

Aus der
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer

**Ein metabolischer Test zur
Diagnose einer maligne-Hyperthermie-Veranlagung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von

Martin Hager
aus Freiburg im Breisgau

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Prof. Dr. med. N. Roewer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Anetseder

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

14. Juni 2005

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	1
1.1 DEFINITION DER MALIGNEN HYPERTHERMIE	1
1.2 GESCHICHTE DER MH	1
1.3 PATHOPHYSIOLOGIE.....	2
1.4 KLINISCHE SYMPTOME DER MH	4
1.5 THERAPIE DER MH.....	5
1.6 DIAGNOSTIK DER MH-VERANLAGUNG	6
<i>In-vitro-Kontrakturtest</i>	6
<i>Genetische Diagnostik</i>	7
<i>Experimentelle Ansätze zur nicht-invasiven MH-Diagnostik</i>	8
1.7 MIKRODIALYSE.....	8
1.8 CO ₂ -PARTIALDRUCKMESSUNG	10
1.9 FRAGESTELLUNG	13
2 METHODIK	14
2.1 PROBANDEN.....	14
2.2 VERWENDETES MATERIAL.....	14
<i>Mikrodialyse</i>	14
<i>CO₂ – Partialdruckmessung</i>	15
<i>Injektionslösungen</i>	16
<i>Spritzen und Pumpen</i>	16
2.3 VERSUCHSPROTOKOLL.....	17
2.4 MODIFIZIERTES MIKRODIALYSEPROTOKOLL	20
2.5 ANALYSE	21
<i>Laktatmessung</i>	21
<i>CO₂– Partialdruckmessung</i>	22
<i>Fragebogen</i>	23
<i>Statistik</i>	25
3 ERGEBNISSE	26
3.1 BIOMETRISCHE DATEN.....	26
3.2 LAKTAT-MIKRODIALYSE	26
3.3 CO ₂ -PARTIALDRUCKMESSUNG.....	30
3.4 MONITORING.....	33
<i>Blutdruck und Herzfrequenz</i>	33

	<i>Venöse Blutgasanalyse</i>	35
	<i>Kreatinkinase und Myoglobin</i>	35
	<i>Schmerzen</i>	36
3.5	FRAGEBOGEN.....	37
4	DISKUSSION	39
4.1	NEBENWIRKUNGEN DES TESTVERFAHRENS.....	39
4.2	DOSISABHÄNGIGKEIT DER MH.....	42
4.3	INDIVIDUELLE DATENAUSWERTUNG.....	43
4.4	SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT.....	46
4.5	TATSÄCHLICHE LAKATATWERTE IM MUSKEL.....	47
4.6	AKZEPTANZ UND VERTRÄGLICHKEIT DER UNTERSUCHUNG.....	47
4.7	RESÜMEE.....	49
5	ZUSAMMENFASSUNG	50
6	LITERATURVERZEICHNIS	52

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Kalzium
CK	Kreatinkinase
Da	Dalton
DHPR	Dihydropyridin Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm
EMHG	European Malignant Hyperthermia Group
G	Gauge
IVCT	In-vitro Kontrakturtest
K	Kalium
M	Mittelwerte
MD	Mikrodialyse
MH	Maligne Hyperthermie
MHE	Maligne Hyperthermie equivocal
MHN	Maligne Hyperthermie negativ
MHS	Maligne Hyperthermie suszeptibel
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
VAS	Visuelle Analogskala

1 Einleitung

1.1 Definition der malignen Hyperthermie

Die maligne Hyperthermie (MH) ist eine metabolische Myopathie, die bei Patienten mit genetischer MH-Disposition durch volatile Inhalationsanästhetika und depolarisierende Muskelrelaxantien ausgelöst werden kann. Innerhalb von Minuten bis Stunden kann es durch unkontrollierte intramuskuläre Kalziumfreisetzung über den sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptor (RYR 1) zu einer Entgleisung des Stoffwechsels mit potentiell letalem Ausgang kommen (sogenannte MH-Krise).¹ Frühzeitiges Erkennen und Therapieren sind für das Überleben des Patienten entscheidend. Die geschätzte genetische Prävalenz der MH liegt bei 1:10.000, die klinische Inzidenz einer MH-Krise bei Allgemeinanästhesien hingegen bei 1:20.000 – 1:100.000. Die MH-Disposition ist unabhängig von Alter, Rasse und Geschlecht.

1.2 Geschichte der MH

Die Geschichte der MH beginnt wohl mit Einführung der Äthernarkose durch Morton im Jahre 1846. Erste Berichte über „Hitzschläge“ und „Ätherkrämpfe“ findet man zu Beginn des 20. Jahrhunderts.²⁻⁴ Doch erst 1960 erkannten Denborough und Lowell bei einer australischen Familie, in der 10 Familienmitglieder im Rahmen einer Narkose zu Tode kamen, den Zusammenhang zwischen Anästhesie und MH-Veranlagung.⁵ Von nun an wurde MH als eine eigenständige pharmakogenetische Erkrankung angesehen. 1966 entdeckte Hall, dass britische Landrasseschweine nach Succinylcholingabe an einem der MH ähnlichen Krankheitsbild verstarben.⁶ Das tierexperimentelle MH-Modell war gefunden. Harrison erkannte 1975, dass man durch Applikation des ursprünglich als Antibiotikum entwickelten Dantrolen die MH-Krise der Schweine durchbrechen konnte und entwickelte damit eine kausale Therapie der MH.⁷ Damit konnte die Letalität der MH von 70% auf

unter 5% gesenkt werden.⁸ Der Nachweis, dass in-vitro exzidierte Skelettmuskelbündel von MH-veranlagten Patienten nach Koffein- und Halothangabe Kontrakturen entwickeln,⁹ führte 1983 zur Einführung eines standardisierten Kontrakturtests zur Diagnose einer MH-Veranlagung.^{10;11} Anders als beim Schwein, bei dem nur eine MH-assoziierte Mutation (Arg615Cys) auf dem Gen des sarkoplasmatischen Kalzium-Kanals des Skelettmuskels (RYR1) ursächlich ist,¹² sind beim Menschen mittlerweile über 50 verschiedene MH-assoziierte Mutationen gefunden worden.^{13;14}

1.3 Pathophysiologie

In der Skelettmuskelzelle wird ein Aktionspotential von der motorischen Endplatte eines Nervs über die Muskelzellmembran und weiter über die T-Tubuli ins Innere der Zelle geleitet. Das Sarkolemm der T-Tubuli liegt hier in unmittelbarer Nachbarschaft zur Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Das fortgeleitete Aktionspotential führt zur Öffnung des spannungsabhängigen, zellmembranständigen Ca^{2+} -Kanals der T-Tubulumembran,¹⁵ dem so genannten Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR), der wiederum durch eine Konformationsänderung den Ca^{2+} -Kanal des SR, den Ryanodin-Rezeptor,¹⁶ aktiviert. Der Ryanodin-Rezeptor kommt nur in einer Isoform (RYR1) im Skelettmuskel vor. Ca^{2+} strömt entsprechend dem Konzentrationsgradienten aus dem SR ins Zytosol der Skelettmuskelzelle. Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von in Ruhe 0,01 $\mu\text{mol/l}$ auf 1-10 $\mu\text{mol/l}$ führt zur Bindung von Ca^{2+} an Troponin. Hierdurch wird das Ineinandergleiten von Aktin und Myosin ermöglicht: Die Skelettmuskelzelle kontrahiert sich. Das freigesetzte Ca^{2+} wird sofort wieder durch Ca^{2+} -ATPasen unter Energieverbrauch ins SR zurückgepumpt. Durch den Abfall der Ca^{2+} -Konzentration ist der Kontraktionsvorgang beendet, die Muskelzelle relaxiert sich. Der gesamte Vorgang, beginnend mit der Überleitung des Aktionspotentials vom Motoneuron bis hin zur Kontraktion der Muskelzelle, wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet.

Die primären pathophysiologischen Veränderungen der MH finden im Bereich dieser elektromechanischen Kopplung statt und werden bedingt durch eine Dysregulation der Kalziumhomöostase in der Skelettmuskelzelle.¹ Zusätzliche intrinsische und extrinsische Faktoren beeinflussen die sarkoplasmatische Ca^{2+} -Ausschüttung, wie z. B. die zytosolische Kalzium- und Magnesiumkonzentration,¹⁷ die Aktivität des Sympathikus,¹⁸ die Temperatur,¹⁹ der Redox-Zustand des Kanals,^{20;21} eine genetische MH-Veranlagung²² oder volatile Anästhetika²³ sowie die Gabe von Dantrolen.²⁴

Wenn MH-Veranlagung, volatile Anästhetika und zusätzliche Faktoren zusammenkommen, führt dies zu einer massiv gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR, die durch die Ca^{2+} -ATPasen nicht mehr kontrolliert werden kann.^{25;26} Die kontraktilen Filamente ziehen sich unter Verbrauch energiereicher Phosphate zusammen. Schließlich kommt es zur generalisierten Kontraktur der gesamten Skelettmuskulatur, was sich im klinischen Bild des Rigors zeigt.

Das intrazelluläre Ca^{2+} führt ausserdem zu einer massiven Steigerung des Stoffwechsels der Skelettmuskelzelle. Wegen Überschreitung des intrazellulären Sauerstoffangebotes wird die benötigte Energie bereits nach kurzer Zeit anaerob gewonnen. Dafür wird im Muskel gespeichertes Glykogen zur Energiegewinnung über Glukose-6-Phosphat zu Pyruvat und weiter zu Laktat abgebaut.

Exzessiv erhöhter Sauerstoffverbrauch sowie Kohlendioxid-, Laktat- und Wärmeproduktion führen in kurzer Zeit zu intramuskulärer Hypoxie, Hyperkapnie, Laktatazidose und Hyperthermie. Diese Symptome werden durch die aufgrund der Kontraktur eingeschränkte Perfusion der Skelettmuskulatur noch verstärkt. Der Zusammenbruch der zellulären Energiebereitstellung und energieabhängiger Membranvorgänge führt schließlich zur Ausbildung eines Muskelödems und zur Rhabdomyolyse. Aus dieser ubiquitären, muskulären Stoffwechselentgleisung entwickelt sich aufgrund der großen Skelettmuskelmasse das klinische Bild der malignen Hyperthermie.

Molekulargenetische Untersuchungen zeigen, dass ein Defekt des Ryanodinrezeptors für die vermehrte Kalziumfreisetzung ursächlich ist. Anders als bei der MH der Schweine geht man beim Menschen von genetischer

Heterogenität aus. Zum einen wurden im humanen Genom bislang mehr als 50 mit MH assoziierte Mutationen gefunden,^{13;14} zum anderen wurden MH-assozierte Mutationen in anderen an der elektromechanischen Kopplung beteiligten Proteinen beschrieben.²⁷ Allerdings werden bisher nur in 35–40% der MH-Familien MH-assozierte Mutationen im Ryanodinrezeptor gefunden.^{28;29} Keine der bisher bekannten Mutationen hat eine Prävalenz von mehr als 15% unter den Betroffenen.

1.4 Klinische Symptome der MH

Die asymptotische MH-Veranlagung manifestiert sich erst durch den Kontakt mit Triggersubstanzen als hypermetabole Stoffwechsellage.^{30;31} Als Triggersubstanzen gelten volatile Anästhetika (Chloroform, Äther, Halothan, Enfluran, Isofluran, Desfluran, Sevofluran) und depolarisierende Muskelrelaxantien (Succinylcholin).¹ Einzelne Fallberichte beschreiben weitere Triggerfaktoren, wie exzessiven Alkoholenuss,^{32;33} Benzindämpfe³⁴ oder extreme Stresssituationen,^{35;36} die zum Auftreten einer MH führten. Kommen MH-Veranlagung, MH-Triggersubstanzen und weitere Faktoren wie z. B. Stress oder Einwirkdauer der Triggersubstanzen zusammen, kann es zur Auslösung einer MH kommen.²⁵

Das klinische Erscheinungsbild der MH ist sehr unterschiedlich. Während fulminante Verlaufsformen relativ selten sind, treten Symptome wie Masseterspasmus oder Rhabdomyolyse als Zeichen einer MH wesentlich häufiger auf.⁸ Beim Auftreten initialer Symptome, die möglicherweise auf eine MH hinweisen, müssen weitere diagnostische Maßnahmen eine MH-Krise entweder ausschließen oder bestätigen. Dazu gehören die kontinuierliche Überwachung von EKG, Blutdruck, Pulsoximetrie, Kapnometrie, arterielle oder zentralvenöse Blutgasanalyse, Elektrolyt- und Kreatinkinase (CK)-Bestimmung, Temperatur sowie Urinausscheidung. Bereits die Verdachtsdiagnose einer malignen Hyperthermie muss zu einer sofortigen Therapie führen.

Bei der heute seltenen fulminanten Verlaufsform der MH treten bereits früh klinische Symptome wie Sinustachykardie, Anstieg des endtidalen CO₂,

metabolische Azidose, Abfall der O₂-Sättigung, Masseterspasmus, Rigor oder Flush auf. Den Frühzeichen folgen kardiale Arrhythmien, Zyanose, Hypoxämie, Hypotension, Elektrolytverschiebungen (vor allem K⁺-Anstieg), Rhabdomyolyse und der Anstieg der Körpertemperatur. Schließlich versterben die Patienten an Herz-Kreislaufversagen.³⁷ Einmal ausgelöst, lässt sich der Prozess nur noch mit therapeutischen Maßnahmen durchbrechen. In einer dänischen Studie im Jahre 1985 berichteten Ording et al. lediglich über einen fulminanten MH-Verlauf bei 250.000 durchgeführte Narkosen.⁸

Bei der abortiven Verlaufsform kommt es nur zu einem mäßigen Hypermetabolismus mit verzögertem Beginn und protrahiertem Verlauf. Einzelne Symptome wie Tachykardie, mäßige metabolische Azidose oder geringe Hyperkapnie lassen oft nur eine Verdachtsdiagnose zu. Häufig fällt erst postoperativ eine dunkelbraune Verfärbung des Urins als Zeichen einer Myoglobinurie in Folge der Muskelschädigung auf.

Der Masseterspasmus nach Triggerapplikation kann ein Hinweis für eine drohende MH-Krise sein.³⁸ Er stellt eine starke und anhaltende Kontraktur der Kaumuskulatur dar, die eine Öffnung des Mundes außerordentlich erschwert bis unmöglich macht. Bei der Hälfte dieser Patienten kann bei anschließender Testung eine MH-Disposition diagnostiziert werden.³⁹

1.5 Therapie der MH

Entscheidend für die Therapie der MH sind die sofortige Entfernung des Triggers, die schnelle und ausreichende Therapie mit Dantrolen, die Aufrechterhaltung einer suffizienten systemischen Oxygenierung und Perfusion sowie die Prophylaxe von Komplikationen.¹

Kommt es im Rahmen einer Narkose zum Auftreten MH-verdächtiger Symptome, sollte sofort auf eine triggerfreie Narkose umgestellt werden und mit 100% Sauerstoff bei maximalem Frischgasfluss und gesteigertem Atemminutenvolumen weiter beatmet werden. Wenn möglich, sollte man den narkosepflichtigen Eingriff schnell beenden. Am wichtigsten jedoch ist die schnelle und hochdosierte Verabreichung von Dantrolen, einem intrazellulären

Kalziumantagonisten. Dantrolen ist das einzige spezifische Therapeutikum der MH.

Zur symptomatischen Therapie zählen die Stabilisierung des Kreislaufes durch Flüssigkeitssubstitution, der Ausgleich einer metabolischen Azidose mit Natriumbikarbonat, die aktive Abkühlung des Patienten bei erhöhter Körpertemperatur sowie die kontinuierliche Überwachung, um mögliche Komplikationen zu verhindern.

1.6 Diagnostik der MH-Veranlagung

Die Indikation zur MH-Diagnostik besteht nach einem Narkosezwischenfall mit MH-Verdacht, nach Masseterspasmus oder alleiniger Rhabdomyolyse, bei Verdacht auf eine familiäre MH-Veranlagung und bei Patienten mit ungeklärten myopathischen Symptomen, z. B. bei persistierender CK-Erhöhung.

In-vitro-Kontrakturtest

Der von Kalow et al.⁹ entwickelte und von Ellis et al.⁴⁰ modifizierte In-vitro-Kontrakturtest (IVCT, In-vitro contracture test) ist der Goldstandard der MH-Diagnostik.⁴¹ Gemäß dem Protokoll der europäischen MH-Gruppe (European Malignant Hyperthermia Group; EMHG)¹⁰ wird ein Muskelbiopsat dem M. vastus lateralis des Oberschenkels entnommen und der IVCT mit Koffein und Halothan durchgeführt. Dazu wird das Muskelbündel vertikal in einen Kraftaufnehmer gespannt und elektrisch stimuliert. Die über einen Mikromanipulator vorgedehnten Muskelbündel werden mit Koffein bzw. Halothan in ansteigender Konzentration inkubiert. Jeweils zwei entnommene Muskelbündel werden einem statischen Koffeintest mit steigenden Koffeinkonzentrationen unter kontinuierlicher Aufzeichnung des Kontrakturzustandes unterzogen, weitere zwei einem statischen Halothan-Test mit steigenden Halothan-Dosen. Als Koffein- bzw. Halothanschwelle wird die niedrigste Konzentration, die einen anhaltenden Anstieg der

Muskelgrundspannung von mindestens 0,2 g zur Folge hat, bezeichnet. Beträgt die Schwellenkonzentration bei wenigstens einem Halothan-Test maximal 2,0 Vol% und bei einem Koffeintest nicht mehr als 2,0 mmol/l, kann die Diagnose MH-suszeptibel (MHS) gestellt werden. Wird nur unter einer Triggersubstanz der benötigte Schwellenwert nicht überschritten, muss der Test als nicht eindeutig gewertet werden und der Patient wird, je nachdem für welche Substanz der Test positiv ausgefallen ist, als MHE_H (Halothan-positiv, MH-equivocal) oder analog als MHE_C (Koffein-positiv, MH-equivocal) eingestuft. Aus Sicherheitsgründen werden in der Praxis MHE-Patienten als MH-prädisponiert angesehen. Sind die Schwellenwertkonzentrationen für beide Substanzen höher als die genannten Werte, gilt die Diagnose MHN (MH-negativ) als gesichert. Als zusätzliche Testsubstanzen können Ryanodin⁴² oder Chlorocresol⁴³ eingesetzt werden.

