotischen Druckes im Testsystem eine Rolle spielt (siehe Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 37)

Somit ist während der Dialysebehandlung eines Patienten auch das *Monitoring* der Albuminkonzentration im Blutplasma von großer Bedeutung, da dies maßgeblich die Ultrafiltrationsleistung beeinflusst.

Für den Einsatz in den *in vitro* Testsystemen konnte man mit Hilfe von membranometrischer Testverfahren *bovine serum albumin* als geeigneten Ersatz für Humanalbumin identifizieren (siehe Abbildung 38). Für zukünftige Versuchsreihen mit *in vitro* Testsystem C zur Analyse von Transportvorgängen sollte BSA als kolloidosmotische Substanz in einer physiologischen Konzentration eingesetzt werden.

In vitro Testsystem A wurde abschließend verwendet, um mit einer 25 kDa Membran (repräsentativ für die kleinen Poren der Blutgefäße im Peritoneum) sowie einer physiologischen Albuminkonzentration im Außenmedium den UF Verlauf von Glucose und Icodextrin zu analysieren (siehe Abbildung 40). Tendenziell konnten die typischen UF Verläufe von Glucose und Icodextrin experimentell nachgestellt werden, allerdings ergab sich für Glucose im Vergleich zu Computersimulationen, die auf Patientendaten basierten, zu geringe UF-Leistungen (siehe Abbildung 8 im Vergleich zu Abbildung 40), was daran liegt, dass der Filtrationsanteil über die Aquaporine bei *in vitro* Testsystem A nicht berücksichtigt wird. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Schritt Testsystem B und letztlich Testsystem C entwickelt, um auch alle Transportwege *in vitro* einzubeziehen.

Für ein erstes *Screening* von potentiellen osmotischen Agenzien stellt *in vitro* Testsystem A jedoch eine geeignete, reproduzierbare Methode dar, um die Ultrafiltrationsleistung über eine 1-Poren Membran in Bezug auf den Stofftransport über die kleinen Poren des Peritoneums zu charakterisieren.

Als weitere Zwischenstufe zum *in vitro* 3-Poren Modell wurde zunächst das sogenannte Testsystem B eingesetzt, um weitere Effekte hinsichtlich des Flüssigkeitstransportes an einer Aquaporinmembran zu untersuchen.

Hierbei wurde anhand der Ergebnisse deutlich, dass der Flüssigkeitstransport über Aquaporine oder eine Aquaporinmembran folgenden Abhängigkeiten besitzt:

- Flüssigkeitstransport steigt mit zunehmender Teilchenanzahl
- Ultrafiltrationsleistung ist unabhängig von der Molekülgröße / vom kolloidosmotischen Druck

- Icodextrin erzeugt im Rahmen der PD eine zu vernachlässigbare UF über Aquaporine (zu geringe Teilchenanzahl)
- Glucose erzeugt aufgrund der geringen Molekülgröße und somit hohen Teilchenanzahl während der PD eine hohe UF-Rate über die Aquaporine
- Der Fluss ist abhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Lösemittels (vermutlich der freien Anzahl an Wassermolekülen)
- Die Aquaporinmembranen zeigen chargenabhängige Unterschiede im Fluss

Zusammenfassend kann man aufgrund dieser Ergebnisse sagen, dass die Aquaporinmembran eine sehr gute Möglichkeit darstellt, den Wassertransport durch Aquaporine bei der Peritonealdialyse in *in vitro* Modellen experimentell zu untersuchen.

Abschließend wurde ein speziell entwickeltes Testsystem bei FMC gefertigt, *in vitro* Testsystem C, bei welchem die Möglichkeit besteht verschiedene Arten von Membranen gleichzeitig zu verwenden und somit den Flüssigkeits- und Stofftransport während einer Peritonealdialysebehandlung *in vitro* zu simulieren (siehe Abbildung 83).

Das Testsystem wurde zum einen verwendet, um mit Hilfe von Filtrationsversuchen und Modellsubstanzen repräsentative Membranen zu finden, welche in ihren Filtrationseigenschaften den kleinen und großen Poren des Peritoneums möglichst gut entsprechen.

Es konnte anhand der Filtrationsergebnisse sowie ersten UF Versuchen mit den beiden osmotischen Agenzien Glucose und Icodextrin gezeigt werden, dass eine 20 kDa CTA Membran von Sartorius sich als geeignet für den Einsatz für die kleinen Poren des Peritoneums erweist. Anhand der Filtrationsergebnisse mit BSA konnte ebenfalls herausgefunden werden, dass eine 100 kDa PES Membran von Sartorius für den Einsatz als große Poren verwendbar ist.

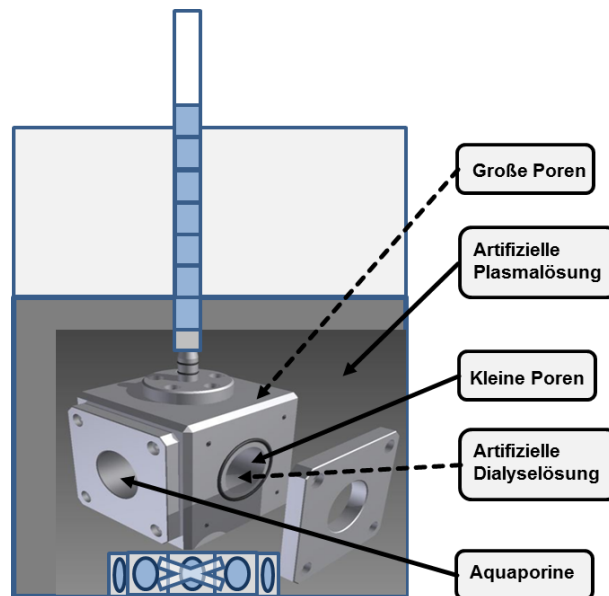


Abbildung 83: Schematische Darstellung von *in vitro* Testsystem C mit den wichtigsten Bestandteilen (Membran, Lösungen).

Das *in vitro* Testsystem C wurde außerdem für die Ermittlung spezifischer Membranparameter verwendet. Es wurden für alle potentiellen Membranen die hydraulische Leitfähigkeit bestimmt und die apparativen Modifikationen (Septum, Drucksensor für inneren und äußeren Füllstand) verwirklicht, um weitere Membranparameter wie den Reflektionskoeffizient einer Substanz in zukünftigen Versuchen messen zu können (siehe Kapitel 11.3), um diese Ergebnisse als Eingabegröße für Computermodelle verwenden zu können und so durch deren Vorhersage Ergebnisse zu optimieren.

