

Aus der Klinik für Anaesthesiologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer

**Untersuchungen zur Modulation der interstitiellen Laktatkonzentration  
im isoliert perfundierten Skelettmuskel der Ratte  
durch Kalzium, Koffein, Ryanodin und Dantrolen  
im Rahmen der Entwicklung eines minimal-invasiven Verfahrens zur Diagnostik  
der maligne Hyperthermie Veranlagung**

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

Vorgelegt von

Frank Schuster  
aus Herlheim

Würzburg, September 2002

Referent : Prof. Dr. N. Roewer  
Korreferent : Prof. Dr. C.-A. Greim  
Dekan : Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2002

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

*Meinen Fltern*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Maligne Hyperthermie</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Definition .....	1
1.1.2	Historie und Epidemiologie .....	1
1.1.3	Physiologischer Erregungs-Kontraktions-Ablauf .....	1
1.1.4	Zelluläre Energiegewinnung .....	2
1.1.5	Pathophysiologie .....	2
1.1.6	Klinik und Therapie .....	2
1.1.7	Diagnostik der malignen Hyperthermie Veranlagung .....	3
1.1.8	Pharmakologie von Koffein, Ryanodin und Dantrolen .....	4
<b>1.2</b>	<b>Mikrodialyse</b> .....	<b>5</b>
1.2.1	Geschichte der Mikrodialyse .....	5
1.2.2	Prinzip der Mikrodialyse .....	5
1.2.3	Definition der Recovery .....	6
1.2.4	Möglichkeiten der Recovery-Bestimmung .....	7
1.2.5	Beeinflussende Faktoren .....	8
1.2.6	Perspektiven .....	9
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>METHODIK</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>10</b>
2.1.1	Mikrodialysesonden .....	10
2.1.1.1	Eigenschaften und Pflege .....	10
2.1.1.2	Kalibrierung der Sonden in-vitro .....	10
2.1.2	Substanzen und Material .....	10
2.1.2.1	Pipetten .....	10
2.1.2.2	Systemische und lokale Perfusionslösungen .....	11
2.1.3	Geräte .....	11
2.1.4	Versuchstiere .....	12
<b>2.2</b>	<b>Ermittlung der Standardkurven</b> .....	<b>12</b>
2.2.1	Standardkurve für Laktat .....	12
2.2.2	Standardkurve für Koffein .....	13

<b>2.3</b>	<b>Versuchsaufbau</b> .....	<b>14</b>
2.3.1	Versuchsbedingungen .....	14
2.3.2	Versuchsaufbau für die Bestimmung der in-vitro <i>recovery</i> .....	14
2.3.2.1	Ermittlung der <i>relative recovery</i> von Laktat.....	14
2.3.2.2	Ermittlung der <i>relative loss recovery</i> von Koffein .....	15
2.3.2.3	Ermittlung der <i>relative loss recovery</i> von Kalzium .....	15
2.3.3	Isolierte Organperfusion des Skelettmuskels der Ratte.....	15
2.3.3.1	Präparation der Versuchstiere .....	15
2.3.3.2	Basale Laktatkonzentrationen in beiden Hinterläufen.....	17
2.3.3.3	Einfluss der Osmolarität des Mikrodialyse-Perfusats auf die Laktatkonzentration .....	17
2.3.3.4	Einfluss von Kalzium im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration .....	17
2.3.3.5	Einfluss von Koffein im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration .....	17
2.3.3.6	Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 0,25 µM sowie 1 µM Ryanodinlösung .....	18
2.3.3.7	Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 1 µM Dantrolenlösung .....	18
2.3.3.8	Perfusionskontrolle.....	18
<b>2.4</b>	<b>Probenanalyse</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Histologische Untersuchung der Muskelpräparate</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Bestimmung der <i>relative recovery</i> und der <i>relative loss recovery</i></b> .....	<b>20</b>
3.1.1	Bestimmung der <i>relative recovery</i> von Laktat in-vitro.....	20
3.1.2	Bestimmung der <i>relative loss recovery</i> von Koffein in-vitro .....	20
3.1.3	Bestimmung der <i>relative loss recovery</i> von Kalzium in-vitro .....	21
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der isolierten Organperfusion</b> .....	<b>22</b>
3.2.1	Basale Laktatkonzentrationen in beiden Hinterläufen .....	22
3.2.2	Einfluss der Osmolarität des Mikrodialyse-Perfusats auf die Laktatkonzentration.....	23