Eine 1997 von der EMHG durchgeführte Untersuchung ergab für den IVCT eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 93,6%.⁴⁴

Genetische Diagnostik

Genetische Testverfahren zielen auf den Nachweis von Mutationen im Ryanodinrezeptorgen, mittlerweile sind mehr als 50 Punktmutationen bekannt.^{13;14;45} Eine genetische Analyse beschränkt sich nach Empfehlungen der EMHG auf 17 Mutationen, für die ein kausaler Zusammenhang mit der MH-Auslösung gesichert ist.^{41;46} Allerdings kann man mit diesem Mutationsspektrum nur bei 35-40% der gesicherten MH-Familien einen genetischen Defekt nachweisen. Wird jedoch bei einem Patienten mit gesicherter MH-Disposition eine kausale, MH-assoziierte Mutation nachgewiesen, so kann bei weiteren Familienmitgliedern die MH-Disposition durch den Nachweis der entsprechenden Mutation diagnostiziert und somit auf eine Muskelbiopsie verzichtet werden. Alle Mutationsträger innerhalb dieser Familie müssen als MH-gefährdet eingestuft werden.^{47;48} Wird allerdings bei einem Familienmitglied die entsprechende Mutation nicht nachgewiesen, so ist ein IVCT zur Diagnosesicherung unverzichtbar.^{41;46} Aufgrund der genetischen Heterogenität

ist anzunehmen, dass auch in absehbarer Zeit eine genetische Diagnostik nur für einen Teil der MH-Patienten aussagekräftig sein wird.

Experimentelle Ansätze zur nicht-invasiven MH-Diagnostik

Mit histologischen und histochemischen Verfahren, die bei der Diagnostik anderer Myopathien von Bedeutung sind, konnte man bei MH-Patienten nur unspezifische Veränderungen wie zentralisierte Zellkerne oder atypische Muskelfasertypen-Verteilung nachweisen.⁴⁹ Auch eine CK-Erhöhung als diagnostisches Kriterium einer MH erwies sich als zu unspezifisch, da kaum 50% der MHS-Patienten, aber auch 10% der MHN-Patienten eine CK-Erhöhung aufweisen.⁵⁰ Somit steht mit Ausnahme der nur eingeschränkt einsetzbaren Mutationsanalyse bisher kein einfacheres Verfahren als der IVCT zur Diagnose einer MH-Veranlagung zur Verfügung.

Eine neue Ansatzmöglichkeit ist die Stimulation und Messung der Ca^{2+} -Freisetzung in B-Lymphozyten, welche über den gleichen Ryanodin-Rezeptor wie der Skelettmuskel verfügen.⁵¹ Allerdings ist diese Untersuchung weit von einer standardisierten und einfachen Durchführbarkeit entfernt.

1.7 Mikrodialyse

Das Prinzip der Mikrodialyse (MD) basiert auf dem passiven Transfer von Substanzen entlang eines Konzentrationsgefälles über eine semipermeable Membran. Mit dieser Technik können direkt in vivo die Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit verschiedener Gewebe und Organe untersucht oder Veränderungen in ihrem Verlauf kontinuierlich beobachtet werden. Da die MD-Sonden sehr dünn sind, können sie ohne größeren Zellschaden implantiert werden.⁵² Mit der MD-Technik können nicht nur Substanzen aus dem Extrazellulärraum heraus dialysiert, sondern auch über das Perfusionsmedium Substanzen appliziert werden.⁵² Je nach verwendeter Porengröße der

Membran können Moleküle bis zu einer Masse von 20.000 Da, dem sog. *cut-off*, problemlos passieren.⁵³

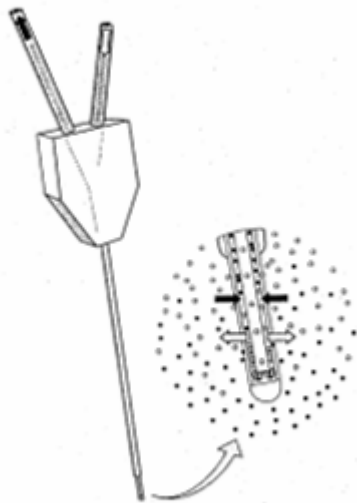


Abb. 1-1. Ungerstedt 1991: S. 367 Die Skizze zeigt das Prinzip der MD: Das Perfusat tritt über den zuführenden Schenkel ein und passiert die innere Kanüle, um bis an die Spitze der Sonde zu gelangen. Dort fließt sie zwischen der inneren Kanüle und der Membran, wo die Diffusion stattfindet, nach oben. Über den abführenden Schenkel verlässt das Perfusat die Sonde.

Den Quotienten aus Konzentration der zu analysierenden Substanz im Dialysat und der Konzentration dieser Substanz im untersuchten Gewebe bezeichnet man als *Recovery*. Unter *relativer Recovery* versteht man hierbei die Konzentration der Substanz im Dialysat prozentual zur Konzentration im untersuchten Medium und unter *absoluter Recovery* die nach einer festen Zeitspanne im Dialysat befindliche absolute Stoffmenge in mol/l.⁵²

Die *Recovery* von Substanzen aus der Extrazellulärflüssigkeit ist abhängig von der Länge der Dialysemembran, der Flussgeschwindigkeit der Perfusionslösung, der Diffusionsgeschwindigkeit der Substanz in der Extrazellulärflüssigkeit und den Eigenschaften der Dialysemembran (*cut-off*).^{52;54}

Um von der Konzentration der zu analysierenden Substanz im Dialysat auf die Konzentration in der Extrazellulärflüssigkeit schließen zu können, sind spezielle Verfahren entwickelt worden.^{53;55-57}

Erwähnt sei die von Larsson entwickelte *internal standard*-Methode.⁵⁵ Dabei geht man davon aus, dass die Diffusion von Substanzen mit ähnlichen chemischen Eigenschaften über die Membran in beiden Richtungen gleich ist. Wenn der Perfusionsflüssigkeit zum Beispiel Koffein oder radioaktiv markiertes Wasser als Referenzsubstanz zugesetzt ist, müssen der prozentuale Verlust der Referenzsubstanz und die prozentuale *Recovery* der zu bestimmenden Substanz aus dem Interstitium kongruent sein.

1.8 CO₂-Partialdruckmessung

Die Messung von Gas-Partialdrücken im feuchten Milieu dient in der Intensivmedizin zur kontinuierlichen Blutgasmessung direkt am Patienten. Hierzu wird eine fiberoptische Messsonde in eine periphere Arterie (A. radialis, A. femoralis) des Patienten eingebracht. Die Sonde enthält verschiedene fiberoptische Fasern, deren Messeinheiten an der Sondenspitze kontinuierlich die Parameter pCO₂, pO₂, pH-Wert und Temperatur messen (Abb. 1-2). Aus diesen gemessenen Parametern errechnet das Messgerät zusätzlich die Parameter Bikarbonat, Basenüberschuss und O₂-Sättigung. Die fiberoptischen Fasern sind von einer Hülle aus Polyethylen mit zahlreichen Mikroperforierungen umgeben.

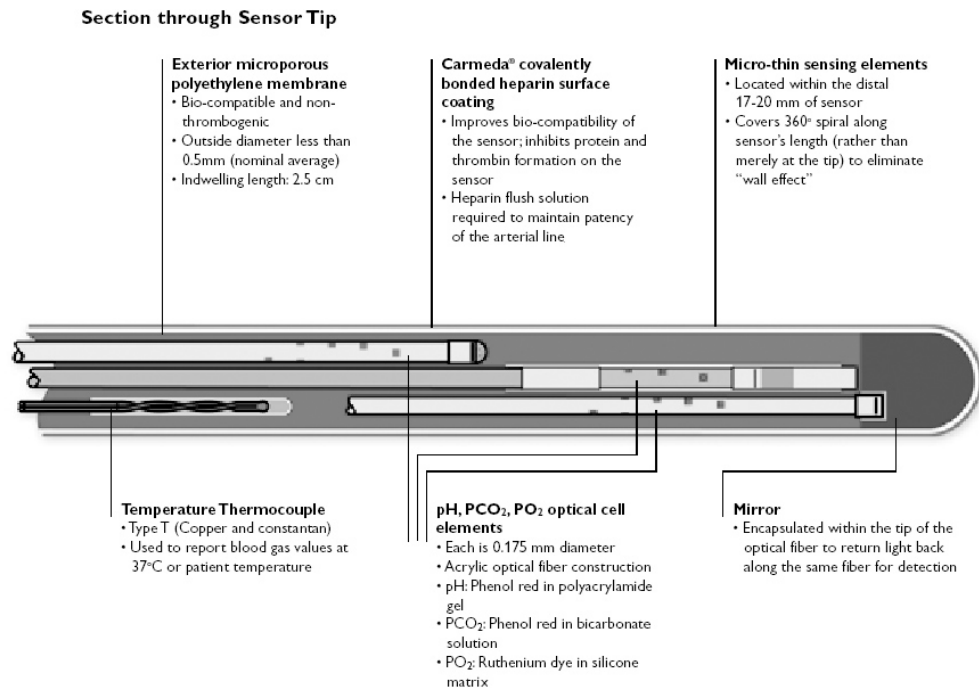


Abb. 1-2. Paratrend Blutgasmessgerät, Phillips Medizinsysteme – Schematischer Aufbau der Partialdrucksondenspitze.¹

Jede fiberoptische Faser enthält an der Sondenspitze verschiedene Laserperforierungen, die je nach Messeinheit mit einem entsprechenden chemischen Indikator gefüllt sind. Der von einer grünen Leuchtdiode ausgehende Lichtstrahl muß diese indikatorgefüllte Bohrung passieren. Die optischen Eigenschaften des Indikators werden durch die zu messende Substanz beeinflusst.

Die CO₂-Messung (Abb. 1-3) funktioniert nach dem optischen Absorptionsprinzip. Als Indikator dient Phenolrot gelöst in Natriumbicarbonatlösung. Die Spitze der fiberoptischen Faser ist mit einer CO₂-durchlässigen hydrophoben Polyethylen-Membran umgeben. Das zu messende CO₂ diffundiert durch diese Membran und setzt Protonen aus dem Bikarbonat frei, was über eine pH-Änderung zu einer Verfärbung der Indikatorsubstanz führt. Die Intensität des Lichtstrahls, der diesen Indikator passiert, wird durch dessen verändertes Absorptionsvermögen abgeschwächt. Das Licht der grünen

¹ Aus Paratrend continuous blood gas monitoring system – Technical overview S. 6

Leuchtdiode wird durch die Indikatorsubstanz teilweise absorbiert. Der verbleibende Lichtstrahl wird an einem Spiegel in der Sondenspitze reflektiert und zu einer Photodiode an der Sondenbasis zurückgeleitet, die die Intensität des zurückgeleiteten Lichtstrahls misst. Dabei passiert der Lichtstrahl noch einmal die Indikatorsubstanz und wird wieder teilweise absorbiert. Zwischen den grünen Lichtimpulsen werden Lichtimpulse einer roten Leuchtdiode durch die Faseroptik geschickt. Das rote Licht wird beim Durchgang durch die Indikatorsubstanz in seiner Intensität nicht verändert und dient als Referenz für Änderungen der optischen Leitfähigkeit, wie sie z. B. bei Verdrehungen der Messsonde auftreten. Das Verhältnis der gemessenen Intensität des grünen Lichtes zu der des roten Lichtes ist von solchen Veränderungen unabhängig und ist ein Maß für die CO_2 -abhängigen Veränderungen in der Lichtabsorption und somit für den CO_2 -Partialdruck an der Sondenspitze. Analog zu diesem Verfahren funktioniert die Messung von pO_2 und pH .

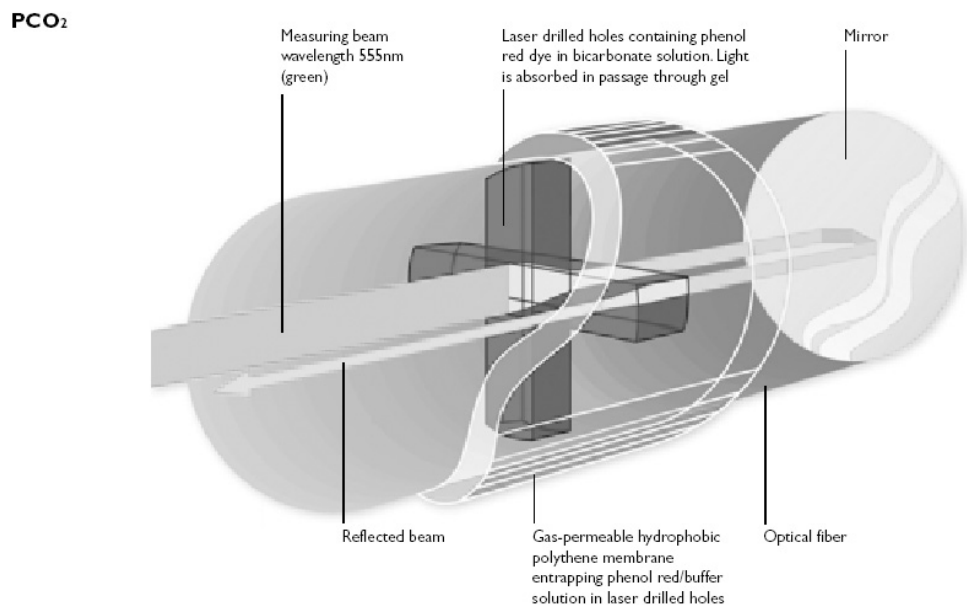


Abb. 1-3. Paratrend Blutgasmessgerät, Phillips Medizinsysteme – Schematische Darstellung der pCO_2 -Messung.²

² Aus Paratrend continuous blood gas monitoring system – Technical overview S. 8

1.9 Fragestellung

Der bisherige Goldstandard der MH-Diagnostik ist der IVCT, ein aufwendiges und invasives Verfahren. Zur Biopsieentnahme muss sich der Patient einer ihn belastenden Operation unterziehen. Neben den entstehenden Schmerzen, der zeitweiligen körperlichen Beeinträchtigung, der zurückbleibenden Narbe am Oberschenkel, den allgemeinen Risiken einer Operation wie Infektion, Blutung, Nervenverletzung und psychischem Stress, ist dieses Verfahren darüber hinaus kostenintensiv und zwischen den einzelnen MH-Laboratorien schwer standardisierbar.⁵⁸

Daraus ergibt sich der dringende Bedarf nach einem nicht- oder minimal-invasiven Testverfahren zur Diagnose einer MH-Veranlagung.

In der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, dass die lokale, intramuskuläre Applikation kleinster Mengen der MH-Triggersubstanzen Halothan und Koffein zu einer lokalen, MH-ähnlichen, hypermetabolen Reaktion führt. Dieser Hypermetabolismus sollte bei MH-Veranlagten signifikant stärker ausfallen als bei gesunden Probanden. Der lokale Hypermetabolismus sollte einhergehen mit einer vermehrten lokalen Produktion der Metabolite CO₂ und Laktat, so dass durch Messung dieser Stoffwechselprodukte mittels CO₂-Partialdruckmessung und Laktat-Mikrodialyse eine Unterscheidung zwischen MH-Veranlagten und Gesunden möglich sein sollte. Des Weiteren wurde angenommen, dass die lokale Injektion der Triggersubstanzen nur zu einer auf den Applikationsort beschränkten Reaktion führt und keine Auswirkungen auf den Gesamtorganismus hat.

In Vorversuchen an Skelettmuskeln von Ratten und MH-veranlagten Schweinen^{59,60} konnte der Versuchsansatz bereits bestätigt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist nun die Anwendung dieses Ansatzes am Menschen zur Entwicklung eines minimal-invasiven Tests zur Diagnose einer MH-Veranlagung.

2 Methodik

2.1 Probanden

Mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität Würzburg und schriftlicher Einverständniserklärung der Probanden wurden 53 Probanden randomisiert untersucht. 46 dieser 53 Probanden, gemäß der Klassifizierung der American Society of Anesthesiologists (ASA) Status I–II, hatten eine persönliche oder familiäre MH-Vorgeschichte. Vor der Untersuchung ist eine Diagnostik zur MH-Veranlagung durch offene Muskelbiopsie gemäß dem Protokoll der europäischen maligne Hyperthermie Gruppe¹⁰ durchgeführt worden. 22 Probanden wurden MHS und 24 Probanden MHN diagnostiziert. Probanden mit Verdacht auf eine neuromuskuläre Erkrankung wurden im Vorfeld aus der Studie ausgeschlossen. Ebenso wurden Probanden mit einem Körpergewicht von mehr als 20% über ihrem Normalgewicht von der Untersuchung ausgeschlossen, da eine sichere Platzierung der Sonden im Muskel nicht gewährleistet werden konnte. Sieben gesunde Probanden ohne persönliche oder familiäre MH-Vorgeschichte und ohne MH-Diagnose dienten als Kontrollgruppe.

2.2 Verwendetes Material

Mikrodialyse

Verwendet wurden flexible Mikrodialysesonden (MAB 7, Microbiotech/se, Stockholm, Schweden) bestehend aus einem zuführenden (*inlet-tubing*) und einem von der Membran wegführenden (*outlet-tubing*) Schenkel, einem 80 mm Schaft und einer 10 mm langen semipermeablen Membran aus

Polyethylensulfon, die durchlässig für Moleküle bis zu einer Größe von 15,000 Da (cut-off) war. Das Totraumvolumen der Sonde beträgt 13,6 µl. In Voruntersuchungen wurde die *in-vitro Recovery* der MD-Membran für Laktat bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 µl/min bei 70–80% gemessen. Die Sonden wurden vor der Untersuchung bei 121 °C dampfsterilisiert.

Die MD-Sonden wurden während der Laktatmessungen am Probanden kontinuierlich mit Ringer-Lösung (Ringer-Infusionslösung, Braun, Melsungen, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 1 µl/min durchspült. Die *outlet-tubings* waren in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) fixiert. Diese Gefäße wurden alle 15 min gewechselt und die gesammelten 15 µl Dialysat zur Messung des Laktatgehaltes benutzt.

Zur Koffeinapplikation und als Verlängerung zwischen Spritzen und MD-Sonden dienten je 30 cm lange Polyethylen-Mikroschläuche (Hartenstein Laborversand, Würzburg, Deutschland). Das Totraumvolumen der Mikroschläuche lag unter 20 µl. Die Mikroschläuche wurden vor der Untersuchung mit Ethylenoxidgas sterilisiert. Als Verbindung zwischen Mikroschlauch, Spritze und MD-Sonde dienten Schlauch-Adapter (CMA, Microdialysis AB, Solna, Schweden).