Abschließend wurde das Testsystem sowie die darin eingebauten Aquaporinmembran verwendet, um potentielle Effekte von dem in der Literatur beschriebenen Antagonisten (AqB013) zu analysieren. Als Ergebnis konnte exemplarisch gezeigt werden, dass durch die Inkubation mit einer 50 μM Testlösung AqB013 eine Verringerung des Flusses im Vergleich zum Referenzversuch über eine Aquaporinmembran erzielt werden konnte.

Das in dieser Arbeit entwickelte *in vitro* Testsystem C besitzt das Potential, um als Testsystem für neuartige osmotische Agenzien oder Dialyselösungen hinsichtlich ihrer osmotischen Aktivität an den verschiedenen Arten von Poren am Peritoneum eingesetzt zu werden. Außerdem lassen sich UF Versuche unter gleichzeitiger Verwendung verschiedener Membranen (z.B. Aquaporinmembran, sowie einer „kleinen Poren Membran“) durchführen. Somit stellt das Testsystem eine große Weiterentwicklung zum bisher verwendeten 1-Poren Testsystem dar, da zusätzlich der Flüssigkeitstransport über Aquaporine erfasst werden kann und über eine große Poren Membran der Transport von höhermolekularen Substanzen miteinbezogen werden kann.

Damit entspricht der experimentelle Aufbau dem in der Literatur beschriebenen 3-Poren-Modell, das eingesetzt wird, um den Aufbau und die Funktionsweise des Peritoneums zu beschreiben und auf welchem auch diverse Simulationsprogramme basieren.

Des Weiteren bietet das Testsystem die Möglichkeit, neue Dialyselösungen unter *in vitro* Bedingungen zu testen (siehe Kapitel 11.4) und somit unter realitätsnahen Bedingungen ein Screening alternativer Agenzien durchzuführen. Durch dieses Testsystem könnte die Behandlung von Patienten individuell optimiert werden, indem basierend auf den ersten Behandlungsergebnissen artifizielle Membranen eingesetzt werden, die möglichst exakt die Peritonealmembran des Patienten von der Filtrationscharakteristik nachbilden und in einem weiteren Schritt die Zusammensetzung der PD-Lösung in diesem System optimiert wird.

11 Ausblick

11.1 Automatisierung der Ultrafiltrationsversuche mit *in vitro* Testsystem A

Zur Durchführung der Ultrafiltrationsversuche mit *in vitro* Testsystem A ist es wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben notwendig, zur Quantifizierung der Ultrafiltrationsleistung verschiedener osmotischer Agenzien zu definierten Zeitpunkten manuell das Gewicht der gefüllten Schlauchmembranen zu bestimmen. Auf Grund dieser manuellen Bestimmung treten einige Nachteile auf, zum einen führt diese manuelle Prozedur zu individuellen Unterschieden, welche von der zu durchführenden Person abhängig sind. Es wurde in einer komplett randomisierten Versuchsreihe inklusive der durchführenden Person ($n = 3$) gezeigt, dass die größte Differenz durch die individuellen Unterschiede erzeugt wird, welche jedoch im Bereich der Standardabweichungen der Versuchsergebnisse liegen.

Bei der Durchführung UF-Versuche mit Testsystem A besteht des Weiteren der Nachteil, dass die Gewichtszunahme nur zu einem definierten Arbeitszeitpunkt bestimmt werden kann. Es konnte dadurch keine kontinuierliche Datenaufzeichnung erfolgen.

Aufgrund dieser beiden Argumente ist es für die Zukunft von Bedeutung durch eine Automatisierung des Versuches die personenbedingten Unterschiede zu beseitigen und eine kontinuierliche Datenaufzeichnung zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konzept zur Automatisierung entwickelt, verschiedene Bestandteile realisiert und verschiedene Vorversuche durchgeführt. Der Aufbau der automatisierten UF Versuche ist in Abbildung 84 dargestellt. Zu den wichtigsten Bestandteilen, welche der Abbildung zu entnehmen sind, gehört eine Wägezelle (Typ SW 500/1000-FS, Wipotec) mit einem Messbereich von 500 g und einer Anzeigegenauigkeit von 0,005 g, welche auf einer Plattform auf einem U-förmigen Profil befestigt ist. Es wurde des Weiteren ein Verbindungsstück zwischen der Wägezelle und den gefüllten Dialysebeuteln konstruiert (Zeichnung, rot und dunkel blau).

Als Gefäß für das Außenmedium bzw. den Plasmaersatz werden Bechergläser aus Edelstahl verwendet, welche am Boden Schlauchanbindung haben. Des Weiteren ist eine programmierbare Schlauchpumpe (MCP Process, Cole Parmer) notwendig, um in dem späteren Versuch, das Außenmedium im Becherglas abzupumpen und wieder in das Becherglas zurück zu pumpen. Zum Verschließen der gefüllten Dialysemembranen wurden Stabmagnete verwendet, die an den Kanten abgerundet sind, um ein Abfließen des Außenmediums während der Wägung zu gewährleisten. Die Effektivität der abgerundeten Verschlüsse wurde in Vorversuchen manuell getestet. Zur Temperierung ist wie der manuellen Durchführung ein Wasserbad und Thermostat notwendig.

Die zukünftige automatisierte Versuchsdurchführung der UF Versuche könnte nach folgendem Ablauf stattfinden:

- 1) Manuelles Befüllen der Dialysemembran mit artifizieller Dialyselösung
- 2) Vortemperierung der artifizieller Plasmalösung (37 °C) zum späteren Befüllen in die Edelstahlbechergläser
- 3) Benetzung der Dialysemembran vor Versuchsbeginn mit Außenmedium
- 4) Befestigung der Dialysemembran in dem Verbindungsstück zur Wägezelle
- 5) Starten der Aufzeichnung des Schlauchgewichtes durch die Wägezelle
- 6) Befüllen der Edelstahlbechergläser mit Hilfe des Schlauchpumpe
- 7) Gewichtsbestimmung zum Zeitpunkt X
 - a. Entfernung des Außenmediums mit Hilfe der Schlauchpumpe
 - b. Abtropfen der gefüllten Dialysebeutel (30 s → aus Vorversuchen)
 - c. Aufzeichnung des Gewichtes mittels Wägezelle
 - d. Befüllen der Edelstahlbechergläser mittels Schlauchpumpe
- 8) Manuelles Beenden des Ultrafiltrationsversuches durch Entnehmen des gefüllten Schlauchsystems