3.2.3	Einfluss von Kalzium im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration.....	24
3.2.4	Einfluss von Koffein im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration.....	25
3.2.5	Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 0,25 $\mu$ M sowie 1 $\mu$ M Ryanodinlösung .....	26
3.2.6	Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 1 $\mu$ M Dantrolenlösung .....	27
<b>3.3</b>	<b>Histologische Untersuchung der Muskelpräparate.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>40</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosintriphosphat
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Da	Dalton
G	Gauge
G-Protein	Guanylnucleotid Protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd
IVCT	in-vitro-Kontraktur-Test
K <sup>+</sup>	Kalium
MH	Maligne Hyperthermie
n	Versuchszahl
Na <sup>2+</sup>	Natrium
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid [oxidierte Form]
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid [reduzierte Form]
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
pH	Potentia hydrogenii
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
RyR	Ryanodin-Rezeptor

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Maligne Hyperthermie

### 1.1.1 Definition

Die autosomal-dominante Veranlagung zur malignen Hyperthermie (MH) basiert auf einer Störung des skelettmuskulären Kalzium-Stoffwechsels. Unter Exposition mit volatilen Inhalationsnarkotika oder depolarisierenden Muskelrelaxantien kann eine unkontrollierte intrazelluläre Kalzium-Freisetzung zu einer lebensbedrohlichen metabolischen Entgleisung führen. Für eine Disposition gibt es im täglichen Leben in der Regel keine Anhaltspunkte. Rechtzeitige Diagnose und adäquate Therapie einer MH-Krise sind entscheidend für den Patienten.

### 1.1.2 Historie und Epidemiologie

Über perioperative Komplikationen während Inhalationsnarkosen mit erheblichen Körpertemperaturanstiegen und tödlichen Verläufen wurde bereits Anfang des 20. Jahrhundert berichtet (1). 1960 beschrieben DENBOROUGH und LOVELL die maligne Hyperthermie als eigenständiges Krankheitsbild (2).

Die Prävalenz der MH-Disposition wird auf 1:10.000 geschätzt. Angaben über die klinische Inzidenz einer MH-Krise schwanken zwischen 1:25 für Halothan-Succinylcholin-Narkosen bei Kindern mit Strabismus und 1:250.000 für alle Altersgruppen und Anästhesieverfahren (3). Nach einer 1997 durchgeführten Untersuchung von HARTUNG ET AL. wird die Inzidenz für Deutschland mit 1:60.000 Allgemeinanästhesien angegeben (4).

### 1.1.3 Physiologischer Erregungs-Kontraktions-Ablauf

Der Neurotransmitter Acetylcholin löst an der motorischen Endplatte ein Aktionspotential der Skelettmuskulatur aus. Entlang der Zellmembran leitet sich das Aktionspotential bis in das transversale System fort. In den sogenannten Triaden stehen Sarkolemm und Membran des sarkoplasmatischen Retikulums in enger Beziehung. Aufgrund einer Ladungsverschiebung am sarkolemmalen Dihydropyridin-Rezeptor öffnet sich der benachbarte sarkoplasmatische Kalzium-Kanal, auch Ryanodin-Rezeptor (RyR) genannt (5). Drei Isoformen des Ryanodin-Rezeptors wurden in Säugetieren identifiziert, wobei RyR1 im Skelettmuskel beschrieben wurde (6). Die Rezeptoröffnung führt zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma. Nach Diffusion der Kalziumionen zu den Myofilamenten binden diese an Troponin und lösen damit die Interaktion der Filamente aus; der Skelettmuskel kontrahiert. Durch die aktive Wiederaufnahme von

Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum mit Hilfe der Kalzium-ATPase erschläft der Muskel (7).