CO₂ – Partialdruckmessung

Zur CO₂-Partialdruckmessung wurden sterile, fiberoptische Blutgasmesssonden (Paratrend, Philips Medizinsysteme, Böblingen, Deutschland) verwendet. Sie wurden vor ihrem Einsatz kalibriert (TrendCare Calibrator, Philips Medizinsysteme, Böblingen, Deutschland).

Zur Injektion des Koffeins im Rahmen der Partialdruckmessung wurden 90 cm lange G20 Periduralanästhesie-Katheter (Pajunk, Geisingen, Deutschland) mit einem Totraumvolumen von 200 µl verwendet. Das Totraumvolumen des Katheters wurde bei der Koffeininjektion berücksichtigt und zu den Injektionsvolumina hinzuaddiert. Der Katheter wurde jeweils über eine Schleuse (Hämostatisches Ventil, Guidant, Isernhagen, Deutschland) über den Zuspritzkanal der Partialdruckmesssonde steril eingebracht und verlief im

Führungskanal parallel zur Sonde, so dass die Katheterspitze 5 mm proximal der Sondenspitze zu liegen kam.

Injektionslösungen

Die zu injizierende Koffeinelösung wurde von der hauseigenen Klinikapotheke mit einer Konzentration von 80 mM Koffein gelöst in Ringer-Lösung (Ringer-Infusionslösung, Braun, Melsungen, Deutschland) steril filtriert und in Ampullen zu 10 ml abgefüllt .

Zur Applikation von Halothan ins Muskelgewebe wurde Halothan (Fluothane, AstraZeneca, Wedel, Deutschland) 10 Vol% in Sojabohnenöl (Intralipid, Baxter, Heidelberg, Deutschland) gelöst. Die Lösung wurde jeweils 30 min vor der Applikation in einem sterilen, gasdichten Glaskolben unter sterilen Bedingungen gemischt und bis zur Applikation durch Schütteln des Kolbens in Lösung gehalten.

Spritzen und Pumpen

Zum kontinuierlichen Durchspülen der MD-Sonden wurde eine Spritzenpumpe (PHD 2000-Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatures, Holliston, MA, USA) mit vier Spritzenplätzen verwendet. Es wurden 1 ml Spritzen (Pump Syringe, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Das Halothan-Sojabohnenöl-Gemisch wurde mit gasdichten 1 ml Glasspritzen (CMA, Stockholm, Schweden) ebenfalls mit einer Spritzenpumpe (CMA/100, CMA, Stockholm, Schweden) appliziert. Zur Injektion des Koffeins diente eine Spritzenpumpe (Braun, Melsungen, Deutschland) mit 1 ml Spritzen (Omnifix-F, Braun, Melsungen, Deutschland). Zur Konnektion wurden stumpfe 21 G Kanülen (Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet.

2.3 Versuchsprotokoll

Die Untersuchungen der Probanden wurden im anästhesiologischen Aufwachraum des urologischen Operationstraktes des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt, womit eine optimale Probandenüberwachung und die sofortige Verfügbarkeit von Notfallmedikamenten, unter anderem auch Dantrolen, gewährleistet war. Während der gesamten Untersuchungszeit war ein Arzt anwesend.

Die Probanden lagen während der Untersuchung im Bett, wobei das zu untersuchende Bein in einer Beinlagerungsschiene fixiert war. Zur Überwachung wurden während der Untersuchung kontinuierlich der nicht-invasive Blutdruck, die Herzfrequenz und die periphere Sauerstoffsättigung des Probanden gemessen. Der während der Untersuchung entstandene Schmerz wurde mit Hilfe einer visuellen Analogskala (VAS; 0 = kein Schmerzgefühl; 10 = maximales Schmerzgefühl) gemessen. Der aktuelle Wert wurde alle 15 min erfragt. Direkt vor, unmittelbar nach und 24 h nach der Untersuchung wurden Kreatinkinase (CK) und Myoglobin im Serum bestimmt. 60 min nach Applikation der Triggersubstanzen wurde eine venöse Blutgasanalyse zur Bestimmung des systemischen metabolischen Status durchgeführt.

Durch Anspannen der Oberschenkelmuskulatur des linken Beines wurde der M. rectus femoris aufgesucht und die Einstichstellen markiert. Die Haut über dem M. rectus femoris wurde rasiert, desinfiziert und steril mit einem Lochtuch abgedeckt. Die vier markierten Einstichstellen wurden durch Injektion von 200 mg Mepivacain 1% lokal betäubt und mit einer Lanzette angeritzt, um eine narbenbildende Gewebeausstanzung beim Einbringen der Einführkanülen zu verhindern.

Unter sterilen Bedingungen wurden vier handelsübliche Venenverweilkanülen (Insyte G14 (je 2), G16 und G18, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) als Einführkanülen im Abstand von 3 cm zueinander in den Muskel eingebracht (Abb. 2-1).

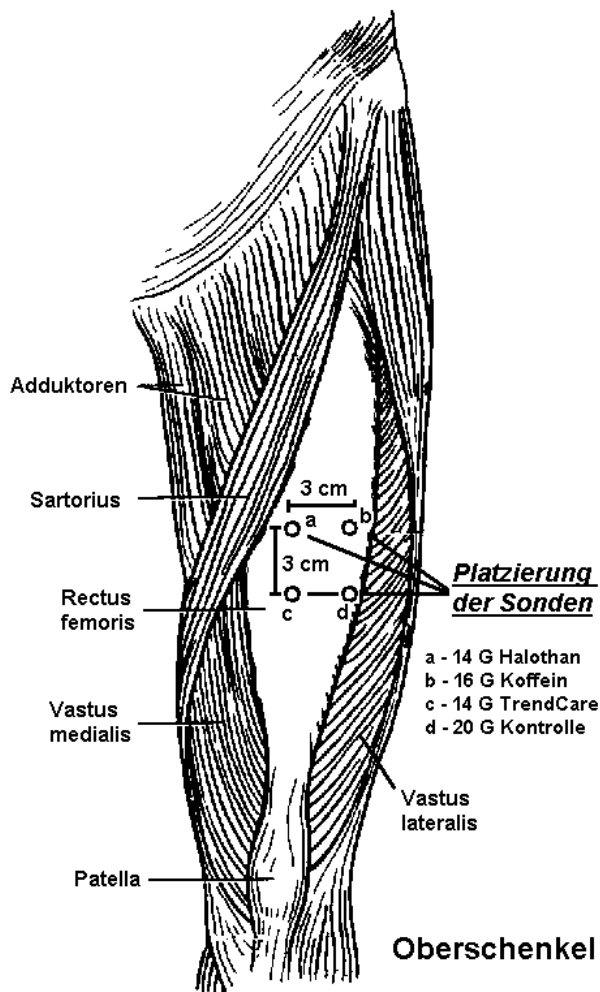


Abb. 2-1. Platzierung der Messsonden im M. rectus femoris des Oberschenkels.

Vor dem Einbringen der MD-Sonden wurden diese langsam mit Ringer-Lösung befüllt, um eine luftblasenfreie Füllung zu gewährleisten.

In die *Koffeinkanüle* wurde eine MD-Sonde mit einem beigefügten Mikroschlauch eingebracht. Dabei war der Schlauch so positioniert, dass die Schlauchspitze 5 mm proximal der Spitze der MD-Sonde zu liegen kam, so dass das applizierte Koffein den gesamten Bereich der Dialysemembran umgab. Um ein Verstopfen des Schlauches an der Schlauchspitze im Muskel zu verhindern, wurden 250 µl Ringer-Lösung direkt nach dem Einbringen

injiziert. Der zuführende Schenkel der MD-Sonde wurde an die Spritzenpumpe angeschlossen und kontinuierlich mit Ringer-Lösung mit 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert.

In die *Halothankanüle* wurden zwei MD-Sonden derart eingebracht, dass die beiden Membranen parallel zueinander positioniert waren. Eine der Sonden wurde an die Spritzenpumpe angeschlossen und kontinuierlich mit Ringer-Lösung mit 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchspült. Im Dialysat dieser Sonde wurde die Laktatkonzentration gemessen. Die andere MD-Sonde diente zur intramuskulären Applikation von Halothan. Dazu wurde diese Sonde für 60 min mit einem Halothan-Sojabohnenöl-Gemisch mit 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert. Ein 30 cm langer Mikroschlauch diente als Verlängerung zwischen Spritzenpumpe und zuführendem Schenkel. Vor dem Start der Halothanapplikation wurde diese MD-Sonde ebenfalls mit Ringer-Lösung mit 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchspült, um ein Verkleben der Membran zu verhindern und eine luftblasenfreie Füllung der Sonde zu gewährleisten.

In die *Kontrollkanüle* wurde eine MD-Sonde eingebracht und kontinuierlich mit Ringer-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchspült. Das gesammelte Dialysat dieser Sonde diente ebenfalls der Laktatmessung.

Nach dem Einbringen der MD-Sonden wurden diese für 15 min mit Ringer-Lösung mit 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchspült, bevor mit der Sammlung der Dialysatproben begonnen wurde.

In die *CO₂-Kanüle* wurde eine sterile, fiberoptische CO₂-Partialdrucksonde zusammen mit einem Zuspritzkatheter eingebracht. Die Sonde wurde unmittelbar vor der Untersuchung in-vitro kalibriert. Der Katheter wurde unter sterilen Bedingungen über eine Schleuse in den Führungskanal der Sonde eingebracht und kam mit seiner Spitze 5 mm proximal der Sondenspitze zu liegen, so dass das applizierte Koffein wieder den gesamten Bereich der Sondenspitze umgab. Nach dem Einbringen dieser Sonde wurden 500 μl Ringer-Lösung über den Katheter injiziert, um die korrekte Lage zu überprüfen. Wenn der Katheter richtig positioniert war, fiel der pCO₂-Wert steil ab und stieg danach wieder auf das Ausgangsniveau (*baseline*) an. Die pCO₂-Werte wurden während des gesamten Versuches in einminütigen Intervallen registriert. Nach

15-minütiger Äquilibrierungsphase begann die Sammlung der Dialysate der Koffein-, Halothan- und Kontrollsonde in jeweils 15 minütigen Intervallen.

Die gesamte Messzeit betrug 165 min, so dass insgesamt 11 Dialysatproben an jeder MD-Sonde gesammelt wurden. Aus den ersten beiden Messintervallen wurden die basalen Laktatkonzentrationen bestimmt. Danach, d.h. 30 min nach Beginn der Untersuchung, wurde die Halothanapplikation über die zweite MD-Sonde der Halothankanüle gestartet.

Ein Messintervall später, d.h. 45 min nach Versuchsbeginn, wurden 250 µl 80 mM Koffein mit 50 µl/min über den Schlauch der Kaffeinkanüle injiziert.

Sobald sich der pCO₂-Ruhewert stabilisiert hatte, d.h. dass der pCO₂-Wert innerhalb von 10 min sich nicht um mehr als 2 mmHg veränderte, wurden 500 µl 80 mM Koffein mit einer Geschwindigkeit von 100 µl/min über den Mikroschlauch der Partialdrucksonde injiziert.

Am Ende des Versuches wurden alle eingebrachten Kanülen, Schläuche und Sonden aus dem Muskel entfernt. Die Einstichstellen wurden mit Pflastern (LeukoStrip, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) versorgt, über dem untersuchten Areal wurde ein steriler Wundverband (Fixomull, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) aufgebracht und der gesamte Oberschenkel mit einer 8 cm breiten, elastischen Binde (bmp-Idealbinde, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) straff gewickelt, um eine mögliche Nachblutung zu verhindern. Die Probanden wurden nur bei weitgehender Schmerzfreiheit und ohne motorische Beeinträchtigung entlassen.

2.4 Modifiziertes Mikrodialyseprotokoll

Die Messzeit der Mikrodialyse-Untersuchung wurde nach der Untersuchung von 12 MHS-, 9 MHN- und 6 Kontrollprobanden von 165 min auf 105 min verkürzt, nachdem sich gezeigt hatte, dass die Ausgangswerte innerhalb des kürzeren Zeitintervalls wieder erreicht werden. Es wurden insgesamt nun 7 Dialysatproben pro MD-Sonde abgenommen. Mit dem verkürzten Mikrodialyse-Versuchsprotokoll wurden 10 MHS-, 15 MHN- und 1 Kontrollproband untersucht. Ab Proband 35 wurden keine Kontrollmessungen über eine

zusätzliche vierte Kanüle mehr durchgeführt, da die Ausgangswerte durch die benachbarte Triggerapplikation nicht verändert worden waren.

2.5 Analyse

Laktatmessung

Zur Bestimmung des Laktatgehaltes im Dialysat wurde ein photospektrometrisches Nachweisverfahren (Spektrophotometer HP 8453-UV-Visible, Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) angewendet.

Die Dialysatproben wurden unmittelbar nach jeder Probandenuntersuchung ausgewertet. Dazu wurden je 10 µl der Dialysatprobe mit 1 ml Laktatreagenz (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 min im Dunkeln inkubiert. Gelöstes Laktatreagenz enthielt 400 U/l Laktatoxidase, 2400 U/l Peroxidase, chromogene Vorstufen und einen Puffer mit einem pH von 7,2. Durch die im Reagenz enthaltene Laktatoxidase wurde die Milchsäure zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Wasserstoffperoxid dient als Kofaktor für die im Reagenz vorhandene Peroxidase, welche die oxidative Kondensierung chromogener Vorstufen katalysiert. Der so gebildete Farbstoff hatte ein Absorptionsmaximum bei 540 nm und der photospektrometrisch messbare Absorptionsanstieg war zur Laktatkonzentration der Probe direkt proportional. Je nach Laktatgehalt kam es zu einem entsprechenden Farbniederschlag, der bis zu einer Laktatkonzentration von 13,32 mmol/l linear verlief.

Vor der ersten Laktatmessung wurde eine Eichkurve für Laktat erstellt. Dazu wurden jeweils 10 µl Laktatstandard (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) der Konzentrationen 4,44 mmol/l, 8,88 mmol/l, sowie 13,32 mmol/l mit 1 ml des Laktatreagenz inkubiert und gegen Laktatreagenz allein als Referenzwert mehrmals gemessen. Aus den erhaltenen Werten wurde nach dem Gesetz von Lambert-Beer eine lineare Eichkurve erstellt.

Alle Proben wurden mit derselben Küvette gemessen, die nach erfolgter Messung jeweils mit *Aqua ad iniectabilia* (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) ausgespült und trocken geklopft wurde. Vor Inkubation der Proben wurde das Reagenz gegen *Aqua ad iniectabilia* als Referenz gemessen und verworfen, falls die Absorption einen Wert von 0,08 überstieg. Zur Qualitätskontrolle wurden bei jeder Auswertung jeweils drei Laktatstandards mitgemessen.

CO₂- Partialdruckmessung

Aus den minütlich erhobenen CO₂-Messwerten wurden der Maximalwert und der Anstieg des CO₂-Partialdruckes über die Zeit nach der Koffeinapplikation ausgewertet. Der Anstieg ergab sich aus der Differenz zwischen CO₂-Ruhewert vor der Koffeininjektion und dem erreichten Maximalwert sowie der Zeit zwischen Koffeininjektion und dem Erreichen des Maximums (Abb. 2-2). Da nicht nur der CO₂-Maximalwert, sondern auch die Zeit in der dieses Maximum erreicht wurde, ein Maß für den ausgelösten Hypermetabolismus ist, sollte die Kombination dieser beiden Messparameter eine deutlichere Trennung zwischen den Probandengruppen ergeben.

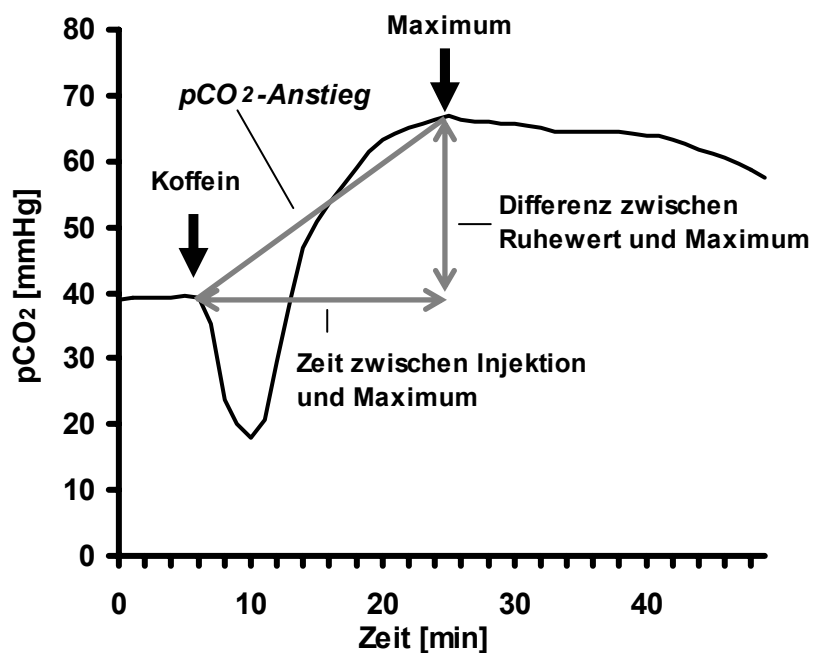


Abb. 2-2 Anstieg des $p\text{CO}_2$ -Partialdruckes am Beispiel der CO_2 -Partialdruckkurve eines MHS-Probanden nach Injektion von $500 \mu\text{l}$ 80 mM Koffein. Der $p\text{CO}_2$ -Anstieg ergibt sich aus dem Quotienten aus der Differenz zwischen CO_2 -Ruhewert vor der Koffeininjektion und dem erreichten Maximalwert sowie der Zeit zwischen Koffeininjektion und dem Erreichen des Maximums.

Fragebogen

Vier bis sechs Wochen nach der Untersuchung wurde allen Probanden ein Fragebogen zugeschickt, um die Akzeptanz und Belastung während und nach der Untersuchung für den Probanden zu evaluieren (Abb. 2-3).

Bitte bewerten Sie die folgenden Fragen auf einer Skala von 0 bis 10, wobei 0 am wenigsten bzw. besten und 10 am stärksten bzw. schlechtesten ist.