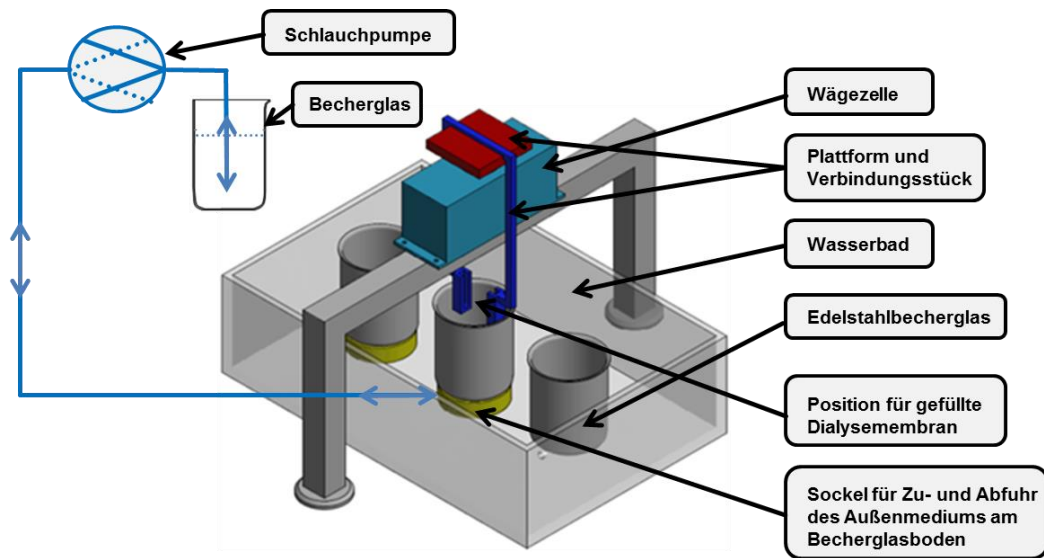


Abbildung 84: Schematische Skizze zur Automatisierung der UF Versuche mit *in vitro* Testsystem A.

Für die Durchführung des automatisierten UF-Versuchs im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits alle notwendigen Bestandteile beschafft bzw. angefertigt. Als nächster Schritt, zur Umsetzung des Versuches, muss eine Programmierung der Schlauchpumpe sowie der Wägezelle mittels LabVIEW erfolgen, sodass zu den gewünschten Zeitpunkten eine automatische Gewichtsaufzeichnung erfolgt. Somit können in Zukunft individuelle personenbezogene Effekte verringert oder beseitigt werden und eine kontinuierliche Gewichtsaufzeichnung ermöglicht werden.

11.2 Durchführung von UF-Versuchen mit Agonisten und Antagonisten an einer Aquaporinmembran

Wie bereits in Kapitel 9.4 gezeigt werden konnte, führte die Inkubation der Aquaporinmembran mit dem in der Literatur beschriebenen Antagonisten AqB013 zu einer Verringerung des Flusses über die Aquaporinmembran. Für die zukünftigen Versuche ist es von großem Interesse, die Effekte der in Tabelle 15 aufgeführten Antagonisten und Agonisten zu analysieren. Dies dient zum einen zur Evaluierung der Aquaporinmembran und dem Verhalten in den *in vitro* Testsystemen.

Als Produktidee wäre aber auch ein Agonist als Zusatz in einer Dialyselösung denkbar, um somit den Fluss über die Aquaporine an den Blutgefäßen der Peritonealmembran zu steigern. In zukünftigen Versuchen soll aus diesem Grund auch der Effekt von Agonisten und Antagonisten in der Versuchslösung auf die Ultrafiltration getestet werden.

11.3 Bestimmung des spezifischen Reflektionskoeffizienten von Substanzen an Membranen

Neben der hydraulischen Leitfähigkeit (siehe Kapitel 8.2.1) als spezifischer Membranparameter ist ein weiterer wichtiger Kennwert der Reflektionskoeffizient einer Substanz an einer Membran. Dieser Parameter ist vor allem als Eingabewert für Computersimulationen im Rahmen der Software zur Verbesserung der Behandlungsmethode von Dialysepatienten bedeutsam.

In einem zukünftigen Versuchsprogramm soll das *in vitro* Testsystem C genutzt werden, um die Reflektionskoeffizienten von wichtigen Indikatorsubstanzen zu bestimmen. Der Reflektionskoeffizient ist jeweils abhängig von der gewählten Membran sowie der spezifischen Substanz und soll für die in Tabelle 23 dargestellten gelösten Substanzen für die CTA 20 kDa und PES 100 kDa Membran von Sartorius bestimmt werden.

Tabelle 23: Übersicht der zu untersuchenden Reflektionskoeffizienten.

Substanz	CTA 20 kDa	PES 100 kDa
Glucose	?	?
BSA	?	?
Natrium	?	?
Chlorid	?	?
Urea	?	?
Kreatinin	?	?

Zur Bestimmung des Reflektionskoeffizienten wurde bereits ein theoretisches Modell aufgestellt und die dazu notwendigen mechanischen Modifikation (Einbau des Septums und Anbringung eines Referenzdrucksensors im Außenmedium) umgesetzt.

Die allgemeine Flussgleichung (siehe Gleichung 5) wird hierzu nach dem Reflektionskoeffizienten σ_x einer Substanz X aufgelöst (siehe Gleichung 36).

$$\sigma_x = \frac{\frac{J_v}{L_p \cdot S} + \Delta p}{\Delta \Pi_x}$$

Gleichung 36

Zur Bestimmung des Kennwertes wird im Rahmen der Versuchsdurchführung eine definierte Membranfläche S der zu untersuchenden Membran in dem *in vitro* Testsystem C verwendet. Es wird eine Lösung mit einer bekannten Konzentration einer Indikatorsubstanz in das Testsystem eingebracht. Während der Versuchsdurchführung wird sowohl der Fluss als auch die Druckdifferenz automatisch über die Drucksensoren aufgezeichnet. Zu verschiedenen Zeitpunkten muss dann über das Septum eine Probe aus dem Inneren entnommen werden und aus dem Außengefäß, die Konzentrationen bestimmt werden und die osmotische Druckdifferenz berechnet werden. Die Änderung des osmotischen und hydrostatischen Druckes sowie der Volumenstrom und potentielle Probeentnahmezeiten sind schematisch in Abbildung 85 dargestellt.

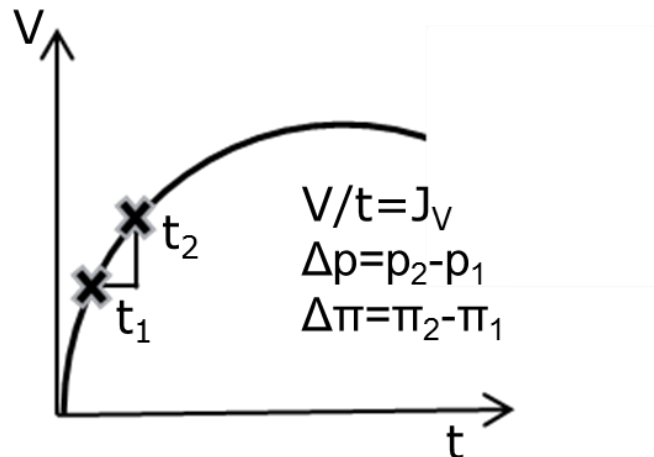


Abbildung 85: schematische Darstellung der zu bestimmenden Variablen zur Bestimmung des Reflektionskoeffizienten.

Im Rahmen dieser Versuchsdurchführung erhält man alle notwendigen Werte, um für die beiden Membranen und die aufgeführten Substanzen den Reflektionskoeffizient bestimmen zu können und den Wert als Eingabegröße für die Computersimulationen zu erhalten.

11.4 Durchführung von Membrantestverfahren unter *in vitro* Bedingungen

Als langfristiges Ziel soll das etablierte *in vitro* Testsystem C mit einem definierten Anteil an Aquaporinen, kleinen Poren und großen Poren verwendet werden, um UF Versuche mit artifiziellen Dialyselösungen und artifiziellem Plasmasubstituenten durchzuführen. Es soll zusätzlich mit Hilfe der beiden Markersubstanzen Harnstoff und Kreatinin eine Aussage über die *Clearance* sowie über die Ultrafiltrationsleistung unter Verwendung verschiedener osmotischer Agenzien getroffen werden können und damit das Filtrationsverhalten des Peritoneums eines Patienten möglichst gut nachbilden.

Um einen Patienten *in vitro* zu simulieren, soll unter Laborbedingungen ein Membrantestverfahren mit *in vitro* Testsystem C durchgeführt werden, um den Patienten optimal zu charakterisieren.

Der simulierte Patient (Testsystem C) variiert dabei in der Zusammensetzung des Anteils an Aquaporinen, kleinen und großen Poren. Bei dem Membrantest kann eine Variation hinsichtlich Zusammensetzung der Dialyselösung, Füllvolumen, Behandlungszyklus sowie Zeitpunkt des vom Patienten zu entnehmende „Blut- oder Dialysatproben“ sowie die Bestimmung des Ultrafiltrationsvolumens erfolgen, um somit Rückschlüsse auf den Transportertyp eines Patienten zu schließen. Dies erlaubt dann auch systematische Untersuchungen verschiedener Transportertypen hinsichtlich der Zusammensetzung der PD-Lösung, um ein optimales Ergebnis bei der PD-Behandlung zu erreichen. Abschließend ist in Abbildung 86 nochmals eine Übersicht des Einsatzes des *in vitro* Testsystems dargestellt, welche bereits im Rahmen der Aufgabenstellung dieser Arbeit aufgeführt wurde (siehe Abbildung 19).

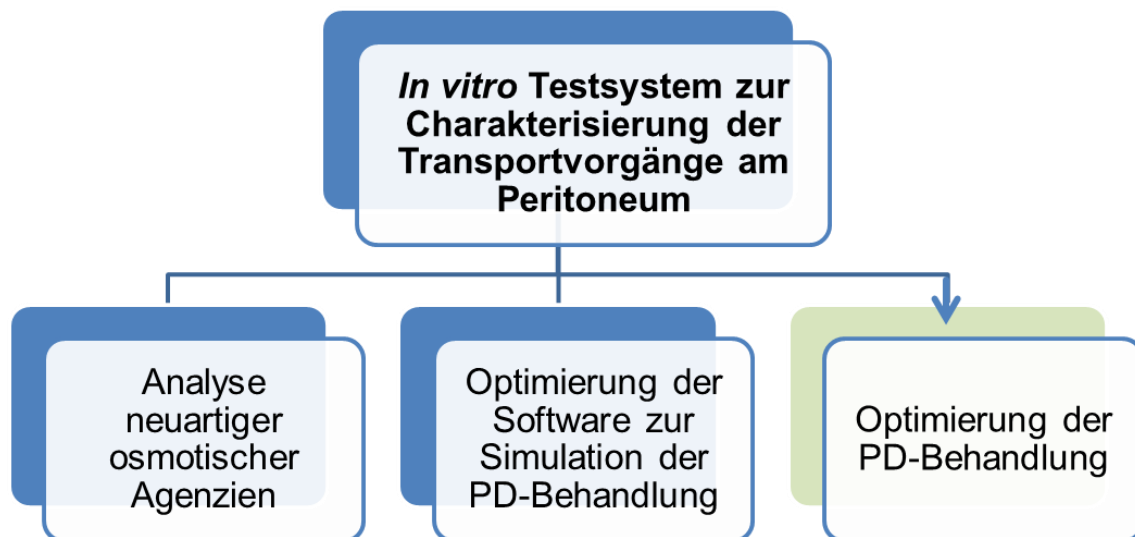


Abbildung 86: Übersicht zum Einsatz von *in vitro* Testsystem für die Peritonealdialyse.

12 Literaturverzeichnis

- [1] H. Geiger, *Nierenerkrankungen: Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie*, Schattauer Verlag; **2003**.
- [2] S. Geberth, R. Nowack, *Praxis der Dialyse*, Springer Verlag; 2. Auflage **2014**.
- [3] C. Keller, S. Geberth, *Praxis der Nephrologie*, Springer Verlag; 2. Auflage **2007**.
- [4] W. G. Couser, G. Remuzzi, S. Mendis, M. Tonelli, *Kidney Int.* **2011**, 80, 1258–1270.
- [5] A. M. El Nahas, A. K. Bello, *The Lancet* **2005**, 365, 331–340.
- [6] A. S. Levey, J. Coresh, *The Lancet* **2012**, 379, 165–180.
- [7] Fresenius SE & Co. KGaA, *Dialyse*; <https://www.fresenius.de/dialyse>, [Stand: 17. Juni 2016].
- [8] W. H. Hörl, *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis: Technik und Klinik*. Georg Thieme Verlag; 6. Auflage **2004**.
- [9] W. Van Biesen, R. C. Vanholder, N. Veys, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2000**, 11, 116–125.
- [10] S. Gilbert, D. E. Weiner, *National Kidney Foundation Primer on Kidney Disease*, Verlag: Elsevier Health Sciences; 6. Auflage **2013**.
- [11] R. Vanholder, A. Davenport, T. Hannedouche, J. Kooman, A. Kribben, N. Lameire, G. Lonnemann, P. Magner, D. Mendelssohn, S. J. Saggi, R. N. Shaffer, S. M. Moe, W. Van, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2012**, 23, 1-8.
- [12] K. Chaudhary, H. Sangha, R. Khanna, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, 6, 447–456.
- [13] R. Khanna, R. T. Krediet, *Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis*, Springer Verlag; 3. Auflage **2009**.
- [14] R. Kramme, *Medizintechnik*, Springer Verlag; 3. Auflage **2006**.
- [15] U. Kuhlmann, J. Böhrer, F. C. Luft, U. Kunzendorf, M. D. Alscher, *Nephrologie: Pathophysiologie - Klinik – Nierenersatzverfahren*, Thieme Verlag; 6. Auflage **2015**.
- [16] M. Fischbach, B. Issad, V. Dubois, R. Taamma, *Perit. Dial. Int.* **2011**, 4, 450–458.