(zum Beispiel: Schmerzen nach der Untersuchung

wenig stark)

1. Waren Sie mit dem gesamten Verlauf der Untersuchung zufrieden?

zufrieden unzufrieden

2. Fühlten Sie sich im Vorfeld vor dem Untersuchungstag ausreichend informiert?

gut schlecht

3. Wie empfanden Sie die Betreuung während der Untersuchung?

gut schlecht

4. Hatten Sie Schmerzen

- beim Legen bzw. Entfernen der Kanüle in der Ellenbeuge?

wenig stark

- bei der örtlichen Betäubung?

wenig stark

- beim Einstechen der Messkatheter im Bein?

wenig stark

- nach dem Spritzen der Medikamente im Bein?

wenig stark

- direkt nach Entfernung der Messkatheter im Bein?

wenig stark

- am selben Tag nach Untersuchung?

wenig stark

- am Tag nach Untersuchung?

wenig stark

5. Wie stark fühlten Sie sich **am Tag nach** der Untersuchung noch bei Ihrer täglichen

Beschäftigung beeinträchtigt?

wenig stark

6. Wie verlief die Wundheilung an den Einstichstellen der Nadeln?

a) Rötung?

wenig stark

b) Bluterguss?

wenig stark

7. Wie viele Tage hat Sie die Untersuchung durch Schmerzen etc. beeinträchtigt?

.....Tage

8. Wie würden Sie die Schmerzen während der Untersuchung beschreiben?

keine Schmerzen, spitz, kurz einschließend, krampfartig, stumpf

9. Wie lange hielten die durch das Spritzen der Medikamente erzeugten Schmerzen an?

.....min

10. Nach wie vielen Tagen waren die Einstichstellen verheilt?

.....Tage

11. Wie entscheiden Sie, wenn Sie noch einmal die Wahl hätten zwischen Muskelbiopsie oder diesem neuen Verfahren mittels Messkatheter.

Muskelbiopsie oder neues Verfahren mit Messkatheter

Abb. 2-3. Fragebogen, der jedem Probanden sechs Wochen nach der Untersuchung zur Evaluation von Akzeptanz und Belastung der Untersuchungsmethode zugesandt wurde.

Statistik

Eine Randomisierung der Probandenreihenfolge wurde durch die Abstimmung der Untersuchungstermine durch die Probanden selbst unabhängig von ihrer MH-Diagnose vorgegeben.

Die Normalverteilung der Variablen wurde nach dem Anpassungstest von Kolmogorov-Smirnov überprüft. Die Werte werden als Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert ($M \pm SD$) angegeben.

Die Maximalwerte der Laktatmessung und der CO₂-Messung sowie der Anstieg der CO₂-Konzentration pro Zeiteinheit wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und student-t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Gruppen untersucht.

Die Daten der CK-, Myoglobin- und VAS-Messung waren nicht normalverteilt und werden als Median und Streubreite (Range) angegeben. Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests wurden CK- und Myoglobinwerte auf signifikante Unterschiede vor und nach dem Experiment untersucht.

Die Ergebnisse der Schmerzmessung mittels VAS wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht.

$P \leq 0,05$ wurde dabei als signifikanter Unterschied angenommen.

Die Daten wurden mit den Programmen Microsoft Excel und WinStat ausgewertet.

Es handelt sich um prospektive Versuche, so dass die Ergebnisse übertragbar sind.

3 Ergebnisse

3.1 Biometrische Daten

Die biometrischen Daten der untersuchten Probanden unterschieden sich nicht signifikant zwischen MHS-, MHN- und Kontrollprobanden (Tab. 3-1). Zum Teil kamen mehrere Probanden aus derselben Familie. Blutsverwandtschaft bestand zweimal zwischen je vier Probanden (je 2 MHS und 2 MHN), dreimal zwischen je drei Probanden (je zweimal 3 MHS und einmal 2 MHS und 1 MHN) und dreimal zwischen je zwei Probanden (2 MHN, 2 MHN, 1 MHN und 1 MHS).

Diagnose	Anzahl	Geschlecht [m / w]	Alter [Jahren]	Größe [cm]	Gewicht [kg]
MHS	22	14 / 8	37 ± 11	173 ± 11	74 ± 13
MHN	24	12 / 12	35 ± 10	170 ± 8	71 ± 10
Kontrollprobanden	7	5 / 2	26 ± 4	182 ± 6	77 ± 9

Tab. 3-1. Biometrische Daten der MHS-, MHN- und Kontrollprobanden. M ± SD.

3.2 Laktat-Mikrodialyse

Nach dem Einbringen der MD-Sonden in den Oberschenkel äquilibrierte sich der im Dialysat aller MD-Sonden gemessene Laktatwert innerhalb von 45 min auf $0,95 \pm 0,04$ mM bei MHS-Probanden, auf $0,71 \pm 0,06$ mM bei MHN-Probanden und auf $0,83 \pm 0,14$ mM bei Kontrollprobanden. Nach lokaler intramuskulärer Stimulation mit 250 µl 80 mM Koffein stieg der Laktatwert von $0,93 \pm 0,37$ mM auf $5,53 \pm 3,13$ mM bei MHS-Probanden. Die maximale

Laktatkonzentration unterschied sich signifikant von den Maximalwerten bei MHN-Probanden, die von $0,75 \pm 0,35$ mM auf $1,74 \pm 0,54$ mM und bei Kontrollprobanden von $0,98 \pm 0,51$ mM auf $2,16 \pm 0,60$ mM nach Koffeinstimulation anstiegen (Abb. 3-1., Abb. 3-5).

Die lokale intramuskuläre Applikation von Halothan führte bei MHS-Probanden zu einem Anstieg des Laktatwertes von $1,02 \pm 0,39$ mM auf ein Maximum von $3,77 \pm 1,64$ mM, im Gegensatz zu den signifikant unterschiedlichen Maximalwerten bei MHN- bzw. Kontrollprobanden, die von $0,69 \pm 0,25$ mM auf $1,92 \pm 0,62$ mM bzw. von $0,85 \pm 0,23$ mM auf $1,98 \pm 0,51$ mM anstiegen (Abb. 3-2, Abb. 3-5).

Die Laktatwerte erreichten jeweils 30 bis 45 min nach Beginn der Stimulation mit Koffein oder Halothan ihr Maximum und erholten sich danach wieder innerhalb von 60 min. Die maximalen Laktatwerte reichten bei den MHS-Probanden von $1,29 - 10,71$ mM nach Koffeinstimulation und von $0,95 - 7,52$ mM nach Halothanstimulation. Bei den MHN-Probanden erreichten sie Maxima von $1,07 - 3,14$ mM nach Koffeinstimulation und von $0,61 - 3,49$ mM nach Stimulation mit Halothan. Die Laktatmaximalwerte der Kontrollprobanden reichten von $1,44 - 3,00$ mM nach Stimulation mit Koffein und von $1,22 - 2,73$ mM nach Halothanstimulation (Abb. 3-4). Fünf MHS-Probanden sind weder nach Stimulation mit Koffein noch nach Stimulation mit Halothan mit ihrem Laktatwert gegenüber MHN- oder Kontrollprobanden angestiegen.

Die maximalen Laktatkonzentrationen in den intraindividuellen Kontrollmessungen (Kontrollkanüle im gleichen Muskel) unterschieden sich nicht signifikant zwischen den drei Studiengruppen (MHS-Probanden: $n = 17$; MHN-Probanden: $n = 12$; Kontrollprobanden: $n = 7$) (Abb. 3-3). Die Mittelwerte der maximalen Laktatkonzentrationen erreichten hier $1,60 \pm 0,99$ mM bei MHS-, $1,12 \pm 0,44$ mM bei MHN- und $1,20 \pm 0,51$ mM bei Kontrollprobanden (Abb. 3-5) und lagen somit deutlich unterhalb der maximalen Laktatkonzentrationen nach vorheriger Stimulation mit Koffein und Halothan.

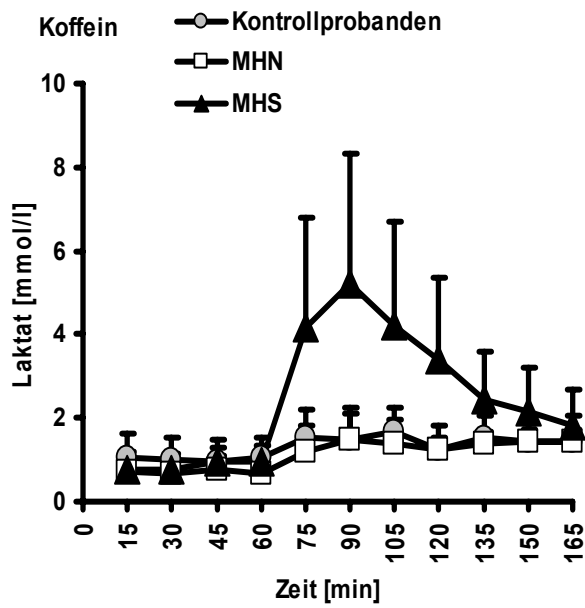


Abb. 3-1.

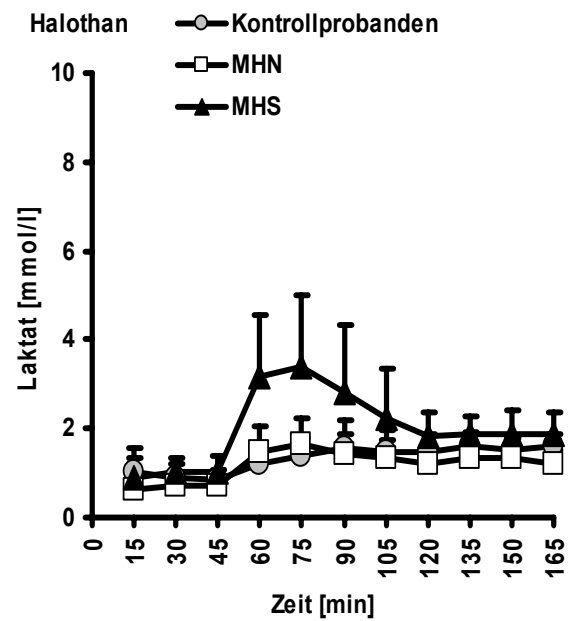


Abb. 3-2.

Mikrodialyse: Messung der intramuskulären Laktatkonzentration an der Koffein- und Halothankanüle nach lokaler Applikation von 250 μ l 80 mM Koffein zum Zeitpunkt 45 min (Abb. 3-1.) und Halothan 10 Vol% in Sojabohnenöl mit einer Geschwindigkeit von 5 μ l für 60 min zum Zeitpunkt 30 min (Abb. 3-2.) in MHS-; MHN- und Kontrollprobanden; M + SD; MHS: n = 22; MHN: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7. Reduzierte Probandenzahl ab Zeitpunkt 105 min entsprechend modifiziertem Versuchsprotokoll.

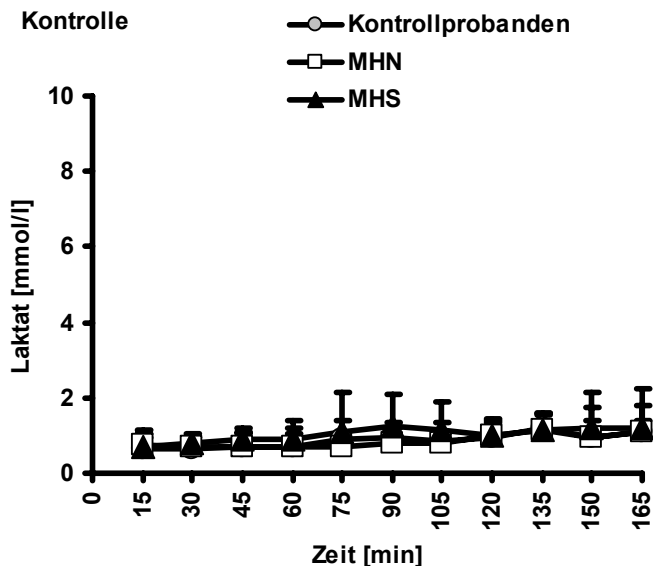


Abb. 3-3. Mikrodialyse: Messung der intramuskulären Laktatkonzentration an der Kontrollkanüle ohne Stimulation; M + SD; MHS: n = 17; MHN: n = 12; Kontrollprobanden: n = 7. Reduzierte Probandenzahl ab Zeitpunkt 105 min entsprechend modifiziertem Versuchsprotokoll.

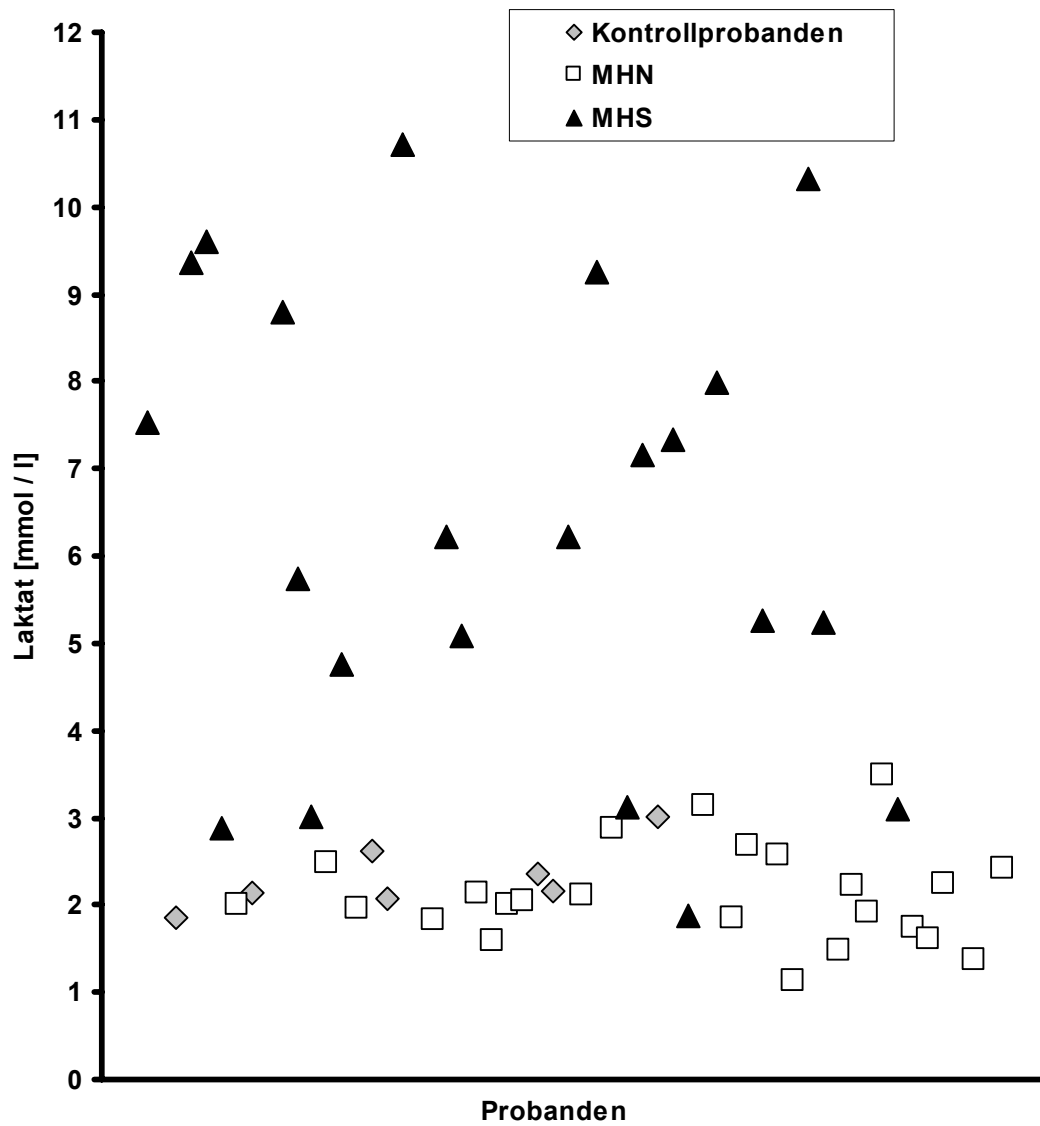


Abb. 3-4. Mikrodialyse: Individueller, maximaler Laktatwert pro Proband nach Halothan- oder Koffeinstimulation bei MHS-, MHN- und Kontrollprobanden; MHS: n = 22; MHS: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7.

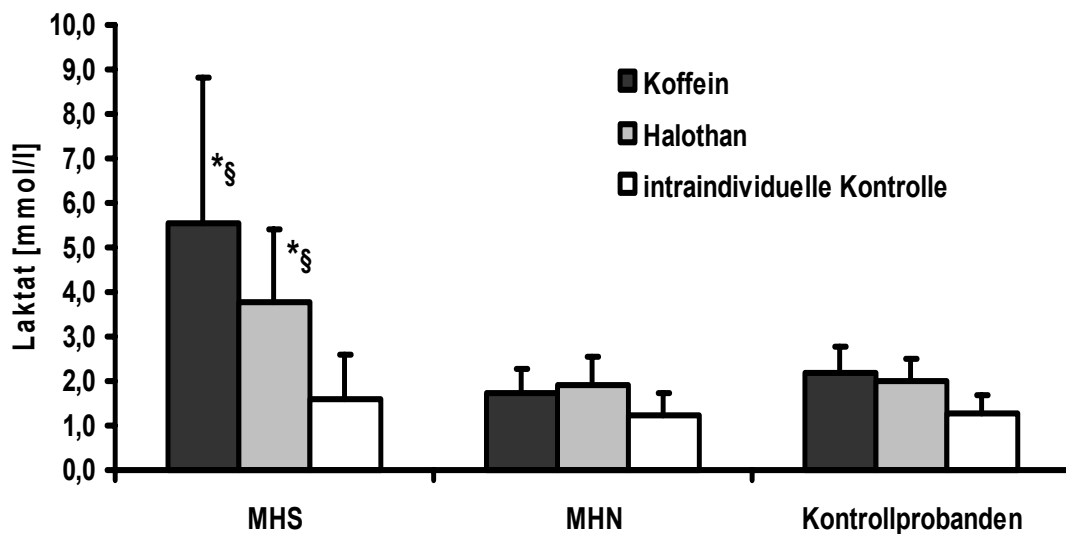


Abb. 3-5. Mikrodialyse: Mittelwert des maximal erreichten Laktatwertes nach Stimulation mit Koffein und Halothan; M + SD; MHS: n = 22; MHN: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7; *: $p < 0,05$ für MHS- vs. MHN-Probanden; §: $p < 0,05$ für MHS- vs. Kontrollprobanden .