- [17] K. S. Rabindranath, J. Adams, T. Z. Ali, C. Daly, L. Vale, A. M. Macleod, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, 22, 2991–2998.
- [18] O. Devuyst, B. Rippe, *Kidney Int.* **2014**, 85, 750–758.
- [19] O. Devuyst, J. Ni, J.-M. Verbavatz, *Biol. Cell* **2005**, 97, 667–73.
- [20] P. Agre, D. Kozono, *FEBS Letters* **2003**, 555, 72–78.
- [21] S. Silbernagl, *Taschenatlas Physiologie*, Georg Thieme Verlag; 8. Auflage **2012**.
- [22] K. Munk, *Biochemie – Zellbiologie*, Georg Thieme Verlag; **2008**.
- [23] F. Lang, P. Lang, *Basiswissen Physiologie*, Springer Verlag; 3. Auflage **2007**.
- [24] H. C. Pape, A. Kurtz, S. Silbernagl, *Physiologie*, Thieme Verlag; 7. Auflage **2014**.
- [25] J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, *Duale Reihe Physiologie*, Thieme Verlag; 2. Auflage **2012**.
- [26] FMC, *balance Gebrauchsinformation : Information für den Anwender*.
- [27] FMC, *CAPD / DPCA 17 Gebrauchsinformation : Information für den Anwender*.
- [28] B. Rutkowski, P. Tam, F. M. Van Der Sande, A. Vychytil, V. Schwenger, R. Himmele, *Am. J. Kidney Dis.* **2016**, 67, 753–761.
- [29] M. Erixon, A. Wieslander, T. Lindén, O. Carlsson, G. Forsbäck, E. Svensson, J. Å. Jönsson, P. Kjellstrand, *Perit. Dial. Int.* **2006**, 26, 490–497.
- [30] H. Y. Lee, H. C. Park, B. J. Seo, J. Y. Do, S. R. Yun, H. Y. Song, Y. H. Kim, Y. L. Kim, D. J. Kim, Y. S. Kim, C. Ahn, M. J. Kim, S. K. Shin, *Perit. Dial. Int.* **2005**, 25, 248–255.
- [31] C. Jacobs, C. Kjellstrand, K. Koch, *Replacement of Renal Function by Dialysis*, Springer Verlag; 4. Auflage **2008**.
- [32] J. D. Williams, N. Topley, K. J. Craig, R. K. Mackenzie, M. Pischetsrieder, C. Lage, J. Passlick-deetjen, *Kidney Int.* **2004**, 66, 408–418.
- [33] Baxter, *Peritoneal Dialysis, solution portfolio*; **2011**.
- [34] P. Y. Bruice, *Organische Chemie: Studieren kompakt*, Pearson Verlag; 5. Auflage **2011**.
- [35] P. H. List, L. Hörhammer, *Arzneiformen und Hilfsstoffe: Teil B: Hilfsstoffe*, Springer Verlag; 4. Auflage **2013**.

- [36] C. Ronco, R. Dell'Aquila, M. Rodighiero, *Peritoneal Dialysis: A Clinical Update*, Karger Verlag, Vol. 150, **2006**.
- [37] M. Yáñez-Mó, *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 403–413.
- [38] H. P. Latscha, U. Kazmaier, H. Klein, *Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II*, Springer Verlag; 7. Auflage **2015**.
- [39] J. B. Moberly, S. Mujais, T. Gehr, R. Hamburger, S. Sprague, A. Kucharski, R. Reynolds, F. Ogrinc, L. Martis, M. Wolfson, *Kidney Int.* **2002**, 62, 23–33.
- [40] B. Rippe, L. Levin, *Kidney Int.* **2000**, 57, 2546–2556.
- [41] O. Devuyst, A. J. Yool, *Perit. Dial. Int.* **2010**, 30, 135–141.
- [42] E. Migliati, N. Meurice, P. DuBois, J. S. Fang, S. Somasekharan, E. Beckett, G. Flynn, A. J. Yool, *Mol. Pharmacol.* **2009**, 76, 105–112.
- [43] A. J. Yool, J. Morelle, Y. Cnops, J.-M. Verbavatz, E. M. Campbell, E. Beckett, G. W. Booker, G. Flynn, O. Devuyst, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2013**, 24, 1045–1052.
- [44] D. Lamberty, *Furosemid-Derivate als Aquaporin- Modulatoren für Peritonealdialyselösungen, Vertiefungsarbeit in der Organischen Chemie*, Saarbücken **2015**.
- [45] C. Ronco, *Automated Peritoneal Dialysis*, Karger Verlag; Vol. 129, **1999**.
- [46] E. Hodzic, S. Rasic, C. Klein, A. Covic, A. Unsal, J. M. G. Cunqueiro, F. C. Prischl, A. Gauly, R. M. Kalicki, D. E. Uehlinger, *Artif. Organs* **2016**, 40, 144–152.
- [47] J. Waniewski, *Perit. Dial. Int.* **1999**, 19, Supplement 2.
- [48] G. Amici, *Nephrol. Dial. Transplant.* **1998**, 13, 120–124.
- [49] E. F. Vonesh, *Contrib. Nephrol.* **1999**, 129, 15–34.
- [50] M. F. Flessner, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2008**, 23, 2142–2146.
- [51] A. Jorres, C. Lage, J. Witowski, T. O. Bender, *Perit. Dial. Int.* **2007**, 27, 16–20.
- [52] E. T. Pride, J. Gustafson, A. Graham, L. Spainhour, V. Mauck, P. Brown, J. M. Burkart, *Perit. Dial. Int.* **2002**, 22, 365–370.
- [53] W. Van Biesen, A. Van der Tol, N. Veys, C. Dequidt, D. Vijt, N. Lameire, R. Vanholder, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, 1, 269–274.