3.3 CO₂-Partialdruckmessung

Nach Einbringen der Partialdrucksonde und lokaler Injektion von 500 µl Ringer-Lösung zur Lagekontrolle stabilisiert sich der gemessene pCO₂ auf einen Ruhewert, der bei MHS-Probanden bei $42,8 \pm 4,1$ mmHg, bei MHN-Probanden bei $42,2 \pm 4,2$ mmHg und bei Kontrollprobanden bei $41,9 \pm 3,9$ mmHg lag. Bei keinem Probanden kam es nach Injektion der 500 µl Ringer-Lösung zur Lagekontrolle zu einem Anstieg über den Ruhewert. Nach lokaler Injektion von 500 µl Koffein über den Zuspritzkatheter fiel der CO₂ bei MHS-Probanden auf ein Minimum von $22,4 \pm 6,8$ mmHg und stieg dann auf ein Maximum von $65,4 \pm 15,9$ mmHg, im Vergleich zu einem Minimum von $19,9 \pm 6,5$ mmHg und einem Maximum von $45,4 \pm 4,8$ mmHg bei MHN-Probanden bzw. einem Minimum von $15,1 \pm 5,9$ mmHg und einem Maximum von $44,5 \pm 3,7$ mmHg bei Kontrollprobanden (Abb. 3-6). Damit unterscheiden sich die erreichten lokalen CO₂-Maximalwerte signifikant von den Maximalwerten der MHN- und Kontrollprobanden (Abb. 3-7).

Der pCO₂-Anstieg der MHS-Probanden war mit 79,7 ± 44,7 mmHg/h signifikant höher als der pCO₂-Anstieg der MHN-Probanden mit 8,3 ± 11,8 mmHg/h und der Kontrollprobanden mit 1,9 ± 3,2 mmHg/h (Abb. 3-8).

Bei allen Probanden normalisierte sich der gemessene pCO₂ wieder innerhalb von 60 min nach Injektion.

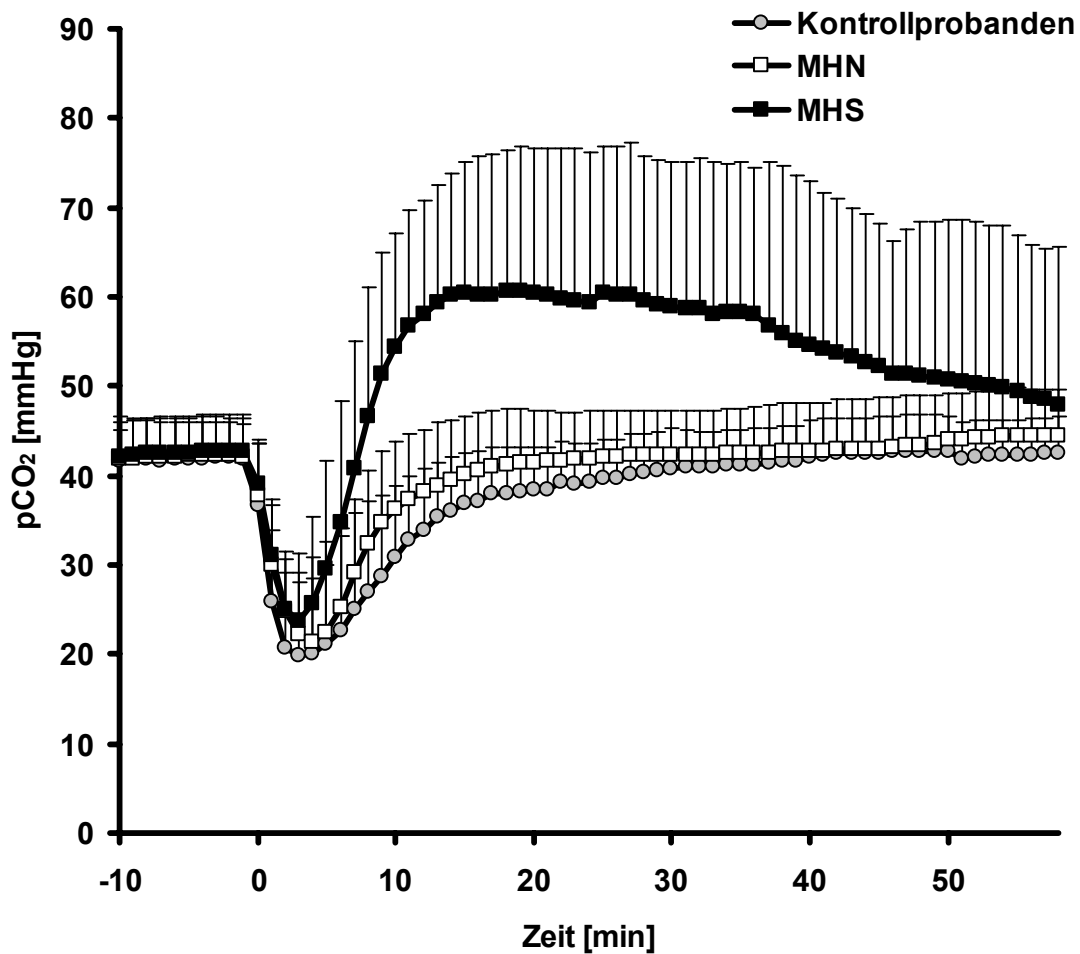


Abb. 3-6. CO₂-Partialdruckmessung: Intramuskulärer pCO₂ vor und nach lokaler Applikation von 500 µl 80 mM Koffein bei MHS-; MHN- und Kontrollprobanden; M + SD; MHS: n = 22; MHN: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7.

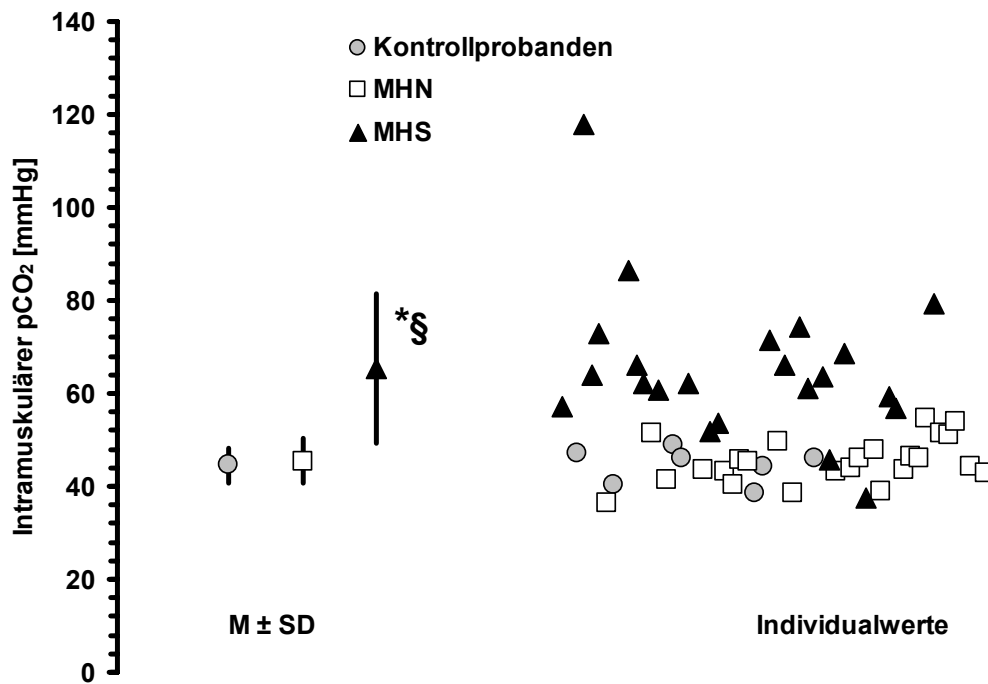


Abb. 3-7. Kohlendioxid-Partialdruckmessung: Intramuskulärer pCO₂-Maximalwert nach lokaler Applikation von 500 µl 80 mM Koffein bei MHS-, MHN- und Kontrollprobanden; M ± SD und Individualwerte; MHS: n = 22; MHN: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7; *: p < 0,05 für MHS- vs. MHN-Probanden; §: p < 0,05 für MHS- vs. Kontrollprobanden.

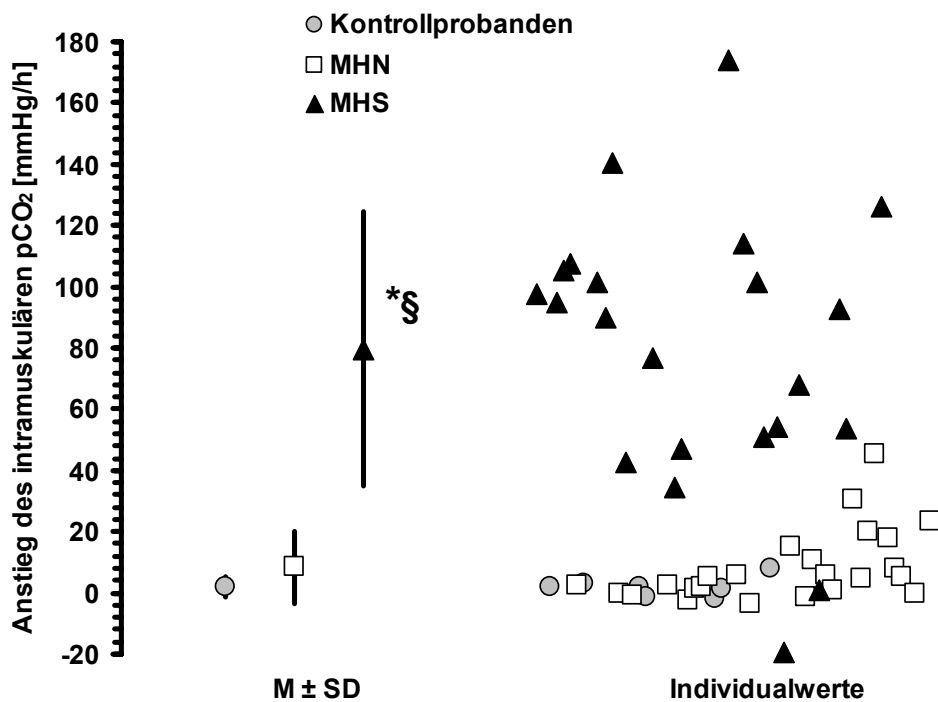


Abb. 3-8. CO₂-Partialdruckmessung: Intramuskulärer pCO₂-Anstieg nach lokaler Applikation von 500 µl 80 mM Koffein bei MHS-, MHN- und Kontrollprobanden; M ± SD und Individualwerte; MHS: n = 22; MHN: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7; *: p < 0,05 für MHS- vs. MHN-Probanden; §: p < 0,05 für MHS- vs. Kontrollprobanden.

3.4 Monitoring

Blutdruck und Herzfrequenz

Der mittlere arterielle Blutdruck (Abb. 3-9) und die Herzfrequenz (Abb. 3-10) unterschieden sich nicht zwischen den drei Studiengruppen während der Untersuchung. Die periphere Sauerstoffsättigung lag bei allen Probanden kontinuierlich zwischen 95 und 100%.

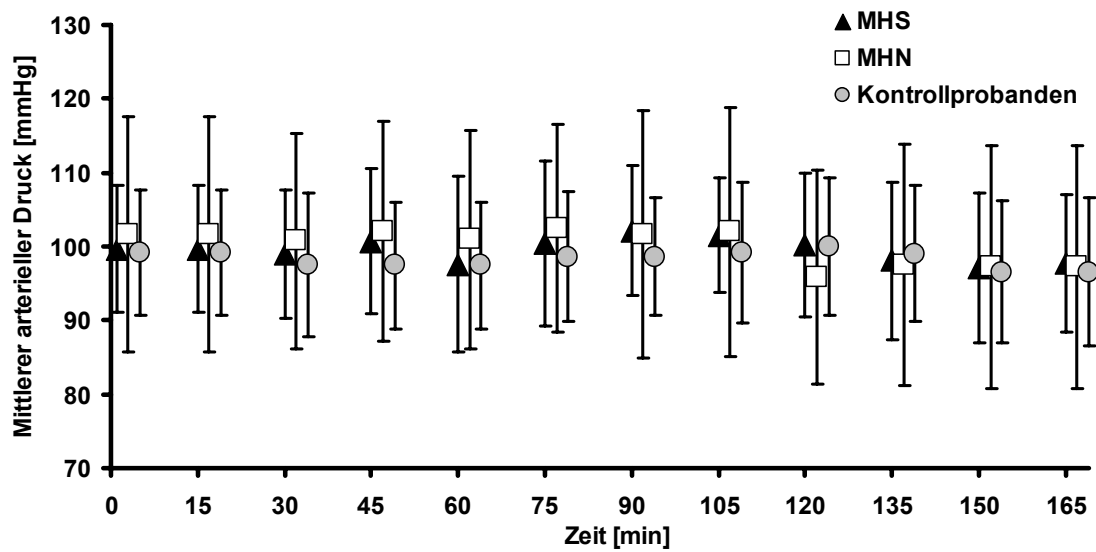


Abb. 3-9. Mittlerer arterieller Blutdruck während der Untersuchung für MHS-; MHN- und Kontrollprobanden. $M \pm SD$; MHS: $n = 22$; MHN: $n = 24$; Kontrollprobanden: $n = 7$. Reduzierte Probandenzahl ab Zeitpunkt 105 min entsprechend modifiziertem Versuchsprotokoll.

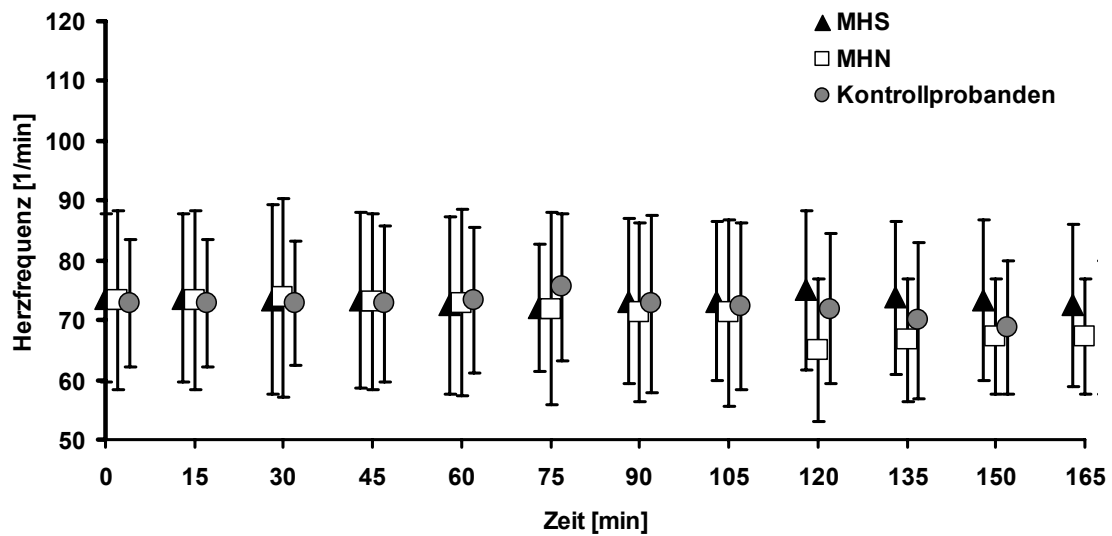


Abb. 3-10. Herzfrequenz während der Untersuchung für MHS-, MHN- und Kontrollprobanden. $M \pm SD$; MHS: $n = 22$; MHN: $n = 24$; Kontrollprobanden: $n = 7$. Reduzierte Probandenzahl ab Zeitpunkt 105 min entsprechend modifiziertem Versuchsprotokoll.

Venöse Blutgasanalyse

Die peripher venöse Blutgasuntersuchung ergab, dass pH, pCO₂ und Basendefizit bei jedem Probanden 60 min nach Applikation von Koffein und Halothan im Normbereich waren (Tab. 3-2). Es gab zu keiner Zeit während oder nach der Untersuchung Zeichen einer systemischen Stoffwechselsteigerung.

Diagnose	pH	pCO ₂ [mmHg]	Basenabweichung
MHS	7.41 ± 0,03	41,09 ± 4,13	1,34 ± 2,01
MHN	7,40 ± 0,02	42,15 ± 4,33	1,00 ± 2,13
Kontrollprobanden	7,38 ± 0,02	44,47 ± 3,66	1,34 ± 1,04

Tab. 3-2. Die metabolischen Parameter venöser pH, pCO₂ und Basenabweichung in MHS-, MHN- und Kontrollprobanden 60 min nach lokaler intramuskulärer Applikation von Koffein und Halothan. M ± SD; MHS = 22; MHN = 24; Kontrollprobanden = 7.

Kreatinkinase und Myoglobin

Die vor, direkt nach und 24 h nach der Untersuchung durchgeführte Blutuntersuchung ergab, dass nur in der Gruppe der MHS-Probanden die CK mit 86 U/l vor und mit 78 U/l direkt nach der Untersuchung signifikant gegenüber MHN- und Kontrollprobanden erhöht war und 24 h nach dem Experiment den höchsten Wert mit 207 U/l annahm (Median). Der höchste gemessene CK-Wert lag bei einem MHS-Probanden vor der Untersuchung bei 987 U/l, direkt nach der Untersuchung bei 877 U/l und 24 h danach bei 832 U/l. Myoglobin war bei den MHS-Probanden nur direkt nach der Untersuchung mit 76 µg/l signifikant gegenüber MHN- oder Kontrollprobanden erhöht. Die höchsten gemessenen Einzelwerte für Myoglobin bei MHS-Probanden waren vor der Untersuchung 160 µg/l, direkt nach der Untersuchung 131 µg/l und 24 h danach 1139 µg/l.

Diagnose	CK prä	CK post	CK 24 h post	Myoglobin prä	Myoglobin post	Myoglobin 24 h post
MHS Range	87*§ 24 - 987	78*§ 19 - 877	207*§ 70 - 832	48 21 - 160	76* 31 - 131	53 26 - 1139
MHN Range	42 14 - 105	40 14 - 76	64 29 - 158	42 24 - 86	41 24 - 80	38 22 - 64
Kontrollprobanden Range	40 26 - 73	33 26 - 61	37 28 - 83	30 24 - 41	30 23 - 44	33 26 - 47

Tab. 3-3. Kreatinkinase [U/l] und Myoglobin [$\mu\text{g/l}$] in MHS-, MHN- und Kontrollprobanden vor, nach und 24 h nach lokaler intramuskulärer Applikation von Koffein und Halothan. CK: Kreatinkinase vor (prä), direkt nach (post) und 24 h nach (24 h post) dem Experiment. Median und Range; MHS: n = 22; MHN: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7; *: p < 0,05 für MHS- vs. MHN-Probanden; §: p < 0,05 für MHS- vs. Kontrollprobanden. Normwerte (bei 25 Grad) für CK < 80 U/l (Männer) und < 70 U/l (Frauen) und für Myoglobin = 28 - 72 $\mu\text{g/l}$ (Männer) und 25 - 58 $\mu\text{g/l}$ (Frauen).

Schmerzen

Die Schmerzen beim Platzieren der Einführkatheter wurden anhand der VAS von MHS-Probanden mit 2,8 (0-8) (Median / Spannweite), MHN-Probanden mit 2,0 (0-8) und Kontrollprobanden mit 4,0 (2-6) ähnlich empfunden. Die Applikation der Triggersubstanzen führte bei MHS-Probanden zu einem signifikant stärkeren Schmerzgefühl mit einem Maximum von 5,3 (0-9) im Vergleich zu MHN-Probanden mit 0,0 (0-7) und Kontrollprobanden mit 1,0 (0-3). MHS-Probanden gaben direkt nach Applikation der Triggersubstanzen ein zunehmendes Schmerzgefühl an, das sein Maximum nach 30 min erreichte und sich danach innerhalb von 60 min wieder normalisierte (Abb. 3-11). Die Schmerzen wurden als lokales, krampfartiges Gefühl beschrieben. Alle Patienten wurden schmerzfrei und ohne wesentliche motorische Beeinträchtigung entlassen.

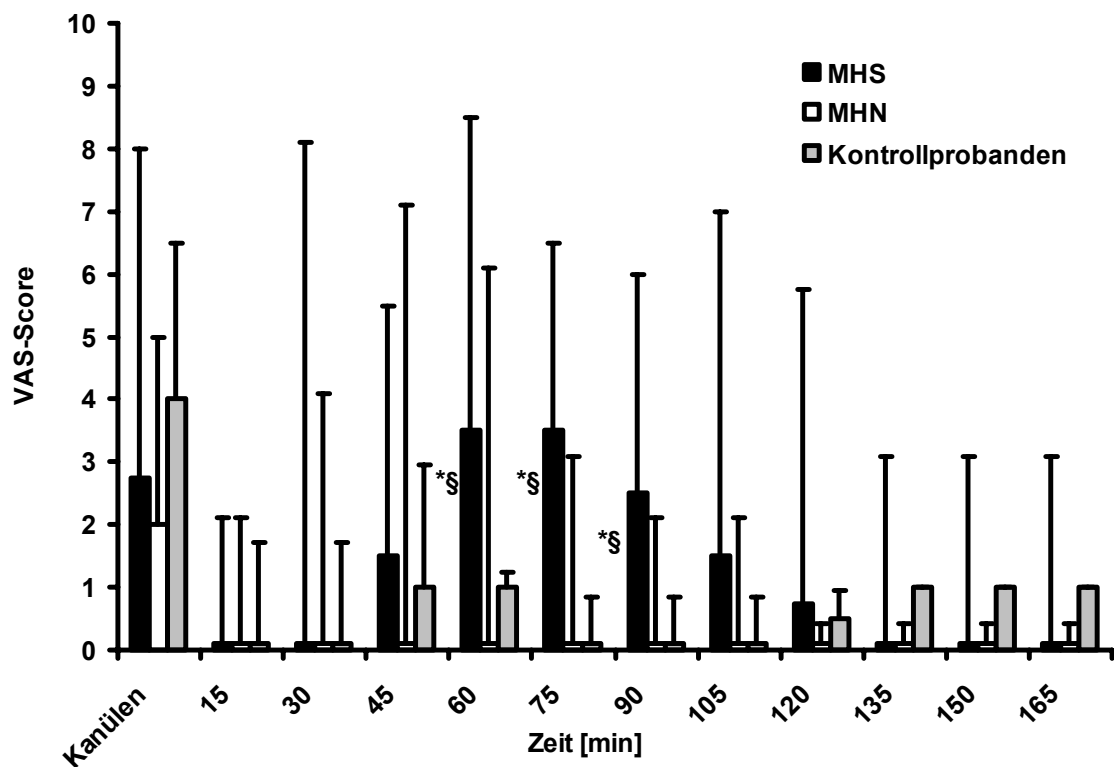


Abb. 3-11. Schmerzen beim Platzieren der Einführkanülen (Kanülen) und während der Injektion der Triggersubstanzen (30. – 90. min) bei MHS-, MHN- und Kontrollprobanden; Median + Max; MHS: n = 22; MHN: n = 24; Kontrollprobanden: n = 7; *: p < 0,05 für MHS- vs. MHN-Probanden; §: p < 0,05 für MHS- vs. Kontrollprobanden. Reduzierte Probandenzahl ab Zeitpunkt 105 min entsprechend modifiziertem Versuchsprotokoll.

3.5 Fragebogen

Von den 53 versendeten Fragebögen haben 22 MHS-, 17 MHN- und 7 Kontrollprobanden den ausgefüllten Bogen zurückgeschickt. Nur bei den Schmerzen direkt nach Applikation der Triggersubstanzen und in der Dauer der Schmerzen nach Applikation der Triggersubstanzen unterschieden sich die Ergebnisse der MHS-Probanden von den Werten der MHN- oder Kontrollprobanden. Die MHS-Probanden gaben hier ein stärkeres und länger anhaltendes Schmerzgefühl an (Tab. 3-1). Die Frage 8 nach der Qualität der Schmerzen wurde wegen sehr individueller Nennungen nicht gewertet. Die meisten Probanden beschrieben die Schmerzen als krampfartiges, teils stumpfes, einschliessendes Gefühl im Bereich der Messsonden, das sich

innerhalb von 20 bis 30 min über ein grösseres Areal auf dem Oberschenkel ausbreitete und dabei in seiner Intensität abnahm.

Frage	MHS	MHN	Kontrollprobanden
1. Waren Sie mit dem gesamten Verlauf der Untersuchung zufrieden?	1,7 ± 0,9	1,4 ± 0,6	1,7 ± 1,1
2. Fühlten Sie sich im Vorfeld vor dem Untersuchungstag ausreichend informiert?	2,4 ± 1,8	1,9 ± 2,2	1,6 ± 0,8
3. Wie empfanden Sie die Betreuung während der Untersuchung?	1,3 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,5
4. Hatten Sie Schmerzen			
- beim Legen bzw. Entfernen der Kanüle in der Ellenbeuge?	1,3 ± 1,2	1,5 ± 0,8	1,9 ± 1,1
- bei der örtlichen Betäubung?	2,3 ± 0,9	2,0 ± 1,3	2,4 ± 1,5
- beim Einstechen der Messkatheter im Bein?	3,3 ± 2,1	3,1 ± 2,3	4,3 ± 1,6
- nach dem Spritzen der Medikamente im Bein?	4,9 ± 2,7	1,9 ± 1,3	2,6 ± 3,3
- direkt nach Entfernung der Messkatheter im Bein?	2,6 ± 1,6	1,8 ± 0,7	1,9 ± 0,9
- am selben Tag nach der Untersuchung?	2,2 ± 1,3	2,2 ± 1,4	1,7 ± 0,8
- am Tag nach der Untersuchung?	1,4 ± 1,1	1,6 ± 0,7	1,7 ± 0,8
5. Wie stark fühlten Sie sich am Tag nach der Untersuchung noch bei Ihrer täglichen Beschäftigung beeinträchtigt?	1,9 ± 1,9	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,8
6. Wie verlief die Wundheilung an den Einstichstellen der Nadeln?			
a) Rötung?	2,0 ± 1,6	1,7 ± 0,9	1,7 ± 1,0
b) Bluterguss?	2,6 ± 2,5	2,4 ± 2,2	1,7 ± 1,0
7. Wie viele Tage hat Sie die Untersuchung durch Schmerzen etc. beeinträchtigt? [d]	1,0 ± 1,7	1,0 ± 1,3	1,5 ± 2,5
9. Wie lange hielten die durch das Spritzen der Medikamente erzeugten Schmerzen an? [min]	21 ± 38	8 ± 30	3 ± 7
10. Nach wie vielen Tagen waren die Einstichstellen verheilt? [d]	7,5 ± 3,9	5,5 ± 2,9	6,3 ± 3,3

Tab. 3-4. Ergebnisse des Fragebogens, der jedem Probanden 6 Wochen nach der Untersuchung zugeschickt wurde für MHS-; MHN- und Kontrollprobanden; M ± SD; soweit nicht anders angegeben, Bewertung zwischen 1 bis 10 möglich; 1 entspricht sehr gut und 10 sehr schlecht; MHS: n = 22; MHN: n = 17; Kontrollprobanden: n = 7.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, (a) dass sich die basalen Laktat- und pCO₂-Werte bei MH-Veranlagten und gesunden Probanden in Ruhe nicht unterscheiden, (b) dass die hier verwendeten lokal applizierten Mengen an Halothan und Koffein zu keinen klinisch relevanten lokalen oder systemischen Nebenwirkungen führen, und dass (c) die minimal-invasive Messung von Laktatkonzentration und Kohlendioxidpartialdruck vor und nach lokaler Stimulation mit Halothan oder Koffein eine Unterscheidung zwischen MH-veranlagten und MH-nicht-veranlagten Individuen ermöglicht.

4.1 Nebenwirkungen des Testverfahrens

Ein wesentlicher Gesichtspunkt dieser Studie waren mögliche systemische und lokale Nebenwirkungen der durchgeführten Untersuchung. Voruntersuchungen an MH-veranlagten Schweinen zeigten keine klinisch relevanten Nebenwirkungen nach lokaler, intramuskulärer Halothan- und Koffeinapplikation unter ähnlicher Dosis.^{59;60} Obwohl die Wahrscheinlichkeit, dass die lokal applizierten Triggersubstanzen eine systemische maligne Hyperthermie auslösen, sehr gering war, blieb ein Restrisiko, dass die lokal ausgelöste Stoffwechselsteigerung zu einem schweren Muskelschaden oder gar zu einem Kompartmentsyndrom führen könnte.⁶¹

Um mögliche Muskelschäden zu erkennen, wurde im untersuchten Muskel in einem Abstand von 3 cm von den Halothan- und Koffeinmesssonden, eine Kontrollmessung der Laktatkonzentration ohne Stimulation mit MH-Triggersubstanzen durchgeführt. Der fehlende Laktatanstieg bei dieser Kontrollmessung lässt erkennen, dass das von der Koffein- und Halothanapplikation betroffene Muskelvolumen sehr gering ist. Nur bei einem MHS-Probanden kam es nach Triggerapplikation zu einem Laktatanstieg auf 4,83 mM in der Kontrollmessung, wobei wir annehmen, dass die Messsonde näher als 3 cm von den anderen Sonden entfernt lag. Auch konnte beobachtet

werden, dass bei der CO₂-Partialdruckmessung die pCO₂-Werte nach Triggerapplikation wieder steil abfielen, nachdem die Partialdrucksonde um 1 cm zurückgezogen wurde (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Messungen von Herzfrequenz, Blutdruck und Sauerstoffsättigung als Indikatoren systemischer hämodynamischer Nebenwirkungen, sowie auch die Blutgasmessung als Indikator systemischer metabolischer Nebenwirkungen veränderten sich nach Applikation der Triggersubstanzen weder bei MHS-, noch bei MHN- oder Kontrollprobanden

Die CK- und Myoglobinbestimmung vor, unmittelbar nach und 24 h nach der Untersuchung weist auf einen lokal begrenzten Muskelschaden hin. Myoglobin erreicht bei einer Skelettmuskelschädigung typischerweise das Maximum nach 4–8 Stunden, während der maximale CK-Anstieg erst nach 18–36 Stunden gemessen wird. Nur bei den MHS-Probanden kam es 24 h nach der Untersuchung zu einem CK-Anstieg, wie er auch im Rahmen schwerer körperlicher Aktivität oder nach chirurgischen Eingriffen beschrieben wurde.⁶²

24 h nach der Untersuchung wurde der höchste CK-Wert von 832 U/l bei einem MHS-Probanden gemessen, bei dem bereits die CK-Bestimmung direkt vor der Untersuchung einen Ausgangswert von 987 U/l ergeben hatte, ohne dass klinische Zeichen einer Myopathie vorgelegen haben. Als weiteres Zeichen eines lokalen Muskelschadens ergab die Myoglobinmessung nur in der Gruppe der MHS-Probanden einen Anstieg unmittelbar nach der Untersuchung, der nach 24 h wieder rückläufig war. Der höchste gemessene Wert lag hier bei 1139 µg/l 24 h nach der Untersuchung.

Nur MHS-Probanden klagten nach Applikation der Triggersubstanzen über ein krampfartiges, schmerzhaftes Gefühl im Bereich der eingebrachten Messsonden. Das Schmerzgefühl breitete sich innerhalb von 30 min über den Muskel aus und verschwand danach wieder. Die Palpation des Oberschenkels zum Zeitpunkt des Schmerzgefühls erbrachte jedoch keinen Hinweis auf einen Crampus, die Muskeln erschienen regelrecht weich. Bei allen MHS-Probanden verschwand das Schmerzgefühl vor Abschluss der Untersuchung, so dass alle Probanden schmerzfrei entlassen werden konnten. Eine lokale Kontraktur als

Zeichen einer MH-ähnlichen Reaktion im Gebiet der applizierten Triggersubstanzen kann als Ursache der Schmerzen angenommen werden.

Koffein ist in den USA zur intramuskulären Applikation für die Behandlung arterieller Hypotonien in 10-fach höherer Dosierung zugelassen als es in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Andererseits löst Koffein in einer Konzentration von mehr als 32 mM eine maximale Skelettmuskelkontraktur *in vitro* aus.⁶³ In der vorliegenden Studie wurde 80 mM Koffein verwendet, wobei man allerdings annehmen muss, dass die Koffeinkonzentration nach Applikation in den Muskel durch Verdünnung mit interstitieller Flüssigkeit signifikant abnimmt. Die genaue Konzentration im Muskel ist daher unbekannt. Der Laktat- und Kohlendioxidabfall auf physiologische Werte nach dem initialen steilen Anstieg als Folge der Koffeinapplikation spiegelt den Abbau bzw. die systemische Verteilung des Koffeins wider.

Intravenös appliziertes Halothan verursacht eine schwere zelluläre Schädigung.⁶⁴ Bindet man Halothan an eine fettlösliche Trägersubstanz, so kommt es zu keiner zellulären Schädigung. Diese Modifikation in der Applikation von Halothan ermöglicht sogar eine intravenöse Anästhesie bei Schweinen⁶⁵, deren Charakteristika mit denen einer Halothan-Inhalationsnarkose vergleichbar sind. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir Sojabohnenöl als fettlösliche Trägersubstanz für Halothan. In Analogie zum kapillaren Gefäßsystem applizierten wir das Halothan-Sojabohnenölgemisch über eine in den Muskel eingebrachte MD-Sonde, so dass nur Halothan durch die MD-Membran in den Muskel diffundieren konnte. Allerdings bleibt die damit erreichte Halothankonzentration im Muskel unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit bleibt die Sicherheitsgrenze der Konzentration für die intramuskuläre Applikation der MH-Triggersubstanzen unklar. Die Messungen systemischer metabolischer (Blutgasanalyse) und hämodynamischer Parameter (Herzfrequenz, Blutdruck, Sauerstoffsättigung) ergaben keine Anzeichen einer systemischen Beteiligung. Es wurde keine klinisch relevante Muskelschädigung mittels CK und Myoglobin im Serum gemessen und alle Patienten waren unmittelbar nach der Untersuchung schmerzfrei und motorisch unwesentlich eingeschränkt. Daher ist trotz Unkenntnis der genauen Sicherheitsgrenze der

MH-Triggerkonzentration anzunehmen, dass die lokal applizierten Triggersubstanzen in der verwendeten Dosierung nur eine auf ein sehr kleines Muskelvolumen beschränkte Stoffwechselreaktion auslösen.

4.2 Dosisabhängigkeit der MH

Bei MH-veranlagten Patienten unterscheiden sich die klinischen Symptome und Zeichen einer MH erheblich, so dass eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Triggersubstanz und Ausprägung einer MH angenommen werden kann.^{66,67} Bei manchen Patienten löst der Kontakt mit MH-Triggersubstanzen eine fulminante oder abortive MH-Krise aus, bei anderen dagegen nur einen Masseterspasmus oder eine Rhabdomyolyse. Wieder andere Patienten hatten bereits mehrfach Narkosen mit Triggersubstanzen, ohne dass sie klinische Symptome einer MH entwickelten. Die Schwellendosis ist inter- und intraindividuell unterschiedlich. Ebenso verschieden sind die Kontrakturantworten im IVCT bei MH-Veranlagten. Auch Tierversuche bestätigen eine Dosisabhängigkeit der MH. Im „Barnyard Test“ wurde bei Schweinen eine Muskelrigidität durch Inhalation von Halothan ausgelöst und damit eine MH-Veranlagung diagnostiziert. Nach Wegnahme der Halothanmaske erholten sich die Schweine wieder schnell.⁶⁸

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die intramuskuläre Injektion von kleinen, empirisch im Tierversuch festgelegten Dosen von Halothan und Koffein, bei MH-Veranlagten eine lokale, intramuskuläre hypermetabole Reaktion ausgelöst werden. Ihre Form und Ausprägung erklärt sich aus den pathophysiologischen Veränderungen, die im Rahmen einer MH vorliegen. Die steilen Anstiege von Laktat und CO₂-Partialdruck entsprechen der lokal ausgelösten Stoffwechselsteigerung. Das lokale, krampfartige Schmerzgefühl spiegelt dabei die unphysiologische Aktivierung der Aktin-Myosin-Filamente im Muskel wider. In einem Fall konnten wir beobachten, dass Halothan sogar bei MH-Nichtveranlagten in höherer Dosierung zu einem Laktat- und CO₂-Anstieg führt. Die akzidentelle intramuskuläre Applikation von 300 µl Halothangemisch als Bolus löste bei einem Kontrollprobanden einen CO₂-Anstieg aus, wie man

ihn bei einem MH-Veranlagten erwartet hätte (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Proband verspürte bei dieser hochkonzentrierten Halothanapplikation ein kurzzeitiges, krampfartiges Schmerzgefühl am Applikationsort, wie es bei den in dieser Studie verwendeten Halothan-Dosierungen nur von MHS-Probanden beschrieben wurde.