- [54] B. Warady, F. Schaefer, S. Alexander, *Pediatric Dialysis*, Springer Verlag; 2. Auflage **2012**.
- [55] W. Van Biesen, O. Carlsson, R. Bergia, M. Brauner, A. Christensson, S. Genestier, M. Haag-Weber, J. Heaf, P. Joffe, A. C. Johansson, B. Morel, F. Prischl, D. Verbeelen, A. Vychytil, *Nephrol Dial Transpl.* **2003**, 18, 788–796.
- [56] A. C. Yamashita, *Perit. Dial. Int.* **2008**, 28, 139–143.
- [57] L. Finkler, *In vitro Charakterisierung der osmotischen und pyrogenen Eigenschaften neuartiger Agenzien in der Peritonealdialyse, Masterarbeit Biotechnologie*, Saarbücken **2013**.
- [58] S. J. Davies, *Kidney Int.* **2006**, 70, 76–83.
- [59] C. Roth, *Dialyse Produktübersicht*, **2015**.
- [60] K. Ohlrogge, K. Ebert, *Membranen: Grundlagen, Verfahren und Industrielle Anwendungen*, John Wiley & Sons Verlag; **2012**.
- [61] H.-G. Elias, *Makromoleküle: Band 3: Industrielle Polymere und Synthesen*, John Wiley & Sons Verlag; 6. Auflage **2009**.
- [62] Sigma Aldrich, *Dextrane*, http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/biochemicals/migrationbiochemicals1/dextranase_dextrans.gif, [Stand: 24-Jul-2016].
- [63] F. Kretz, F. Teufel, *Anästhesie und Intensivmedizin*, Springer Verlag; **2006**.
- [64] H. Schneemann, G. Wurm, *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Folgeband 1: Waren und Dienste*, Springer Verlag; 5. Auflage **2013**.
- [65] G. Marx, E. Muhl, K. Zacharowski, S. Zeuzem, *Die Intensivmedizin*, Springer Verlag; 12. Auflage **2015**.
- [66] W. F. Ganong, *Lehrbuch der Medizinischen Physiologie: Die Physiologie des Menschen für Studierende der Medizin und Ärzte*, Springer Verlag; 3. Auflage **2013**.
- [67] E. Erdmann, *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*, Springer Verlag; 8. Auflage **2011**.
- [68] R. Rossaint, C. Werner, B. Zwißler, *Die Anästhesiologie: Allgemeine und spezielle Anästhesiologie, Schmerztherapie und Intensivmedizin*, Springer Verlag; 3. Auflage **2012**.

- [69] R. Hampe, *Entwicklung von Wirkstoffen auf Basis von Polysacchariden für pharmazeutische Lösungen*, Diplomarbeit in der Organischen Chemie, Jena **2014**.
- [70] E. Nürnberg, P. Surmann, *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Band 2: Methoden*, Springer Verlag; **2013**.
- [71] A. Krüss, *Refraktometer*,
http://www.kruess.com/documents/BR_Refraktometer_DE_5.0.pdf
 [Stand: 14. November 2016]
- [72] Gonotec, *Osmomat 030 (Gefrierpunktosmometer)*,
<http://www.gonotec.de/de/produkte/osmomat-030>. [Stand: 10. Februar 2016].
- [73] Gonotec, *Osmomat 050 (Kolloidosmometer)*,
<http://www.gonotec.de/de/produkte/osmomat-050>. [Stand: 16. Februar 2016].
- [74] Thermo Scientific, *D-glucose for Gallery*; **2015**.
- [75] J. Koolman, K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*, Georg Thieme Verlag; 3. Auflage **2003**.
- [76] K. Dörner, *Klinische Chemie und Hämatologie*, Georg Thieme Verlag; 7. Auflage **2009**.
- [77] L. Pappenheimer, *Am. Physiol. Soc.* **1963**, 961–1034.
- [78] W. Burchard, *Polysaccharide: Eigenschaften und Nutzung*, Springer-Verlag, **2013**.
- [79] B. Flaschenträger, *Die Stoffe*, Springer-Verlag; **2013**.
- [80] V. Sharma, *Factors Affecting Starch Conversion to Ethanol in Dry Grind Corn Process*, ProQuest Verlag; **2007**.
- [81] H. Horton, L. Moran, *Biochemie*, Pearson Verlag; 4. Auflage **2008**.
- [82] L. Andus, T. Raub, *Biological Barriers to Protein Delivery*, Springer Verlag; **2012**.
- [83] Y. Zhao, C. Qiu, X. Li, A. Vararattanavech, R. Wang, X. Hu, A. G. Fane, C. Y. Tang, *Elsevier* **2012**, 424, 422–428.
- [84] Aquaporin A/S, *Aquaporin, FO Flat Sheet Test Membrane*, data sheet 1.9
- [85] M. Bäumel, K. Hergeth, T. Bein, *Intensivbuch Pharmakotherapie: Wirkstoffprofile, Behandlungsstrategien, Fehler und Gefahren in der Intensivmedizin*, Med. Wiss. Verlag-Ges.; **2009**.

- [86] M. Buchmeiser, *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis*, John Wiley & Sons Verlag; **2006**.
- [87] F. Zhu, E. Tajkhorshid, K. Schulten, *Biophys. J.* **2004**, 86, 50–57.
- [88] O. Heimbürger, *Peritoneal Transport with Icodextrin Solution*, Karger Verlag **2006**, 97–103.
- [89] H. Quentin, *Versuchsmethoden im Qualitäts-Engineering*, Springer Verlag; **2013**.
- [90] R. Goedecke, *Fluidverfahrenstechnik: Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis*, John Wiley & Sons Verlag; **2011**.
- [91] P. Präve, U. Faust, P. Praeve, W. Sittig, D. A. Sukatsch, *Handbuch der Biotechnologie*, Oldenbourg Industrieverlag; 4. Auflage **1994**.
- [92] K. L. Németh-Cahalan, J. E. Hall, K. L. Ne, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 6777–6782.
- [93] Sartorius AG, Ultrafiltration Membrane Discs,
https://www.sartorius.de/de/product-family/product-family-detail/m-ultrafiltration-membrane-discs/14609--47-----D/11858/?no_cache=1&cHash=16fbc8ee52028747308bde75cc5466e7,
 [Stand: 27. Februar 2016].
- [94] R. K. Kainthan, E. B. Muliawan, S. G. Hatzikiriakos, D. E. Brooks, *Macromolecules* **2006**, 39, 7708-7717.
- [95] M. Jakob, *Bumetanid-Derivate als Aquaporin-Modulatoren für Peritonealdialyselösungen Inhalt, Bachelorarbeit in der Organischen Chemie*, Saarbrücken **2015**.
- [96] E. Wetzels, A. Colombi, P. Dittrich, H.-J. Gurland, M. Kessel, H. Klinkmann, *Hämodialyse, Peritonealdialyse, Membranplasmapherese*, Springer Verlag; 3. Auflage **2013**.
- [97] B. Rippe, D. Venturoli, O. Simonsen, J. de Arteaga, *Perit. Dial. Int.* **2004**, 24, 10–27.
- [98] Y. Fang, L. Bian, X. Wang, *J. Memb. Sci.* **2013**, 437, 72–81.
- [99] A. Katchalsky, *Trans. Faraday Soc.* **1963**, 59, 1918-1930.
- [100] S. Mujais, E. Vonesh, *Kidney Int.* **2002**, 62, 17-22.
- [101] J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman, T. C. Fisher, *Biophys. J.* **2004**, 87, 4259–4270.

- [102] Malvern, *Dynamic Light Scattering Training*, <http://149.171.168.221/partcat/wp-content/uploads/Malvern-Zetasizer-LS.pdf>, [Stand: 14. November 2016].
- [103] Santa Cruz Biotechnologie, *PEG 6000*, <http://www.scbio.de/datasheet-302016.html>. [Stand: 14. Juni 2016].
- [104] M. Koralewski, F. Reinholz, J. Karoe, K. Waraczewski, *Polish J. Environ. Stud.* **2006**, *15*, 66–68.
- [105] G. Healthcare, *Frac-920 User Manual*, **2004**.
- [106] E. Migliati, N. Meurice, P. Dubois, J. S. Fang, S. Somasekharan, E. Beckett, G. Flynn, A. J. Yool, *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 105-112.

13 Anhang

13.1 Rasterelektronenmikroskopaufnahmen

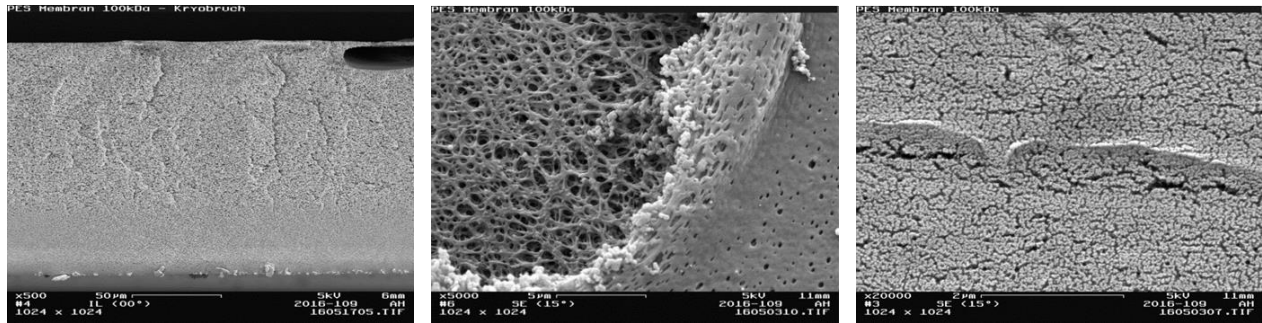


Abbildung 87: REM Aufnahme 100 kDa PES Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite)

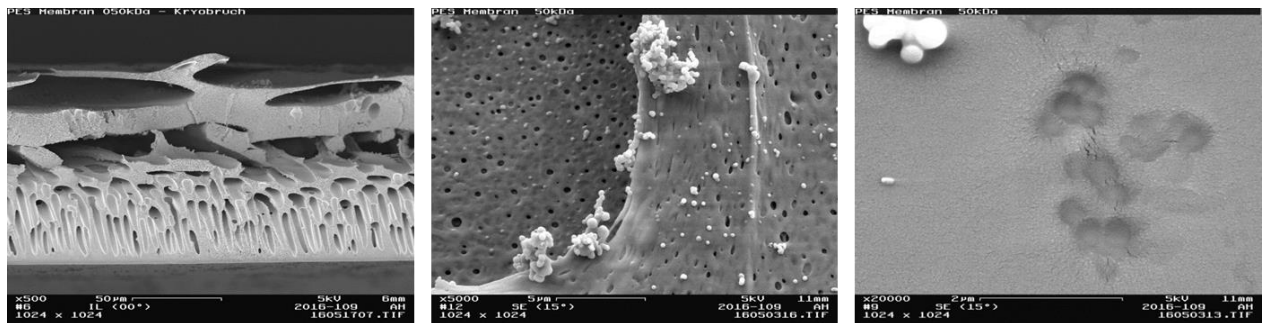


Abbildung 88: REM Aufnahme 50 kDa PES Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite)

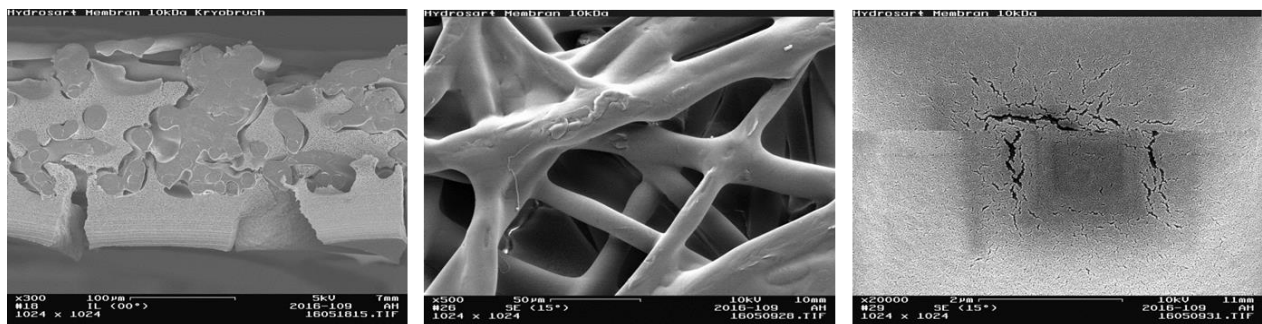


Abbildung 89: REM Aufnahme 10 kDa Hydrosart Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite)