4.3 Individuelle Datenauswertung

Um eine sichere Diagnose bezüglich der MH-Veranlagung eines Patienten stellen zu können, ist die Auswertung der individuellen Daten aller drei Testergebnisse notwendig. Dafür müssen für die Laktatmessung und die Partialdruckmessung Schwellenwerte definiert werden, die eine Unterscheidung zwischen MHS und MHN ermöglichen. Für die Laktatmessung ergibt sich nach Auswertung aller Daten ein empirischer Schwellenwert von 3,15 mmol/l, d.h. ergibt die Laktatmessung nach Koffein- oder Halothanstimulation einen Laktatwert über 3,15 mmol/l, so wird der Proband nach der vorliegenden Studie als MH-veranlagt klassifiziert. Für die Partialdruckmessung kann der Schwellenwert bei einer Anstiegssteilheit von 32 mmHg/h festgelegt werden. Eine Anstiegsteilheit über 32 mmHg/h weist demnach eine MH-Veranlagung nach.

Liegt der Messwert in nur einem der drei Messverfahren über dem definierten Schwellenwert, ist der Proband als MH-veranlagt zu diagnostizieren.

Die intramuskuläre Applikation der MH-Triggersubstanzen Koffein und Halothan induzierte bei MHS-Probanden mit *einer* Ausnahme wenigstens bei einer der drei Messungen einen Laktat- oder pCO₂-Anstieg. Einzelne Triggerapplikationen bei MHS-Probanden führten allerdings zu keinem Anstieg. Bei dem genannten MHS-Probanden konnte in keiner der drei Messungen ein Anstieg nachgewiesen werden. Dieser Proband wurde somit im Vergleich zum IVCT falsch negativ diagnostiziert.

Folgende methodische Gründe könnten für ein falsch negatives Untersuchungsergebnis verantwortlich sein:

(a) Die Triggersubstanz wurde nicht ins Muskelvolumen appliziert, in dem Laktat oder der CO₂-Partialdruck gemessen wurde, z. B. wenn die MD- oder die Partialdrucksonde senkrecht zum Muskelfaserverlauf platziert ist und die Triggersubstanz sich in kranio-kaudaler Richtung entlang der Muskelfasern ausbreitet. Die kernspintomographische Aufnahme in Abb. 4-1 verdeutlicht, dass sich das applizierte Kontrastmittel entlang der Muskelfasern ausbreitet.

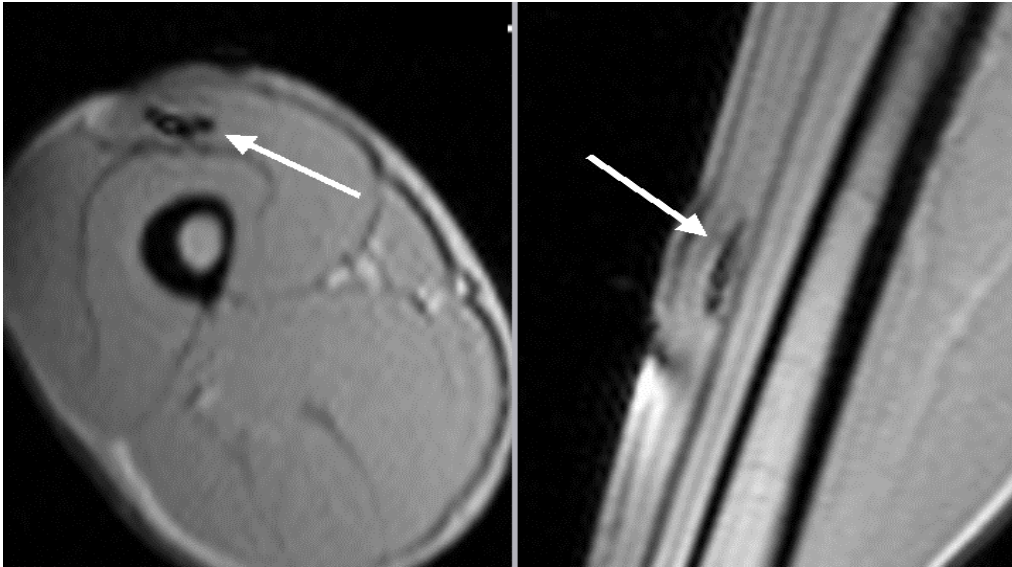


Abb. 4-1. Verteilung von Kontrastmittel (2 ml Gadolinium) im M. rectus femoris des Oberschenkels. Axiale und sagittale MRT-Aufnahme bei einem gesunden Probanden.

Ein zu hoher Injektionsdruck bei der Applikation der Triggersubstanzen kann zu einer Ausbreitung des Triggers in von der Messsonde entfernte Muskelareale führen. Um diese Gefahr zu minimieren, wurden die Triggersubstanzen in der vorliegenden Untersuchung über einen Zeitraum von 5 min per Spritzenpumpe appliziert, um so einen bei allen Probanden konstanten, relativ niedrigen Druck zu gewährleisten.

(b) Die applizierte Triggerkonzentration im Muskel variiert in Abhängigkeit vom interstitiellen Wasser- und Fettgehalt des Probanden;

(c) die Triggersubstanz selbst induziert nicht regelmäßig eine hypermetabole Reaktion, wie auch bei MH-Veranlagten eine Triggersubstanz nicht immer eine MH auslöst.

(d) Die optimale Dosierung und Konzentration der zu applizierenden Triggersubstanzen beim Menschen ist bisher nicht bekannt. Die Dosierungen in

der vorliegenden Studie wurden aus im Vorfeld durchgeführten Tierversuchen⁵⁹ abgeleitet. Ob eine Veränderung von Konzentration und Dosierung der Triggersubstanzen zu besseren Ergebnissen führt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

(e) Das Ergebnis des im Vorfeld durchgeführten IVCT kann falsch sein.⁶⁹ Der in-vitro Kontrakturtest nach dem Protokoll der EMHG verfügt nur über eine Spezifität von 94%, das heißt, dass schon von 17 MH nichtveranlagten Patienten ein Patient falsch positiv diagnostiziert wird.

Ebenso ist ein im Vorfeld mittels IVCT als MHN diagnostizierter Proband sowohl bei der Laktatmessung nach Halothanstimulation als auch bei der Partialdruckmessung in seinen Messwerten über den Schwellenwert angestiegen und wurde somit im Vergleich zum IVCT falsch positiv diagnostiziert.

Wir nehmen an, dass das Messergebnis hauptsächlich von methodischen Faktoren (Positionierung der Messsonden parallel zu den Muskelfasern, Dosierung der Triggersubstanzen) sowie der persönlichen Prädisposition wie z.B. dem individuellen Wasser- und Fettgehalt des Probanden beeinflusst wird. Die gleichzeitige Applikation der Triggersubstanzen Koffein und Halothan könnte zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Substanzen führen. Dies ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Bezüglich der räumlichen Ausbreitung der applizierten Substanzen um die MD-Sonde konnten De Lange et al. zeigen, dass es bei intrazerebral appliziertem Acetaminophen zu einem starken Konzentrationsabfall mit einem Faktor von 10^{-4} bis 10^{-5} in einem Abstand von 2 mm von der Sonde kommt.⁷⁰ Auch wenn dies nicht für Halothan und Muskelgewebe bewiesen ist, so zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchung, dass es im umgebenden Muskelgewebe nach Halothan- oder Koffeinapplikation weder zu einem signifikanten Laktatanstieg noch zu einer Zunahme des Kohlendioxid-Partialdruckes kommt.⁷¹

4.4 Sensitivität und Spezifität

Die Qualität dieses neuen Tests zur Diagnose einer MH-Veranlagung wird durch die Sensitivität und Spezifität dieses Verfahrens beschrieben. Für die Sicherheit des Patienten müssen die diagnostischen Schwellenwerte so gesetzt werden, dass eine möglichst hohe Sensitivität erreicht wird. Eine reduzierte Spezifität wird dabei in Kauf genommen. Bei 46 der 53 Probanden wurde im Vorfeld eine Diagnose durch einen IVCT gestellt. Für diese 46 untersuchten Probanden ergaben sich für das neue Testverfahren mit den empirisch festgelegten Schwellenwerten von 3,15 mmol/l für die Laktatmessung und von 32 mmHg/h für den pCO₂-Anstieg eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 96%. Eine Angabe des positiven und negativen Vorhersagewertes ist aufgrund der fehlenden exakten Prävalenz nicht möglich. Wegen der relativ kleinen Probandenzahl von 46 untersuchten Personen sind diese Werte allerdings nur als vorläufige Ergebnisse zu verstehen.

Die CO₂-Partialdruckmessung nach Koffeinstimulation lieferte von den drei Einzeltests die sichersten Ergebnisse mit einer Sensitivität von 95% und einer Spezifität von 92%. Diese gute diagnostische Aussagekraft ist dabei auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Erstens ist CO₂ das unmittelbare Produkt einer Stoffwechselsteigerung des Muskels, zweitens diffundiert es ausgezeichnet durch das Gewebe und verringert damit das methodische Problem des fehlenden Nachweises aufgrund z. B. einer nicht korrekt liegenden Messsonde. Im Gegensatz hierzu entsteht Laktat erst verzögert als Endprodukt der anaeroben Glykolyse.

Sicherlich ist eine Sensitivität von 95% für ein neues Testverfahren zur MH-Diagnostik aufgrund der potentiell tödlichen Folgen einer Fehldiagnose zu gering. Der bisherige Goldstandard der MH-Testung, der IVCT, hat eine Sensitivität von 99% und bringt somit zuverlässigere Diagnosen. Jedoch ist anzunehmen, dass sich die Sensitivität dieser ersten Untersuchung noch wesentlich steigern lässt, z. B. durch Modifikation von Dosis, Konzentration und Messinstrumentarium.

4.5 Tatsächliche Laktatwerte im Muskel

Die Ergebnisse der Laktatmessung per Mikro dialyse entsprechen nicht den absoluten, an der Messstelle im Muskel vorhandenen Laktatkonzentrationen. Die im Dialysat enthaltene Laktatkonzentration ist nur ein Prozentanteil der im Muskel vorhandenen Konzentration, die in Abhängigkeit von der verwendeten MD-Membran und der Perfusionsgeschwindigkeit variiert. In der Literatur wird die basale Laktatkonzentration im Muskel mit 2,5 mM angegeben⁷², d.h. die in-vivo Laktat-Wiedergewinnung liegt in unseren Versuchen bei 29%, wenn wir von 0,73 mM als Mittelwert der basalen Laktatwerte aller drei Probandengruppen ausgehen. Daraus ergibt sich, dass die tatsächliche intramuskuläre Laktatkonzentration bei MHS-Probanden nach Stimulation mit Halothan oder Koffein auf Maximalwerte bis zu 36 mM steigen kann. Ausgehend von den gemessenen Werten liegt die tatsächliche intramuskuläre Laktatkonzentration bei MHS-Probanden nach Stimulation mit Koffein im Mittel bei 19 mmol/l und nach Stimulation mit Halothan bei 13 mmol/l. Ähnliche systemische Laktatkonzentrationen werden auch bei experimentell induzierter MH bei Schweinen berichtet.⁷³

4.6 Akzeptanz und Verträglichkeit der Untersuchung

Ein wesentlicher Aspekt bei der Einführung eines neuen Testverfahrens ist die Akzeptanz und Verträglichkeit dieser Untersuchung. Um diesbezüglich Informationen zu erhalten, haben wir alle Probanden etwa 6 Wochen nach der Untersuchung gebeten, auf einem Fragebogen (Abb. 2-3) ihre Erfahrungen zu dokumentieren. Die Probandengruppen unterschieden sich nur bezüglich der Fragen nach Intensität und Dauer der Schmerzen direkt nach Triggerapplikation. Am Tag nach der Untersuchung wurde kein Unterschied bezüglich noch vorhandener Schmerzen zwischen den drei Gruppen festgestellt. Alle drei Gruppen gaben nur noch eine sehr geringe Beeinträchtigung an. Die meisten MHS-Probanden beschrieben das Schmerzgefühl als kurz einschließendes, dumpfes, krampfartiges Gefühl im

Bereich der Injektionsstelle, das sich allmählich ausbreitete und nach 20 min wieder abklang. Diese Beschreibung korreliert gut mit der erwarteten, lokalen MH-ähnlichen Reaktion an der Applikationsstelle, bei der eine lokale Muskelkontraktur ausgelöst wird. Die Heilung der Einstichstellen verlief immer problemlos. Da die Haut an der Einstichstelle angeritzt und nach Sondenentfernung die Wunden mit speziellem Wundadhäsionspflaster verklebt wurden, blieben keine Narben zurück. Alle Probanden gaben an, dass sie sich in Zukunft für das neue Verfahren und gegen den IVCT entscheiden würden.

Eine ähnliche Patientenbefragung bei 55 Patienten nach Muskelbiopsie zum IVCT ergab, dass es hier häufiger zu Beeinträchtigungen kommt.⁷⁴ Die befragten Patienten gaben an, dass sie im Schnitt 6,7 Tage Wundschmerzen hatten und 10,3 Tage motorisch beeinträchtigt waren, verbunden mit einer Arbeitsunfähigkeit von 9,5 Tagen. Somit unterscheidet sich der bisherige Goldstandard der MH-Diagnostik, der IVCT, in seiner Beeinträchtigung für den Patienten erheblich von dem vorliegenden neuen Testverfahren. Es ist anzunehmen, dass die Patienten bei einem Verfahren dieser Art ein wesentlich geringeres Risiko für Blutungen, Infektionen und Nervenläsionen haben. Die Rekonvaleszenzzeit könnte wahrscheinlich wesentlich verkürzt werden, es blieben keine kosmetisch störenden Narben zurück und die Patienten könnten am nächsten Tag wieder arbeitsfähig sein. Die Einsparung von durchschnittlich 9,5 Tagen Arbeitsunfähigkeit würde somit auch einen wichtigen ökonomischen Vorteil gegenüber dem IVCT darstellen. Hinzu kommen die wesentlich geringeren Kosten der vorliegenden Untersuchung und die Möglichkeit, den Test bei zweifelhaften Ergebnissen zu wiederholen, was beim IVCT nicht ohne weiteres möglich ist, sowie die einfachere Standardisierung im Vergleich zum IVCT. Die hohe Bereitschaft unserer Probanden, an den Untersuchungen teilzunehmen, erklärten viele damit, dass sie mit ihrer Teilnahme ihren Kindern und anderen Menschen den belastenden IVCT ersparen möchten.

4.7 Resümee

Zusammenfassend zeigen die vorgestellten Ergebnisse, dass die lokale, intramuskuläre Applikation von Koffein und Halothan eine lokale, temporäre, hypermetabole Stoffwechselsituation bei MH-Veranlagten, nicht jedoch bei Gesunden auslöst, die sich in einem signifikanten Anstieg der intramuskulären Laktatkonzentration und des CO₂-Partialdrucks widerspiegelt. Die lokale MH-Triggerapplikation führt weder zu einer generalisierten MH-Reaktion, noch zu anderen klinisch relevanten Nebenwirkungen. Die Belastungen für den Probanden und die entstehenden Kosten sind dabei wesentlich geringer als bei einem IVCT.

Weitere methodische Untersuchungen zur Platzierung der Sonden, zur Bestimmung der optimalen Volumina und Konzentrationen der applizierten Triggersubstanzen, sowie multizentrische Studien zur Bestimmung von Sensitivität und Spezifität sind nötig, bevor dieses Verfahren zur klinischen MH-Diagnostik eingesetzt werden kann.

Die lokale intramuskuläre Applikation der MH-Trigger Koffein und Halothan unter Messung der intramuskulären Laktatkonzentration und des CO₂-Partialdrucks stellt ein neues, vielversprechendes, minimal-invasives Prinzip für die Entwicklung eines Verfahrens zur Diagnose einer MH-Veranlagung dar.

5 Zusammenfassung

Die maligne Hyperthermie (MH) ist eine akute, lebensbedrohliche Erkrankung, die bei disponierten Patienten durch Exposition mit volatilen Anästhetika und depolarisierenden Muskelrelaxantien ausgelöst wird. Sie zeigt sich in einer unkontrollierten Stoffwechselsteigerung mit Laktatazidose und Kohlendioxidanstieg.

Der bisherige Goldstandard der MH-Diagnostik ist der In-vitro Kontrakturtest (IVCT), dessen Nachteile allerdings in seiner Invasivität und der damit verbundenen Belastung für den Patienten, seinem finanziellen und zeitlichen Aufwand, sowie der schlechten Standardisierbarkeit liegen. Ein weniger invasives und aufwendiges Verfahren ist somit ein vordringlicher Gegenstand anästhesiologischer Forschung.

Wir nahmen an, dass die lokale, intramuskuläre Applikation von Halothan und Koffein bei MH-Veranlagten einen signifikant stärkeren lokalen Anstieg der Laktat- und Kohlendioxidkonzentration auslöst als bei MH nicht veranlagten Probanden, ohne dass dieser Anstieg mit systemischen Nebenwirkungen einhergeht. Mit diesem minimal-invasiven Verfahren sollte die Diagnose einer MH-Veranlagung möglich sein.

Mit Genehmigung der örtlichen Ethikkommission wurden bei 22 MH veranlagten Probanden (MHS [MH-suseptible]), 24 MH nicht veranlagten Probanden (MHN [MH-nonsusceptible]) und 7 Kontrollprobanden ohne persönliche oder familiäre MH-Vorgeschichte drei modifizierte Mikrodialyse (MD) -Sonden und eine CO₂-Partialdruckmesssonde im M. rectus femoris des Oberschenkels platziert. Nach Äquilibration wurde an die Spitze der ersten MD-Sonde 250 µl 80 mM Koffein injiziert. Die zweite doppeläufige MD-Sonde wurde mit 300 µl Halothan 10 Vol% gelöst in Sojabohnenöl perfundiert. Die dritte MD-Sonde diente zur Kontrollmessung. Im Dialysat wurde jeweils Laktat photospektrometrisch bestimmt. An die Spitze der CO₂-Partialdruckmesssonde wurde 500 µl 80 mM Koffein appliziert und der CO₂-Partialdruck fortlaufend gemessen.