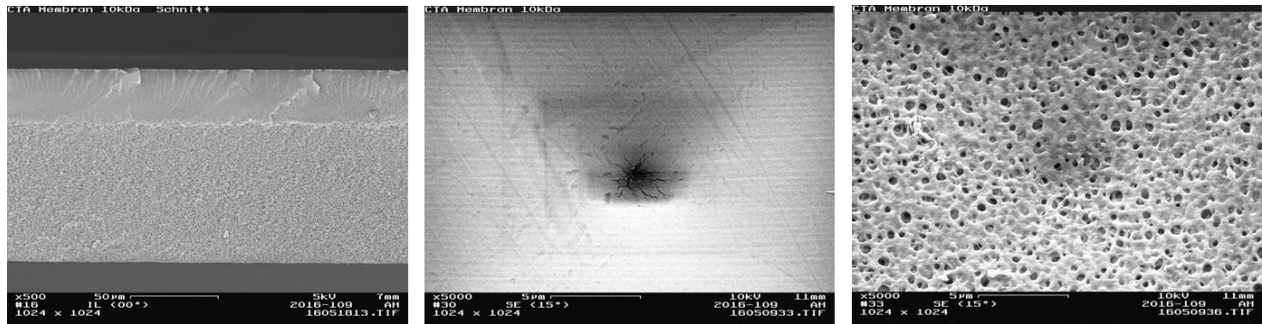


Abbildung 90: REM Aufnahme 10 kDa CTA Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite)

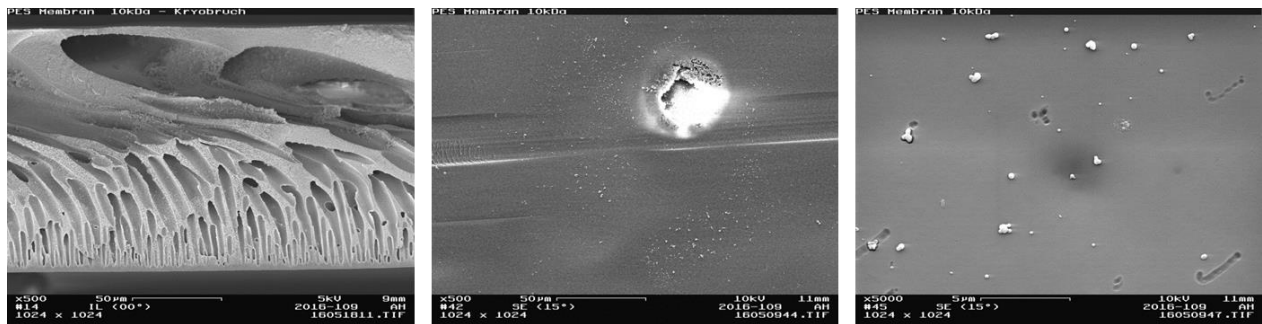


Abbildung 91: REM Aufnahme 10 kDa PES Membran (Schnitt, obere Seite, untere Seite)

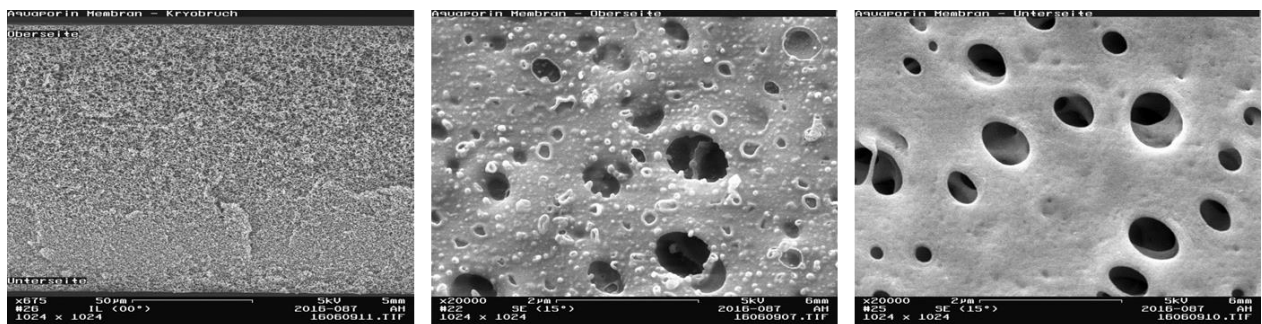


Abbildung 92: REM Aufnahme Aquaporinmembran (Schnitt, obere Seite, untere Seite)

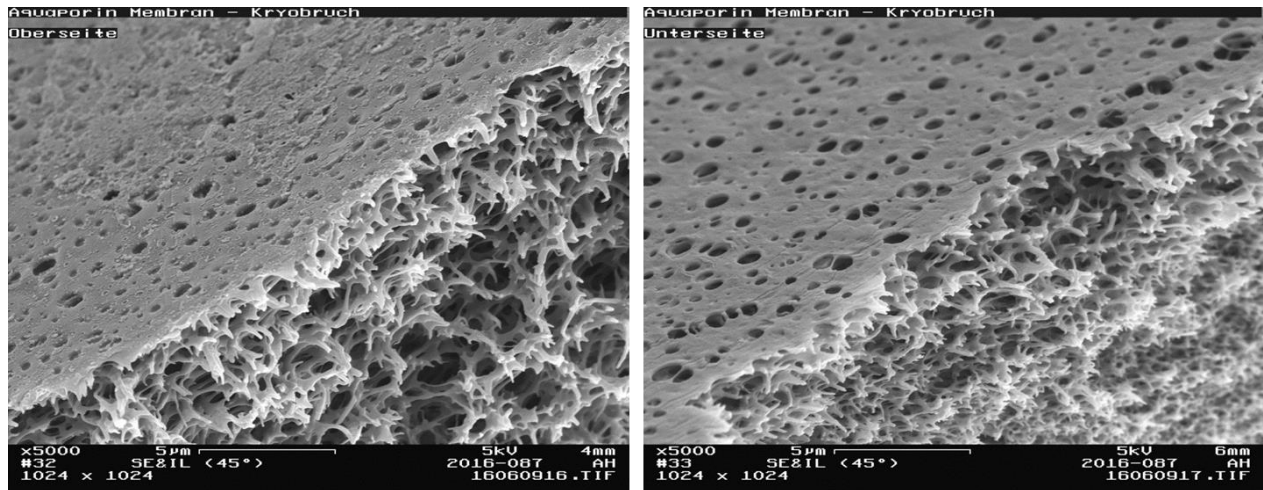


Abbildung 93: REM Aufnahme Aquaporinmembran Kryobrush der Oberseite (aktive Schicht) und Unterseite (Stützschrift)



Abbildung 94: REM Aufnahme *Track Etch Membrane* (15 nm Porendurchmesser)