Systemische hämodynamische und metabolische Parameter sowie das Schmerzempfinden des Probanden (mittels visueller Analogskala) wurden kontinuierlich gemessen.

Bei gleichen Ausgangswerten führte die lokale, intramuskuläre Applikation von Koffein bzw. Halothan bei MHS-Probanden zu einem signifikant stärkeren Laktatanstieg im Vergleich zu MHN- und Kontrollprobanden. Die Messungen der intraindividuellen Kontrollsonde unterschieden sich nicht signifikant innerhalb der drei Gruppen. Die CO₂-Partialdruckmessung ergab, dass sich bei gleichen Ausgangswerten der Partialdruckanstieg nach lokaler Applikation von Koffein bei den MHS-Probanden signifikant vom Anstieg bei den MHN- und Kontrollprobanden unterschied.

Als Zeichen der abgelaufenen Stoffwechselreaktion waren das Serum-Myoglobin, die Serum-Kreatinkinase und das Schmerzgefühl bei den MHS-Probanden signifikant höher als bei MHN- und Kontrollprobanden. Systemische hämodynamische und metabolische Parameter blieben bei allen drei Probandengruppen im Normbereich.

Somit konnte gezeigt werden, dass die lokale, intramuskuläre Stimulation mit Koffein und Halothan nur bei MH-Veranlagten die lokale Laktat- und Kohlendioxidkonzentration signifikant erhöht, ohne dass dies mit systemischen Nebenwirkungen einhergeht. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals, dass ein minimal-invasives Verfahren in Form eines metabolischen Provokationstests zur Diagnose einer maligne-Hyperthermie-Veranlagung möglich ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Gronert GA, Antognini JF, Pessah IN: Malignant Hyperthermia, Anesthesia. Herausgegeben von Miller RD (ed). Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, S. 1033-52
2. Gibson C, Tuttle JP: Heat stroke as a postoperative complication. JAMA 1900; 35: 1685-91
3. Ombrédanne L: De l'influence de l'anesthésique-employé dans la genèse des accidents post-opératoires de paleur-hyperthermie observés chez les nourrissons. Revue Medicale Française 1929; 10: 617-23
4. Harrison GG, Isaacs H: Malignant hyperthermia. An historical vignette. Anaesthesia 1992; 47: 54-6
5. Denborough MA, Lovell RRH: Anaesthetic deaths in a family. Lancet 1960; 2: 45-50
6. Hall LW, Woolf N, Bradley JW, Jolly DW: Unusual reaction to suxamethonium chloride. Br.Med.J. 1966; 2: 1305
7. Harrison GG: Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. Br.J.Anaesth. 1975; 47: 62-5
8. Ording H: Incidence of malignant hyperthermia in Denmark. Anesth.Analg. 1985; 64: 700-4
9. Kalow W, Britt BA, Terreau ME, Haist C: Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. Lancet 1970; 2: 895-8
10. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. The European Malignant Hyperpyrexia Group. Br.J.Anaesth. 1984; 56: 1267-9
11. Larach M.G.for the North American Malignant Hyperthermia Group: Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. Anesth Analg 1989; 69: 511-5
12. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, De Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 1991; 253: 448-51

13. McCarthy TV, Quane KA, Lynch PJ: Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum.Mutat.* 2000; 15: 410-7
14. Nelson TE, Rosenberg H, and Muldoon SM. Genetic testing for malignant hyperthermia in North America. *Anesthesiology* 2004; 100(2): 212-214
15. Tanabe T, Beam KG, Adams BA, et al.: Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346:567-9, 1990. *Nature* 1990; 346: 567-9
16. Leong P, MacLennan DH: A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J.Biol.Chem* 1998; 273: 7791-4
17. Meissner G, Henderson JS: Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide, and calmodulin. *J.Biol.Chem* 1987; 262: 3065-73
18. Gronert GA, Milde JH, Theye RA: Role of sympathetic activity in porcine malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1977; 47: 411-5
19. Nelson TE: Porcine malignant hyperthermia: critical temperatures for in vivo and in vitro responses. *Anesthesiology* 1990; 73: 449-54
20. Xia R, Stangler T, Abramson JJ: Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Is a Redox Sensor with a Well Defined Redox Potential That Is Sensitive to Channel Modulators. *J.Biol.Chem* 2000; 275: 36556-61
21. Sun J, Xu L, Eu JP, Stamler JS, Meissner G: Classes of Thiols That Influence the Activity of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel. *J.Biol.Chem* 2001; 276: 15625-30
22. Tong J, Oyamada H, Demarex N, Grinstein S, McCarthy TV, MacLennan DH: Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca^{2+} release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J.Biol.Chem* 1997; 272: 26332-9
23. Kunst G, Graf BM, Schreiner R, Martin E, Fink RH: Differential effects of sevoflurane, isoflurane, and halothane on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Anesthesiology* 1999; 91: 179-86
24. Nelson TE, Lin M, Zapata-Sudo G, Sudo RT: Dantrolene sodium can increase or attenuate activity of skeletal muscle ryanodine receptor

- calcium release channel. Clinical implications. *Anesthesiology* 1996; 84: 1368-79
25. Anetseder M, Roewer N: Maligne Hyperthermie, *Die Anästhesiologie*. Herausgegeben von Rossaint R, Werner C, Zwissler B. Springer, 2004, pp 1318-26
 26. Louis CF, Zualkernan K, Roghair T, Mickelson JR: The effects of volatile anesthetics on calcium regulation by malignant hyperthermia-susceptible sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 1992; 77: 114-25
 27. Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J: Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; 60: 1316-25
 28. Brandt A, Schleithoff L, Jurkat-Rott K, Klingler W, Baur C, Lehmann-Horn F: Screening of the ryanodine receptor gene in 105 malignant hyperthermia families: novel mutations and concordance with the in vitro contracture test. *Hum.Mol.Genet.* 1999; 8: 2055-62
 29. Rüffert H, Olthoff D, Deutrich C, Thamm B, Froster U: [In vitro contracture test and gene typing in diagnosing malignant hyperthermia. Each as an appropriate complement to the other method]. *Anaesthesist* 2000; 49: 113-20
 30. Rosenberg H: Clinical presentation of malignant hyperthermia. *Br.J.Anaesth.* 1988; 60: 268-73
 31. Britt BA: Malignant hyperthermia. *Can.Anaesth.Soc.J.* 1985; 32: 666-78
 32. Loghmanee F, Tobak M: Fatal malignant hyperthermia associated with recreational cocaine and ethanol abuse. *Am.J.Forensic Med.Pathol.* 1986; 7: 246-8
 33. Olthoff D, Vonderlind C: [Anesthesia unrelated triggering of a fatal malignant hyperthermia crisis]. *Anaesthesist* 1997; 46: 1076-80
 34. Anetseder M, Hartung E, Klepper S, Reichmann H: Gasoline Vapors Induce Severe Rhabdomyolysis. *Neurology* 1994; 44: 2393-5
 35. Feuerman T, Gade GF, Reynolds R: Stress-induced malignant hyperthermia in a head-injured patient. Case report. *J.Neurosurg.* 1988; 68: 297-9
 36. Hackl W, Winkler M, Mauritz W, Sporn P, Steinbereithner K: Muscle biopsy for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility in two patients with severe exercise-induced myolysis. *Br.J.Anaesth.* 1991; 66: 138-40

37. Roewer N, Anetseder M: Cardiovascular Alterations in Malignant Hyperthermia, Malignant Hyperthermia. Herausgegeben von Schulte am Esch JS, Scholz J, Wappler F. Lengerich, Pabst Science Publishers, 2000, S. 134-41
38. Schwartz L, Rockoff MA, Koka BV: Masseter spasm with anesthesia: incidence and implications. *Anesthesiology* 1984; 61: 772-5
39. Rosenberg H, Reed S: In vitro contracture tests for susceptibility to malignant hyperthermia. *Anesth.Analg.* 1983; 62: 415-20
40. Ellis FR, Harriman DG, Keaney NP, Kyei-Mensah K, Tyrrell JH: Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br.J.Anaesth.* 1971; 43: 721-2
41. Urwyler A, Deufel Th, McCarthy T, West S for the European Malignant Hyperthermia Group: Guidelines for the detection of malignant hyperthermia susceptibility. *Br.J.Anaesth.* 2001; 86: 283-7
42. Hopkins PM, Hartung E, Wappler F: Multicentre evaluation of ryanodine contracture testing in malignant hyperthermia. The European Malignant Hyperthermia Group. *Br.J.Anaesth.* 1998; 80: 389-94
43. Ording H, Glahn K, Gardi T, Fagerlund T, Bendixen D: 4-Chloro-m-cresol test--a possible supplementary test for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1997; 41: 967-72
44. Ording H, Brancadoro V, Cozzolino S, Ellis FR, Glauber V, Gonano EF, Halsall PJ, Hartung E, Heffron JJ, Heytens L, Kozak-Ribbens G, Kress H, Krivosic-Horber R, Lehmann-Horn F, Mortier W, Nivoche Y, Ranklev-Twetman E, Sigurdsson S, Snoeck M, Stieglitz P, Tegazzin V, Urwyler A, Wappler F: In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. The European Malignant Hyperthermia Group. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1997; 41: 955-66
45. Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F: Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 2000; 23: 4-17
46. Robinson RL, Anetseder MJ, Brancadoro V, van Broekhoven C, Carsana A, Censier K, Fortunato G, Girard T, Heytens L, Hopkins PM, Jurkat-Rott K, Klinger W, Kozak-Ribbens G, Krivosic R, Monnier N, Nivoche Y, Olthoff D, Rueffert H, Sorrentino V, Tegazzin V, Mueller CR: - Recent advances in the diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility: how confident can we be of genetic testing? *Eur.J.Hum.Genet.* 2003 Apr;11(4):342-8

47. Deufel T, Sudbrak R, Feist Y, Rübsam B, DuChesne I, Schafer KL, Roewer N, Grimm T, Lehmann-Horn F, Hartung EJ: Discordance, in a malignant hyperthermia pedigree, between in vitro contracture-test phenotypes and haplotypes for the MHS1 region on chromosome 19q12-13.2, comprising the C1840T transition in the RYR1 gene. *Am.J.Hum.Genet.* 1995; 56: 1334-42
48. Adeokun AM, West SP, Ellis FR, Halsall PJ, Hopkins PM, Foroughmand AM, Iles DE, Robinson RL, Stewart AD, Curran JL: The G1021A substitution in the RYR1 gene does not cosegregate with malignant hyperthermia susceptibility in a British pedigree. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; 60: 833-41
49. Anetseder M, Pohl F, Klein R, Muller R, Hoyer A, Horbaschek H, Roggendorf W, Hartung E, Roewer N: The role of histopathological findings in the diagnosis of malignant hyperthermia predisposition. *Anesthesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie* 1999; 34: 626-33
50. Britt BA, Endrenyi L, Peters PL, Kwong FH, Kadujevic L: Screening of malignant hyperthermia susceptible families by creatine phosphokinase measurement and other clinical investigations. *Can.Anaesth.Soc.J.* 1976; 23: 263-84
51. Girard T, Cavagna D, Padovan E, Spagnoli G, Urwyler A, Zorzato F, Treves S: B-lymphocytes from malignant hyperthermia-susceptible patients have an increased sensitivity to skeletal muscle ryanodine receptor activators. *J.Biol.Chem.* 2001; 276: 48077-82
52. Ungerstedt U.: Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. *J.Int.Med.* 1991; 230: 365-73
53. Jacobson I, Sandberg M, Hamberger A: Mass transfer in brain dialysis devices--a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration. *J.Neurosci.Methods* 1985; 15: 263-8
54. Lindefors N, Amberg G, Ungerstedt U: Intracerebral microdialysis: I. Experimental studies of diffusion kinetics. *J.Pharmacol.Methods* 1989; 22: 141-56
55. Larsson CI: The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. *Life Sci.* 1991; 49: 73-8
56. Amberg G, Lindefors N: Intracerebral microdialysis: II. Mathematical studies of diffusion kinetics. *J.Pharmacol.Methods* 1989; 22: 157-83
57. Lonroth P, Jansson PA, Smith U: A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am.J.Physiol.* 1987; 253: 228-31

58. Ording H, Islander G, Bendixen D, Ranklev-Twetman E: Between-center variability of results of the in vitro contracture test for malignant hyperthermia susceptibility. *Anesth.Analg.* 2000; 91: 452-57
59. Anetseder M, Sachs M, Hoyer A, Hartung E, Roewer N: Intramuscular halothane and caffeine application induces local hypermetabolism in MH-susceptible pigs but not in normal pigs. *Anesthesiology* 2000; 93: 209
60. Anetseder M, Sachs M, Hoyer A, Hartung E, Roewer N: Local intramuscular application of halothane in MH-susceptible pigs without systemic effects. *Anesthesiology* 2000; 93: 209
61. Harwood TN, Nelson TE: Massive postoperative rhabdomyolysis after uneventful surgery: a case report of subclinical malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1998; 88: 265-8
62. Laurence AS: Serum myoglobin and creatine kinase following surgery. *Br.J.Anaesth.* 2000; 84: 763-6
63. Hartung E, Anetseder M: The Standard In-Vitro Contracture Test, Malignant Hyperthermia. Herausgegeben von Schulte am Esch JS, Scholz J, Wappler F. Lengerich, Pabst Science Publishers, 2000, S. 251-61
64. Berman P, Tattersall M: Self-poisoning with intravenous halothane. *Lancet* 1982; 1: 340
65. Musser JB, Fontana JL, Mongan PD: The anesthetic and physiologic effects of an intravenous administration of a halothane lipid emulsion (5% vol/vol). *Anesth. Analg.* 1999; 88: 671-5
66. Fierobe L, Nivoche Y, Mantz J, Elalaoui Y, Veber B, Desmots JM: Perioperative severe rhabdomyolysis revealing susceptibility to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1998; 88: 263-5
67. Acquarone N, Garibotto G, Tegazzin V, Sofia A, Gurreri G: Postanaesthetic myoglobinuric renal failure: an isolated expression of malignant hyperthermia. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1994; 9: 567-8
68. Fletcher JE, Conti PA, Rosenberg H: Comparison of North American and European malignant hyperthermia group halothane contracture testing protocols in swine. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1991; 35: 483-7
69. Isaacs H, Badenhorst M: False-negative results with muscle caffeine halothane contracture testing for malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1993; 79: 5-9
70. de Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD: Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies

on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1997; 25: 27-49

71. Anetseder M, Hager M, Muller-Reible C, Roewer N: Regional lactate and carbon dioxide concentrations in a metabolic test for malignant hyperthermia. *Lancet* 2003; 362: 494
72. Korth U, Merkel G, Fernandez FF, Jandewerth O, Dogan G, Koch T, van Ackern K, Weichel O, Klein J: Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anesthesiology* 2000; 93: 1407-12
73. Lucke JN, Hall GM, Lister D: Porcine malignant hyperthermia. I: Metabolic and physiological changes. *Br.J.Anaesth.* 1976; 48: 297-304
74. Mueller R, Anetseder M, Hoyer A, Hartung E, Roewer N: Outcome evaluation of patients after muscle biopsy for malignant hyperthermia testing. *Anesthesiology* 2000; 93: 210

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. N. Roewer, Direktor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Promotionsthemas danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. M. Anetseder für die stetige Unterstützung meiner Arbeit. Ohne sein Engagement, seine Anregungen und Geduld wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich auch dem Team des urologischen Aufwachraumes Conny Smidt und Rainer Zull, die mich bei der Untersuchung der Probanden tatkräftig unterstützt haben, sowie dem Team des MH-Labors.

Die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre des gesamten Teams haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Abschließend möchte ich allen Probanden danken, die an dieser Studie teilgenommen haben. Ohne ihr überwältigendes Engagement wäre diese Untersuchung nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hager
Vorname: Martin
Geburtsdatum, -ort: 7. Oktober 1976 in Freiburg im Breisgau
Wohnort: Würzburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 – 1987: Grundschule, Kirchzarten
1987 – 1996: Kreisgymnasium Kirchzarten
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Auszeichnung für besonderen Einsatz für die Schulgemeinschaft

Zivildienst

08/1996 – 10/1997: Rettungssanitäter, Deutsches Rotes Kreuz, Freiburg

Hochschulbildung

1997 – 2004: Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/1999: Physikum
08/2000: Erstes Staatsexamen
04/2003: Zweites Staatsexamen
06/2004: Drittes Staatsexamen

Famulaturen

03/2000 – 04/2000: Innere Medizin (Helios-Klinik, Titisee-Neustadt)

09/2000 – 10/2000: Innere Medizin (General Hospital, Sligo, Irland)
03/2001 – 04/2001: Anästhesie (Universitätsklinikum Würzburg)
09/2001 – 10/2001: Chirurgie (Mater Hospital, Belfast, Nordirland)
03/2002 – 04/2002: Pädiatrie (Pädiatrische Praxis, Würzburg)

Praktisches Jahr

04/2003 – 08/2003: Pädiatrie (Universitätsklinikum Würzburg)
08/2003 – 12/2003: Innere Medizin (Regionalspital Emmental, Burgdorf, Schweiz)
12/2003 – 03/2004: Chirurgie (Klinikum Coburg)

Beruf

07/2004 – 09/2004: Arzt im Praktikum, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universität Würzburg
seit 10/2004: Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universität Würzburg

Publikationen

- Anetseder M, Hager M, Muller CR, Roewer N. Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test. Lancet 2002 May 4;359(9317):1579-80
- Anetseder M, Hager M, Muller-Reible C, Roewer N. Regional lactate and carbon dioxide concentrations in a metabolic test for malignant hyperthermia. Lancet. 2003 Aug 9;362(9382):494; discussion 494-5

Preise

11/2002: Vortragspreis, 13th European Students' Conference, Berlin

Berufliche Nebentätigkeiten

1997 – 2004:

Rettungssanitäter, Bayerisches Rotes Kreuz,
Würzburg

Würzburg, 6. Juni 2005