#### 1.1.4 Zelluläre Energiegewinnung

Um die energieabhängigen Stoffwechselabläufe in der Skelettmuskulatur zu ermöglichen benötigt die Zelle ATP. Durch die im Zytosol ablaufende *Glykolyse* wird Glukose in Pyruvat umgewandelt und ATP bereitgestellt:



Das verbrauchte  $NAD^+$  wird unter anaeroben Bedingungen durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat mittels Laktat-Dehydrogenase regeneriert. Unter aeroben Bedingungen folgt der Glykolyse der *Citratzyklus* und die *Atmungskette*, in welcher der wesentliche Anteil von ATP gebildet wird (8).

#### 1.1.5 Pathophysiologie

Triggersubstanzen, wie volatile Inhalationsanästhetika oder depolarisierende Muskelrelaxanzien, induzieren bei disponierten Patienten in Folge einer verlängerten Öffnungszeit des Ryanodin-Rezeptors eine unkontrollierte Freisetzung von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol. Die anhaltende Aktivierung kontraktile Filamente führt zum klinischen Bild des Rigors. Gleichzeitig aktiviert Kalzium den aeroben und anaeroben Zellstoffwechsel. Der damit einhergehende erhöhte Sauerstoffverbrauch sowie die gesteigerte  $CO_2$ -, Laktat-, und Wärmeproduktion führen letztlich zu den Symptomen der MH-Krise.

Neben Veränderungen des Ryanodin-Rezeptors konnte ein gesteigerter Inositolphosphatstoffwechsel mit signifikanter Erhöhung des kalziumfreisetzenden Botenstoffes 1,4,5-Inositoltriphosphat in Skelettmuskelpräparaten von MH-Veranlagten nachgewiesen werden (9).

#### 1.1.6 Klinik und Therapie

Das klinische Bild einer *fulminanten MH-Krise* ist eindeutig. Neben dem generalisierten Muskelrigor führt die Stoffwechselentgleisung zu Tachykardie, Hyperkapnie, Hypoxämie, metabolischer und respiratorischer Azidose und als Spätsymptom zur Hyperthermie. In Folge der zellulären Energiedepletion kommt es zur Freisetzung von Kalium, Kreatinkinase und Myoglobin im Serum als Zeichen der Rhabdomyolyse. Der gesteigerte Sauerstoffbedarf im Muskel kann weder durch sympatho-adrenerge Stimulation noch durch Vasodilatation gedeckt werden. Einer initialen Sinustachykardie und arteriellen Hypertonie folgen kardiale Arrhythmien und Hypotonie als Zeichen des

Kreislaufversagens. In der Spätphase können sekundäre Komplikationen, wie Verbrauchskoagulopathie, Lungen- und Hirnödem sowie Herz-, Leber- und Nierenversagen hinzutreten. *Abortive Verlaufsformen* dagegen gehen in der Regel nur mit unspezifischen Symptomen einher.

Die Therapie der MH-Krise besteht in der sofortigen Beendigung der Triggersubstanzzufuhr, der Normoventilation mit 100% Sauerstoff bei einem Frischgasfluss  $> 10 \text{ l min}^{-1}$  mit Normalisierung der endexpiratorischen  $\text{CO}_2$ -Konzentration und Beseitigung der hypermetabolen Stoffwechsellage mit der Bolusgabe von  $2,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}$  *Dantrolen*, welche nach Bedarf wiederholt wird. Die metabolische Azidose wird entsprechend der Blutgasanalyse mittels Trispuffer oder Natriumbicarbonat therapiert. Bei einem Temperaturanstieg  $> 38^\circ\text{C}$  ist eine aktive Kühlung des Patienten nötig. Eine mindestens 24-stündige intensivmedizinische Nachbetreuung dient zur Prophylaxe und Therapie von Sekundärkomplikationen (10).

#### 1.1.7 Diagnostik der malignen Hyperthermie Veranlagung

Der *in-vitro-Kontraktur-Test* (IVCT) mit Koffein und Halothan an Muskelbiopsiematerial geht auf einen Vorschlag der Arbeitsgruppen um KALOW und ELLIS zurück und ist das einzige zuverlässige Verfahren zur Erkennung einer MH-Disposition (11,12). Um die Testdurchführung zu standardisieren, wurde 1983 das Europäische Protokoll und vier Jahre später das Nordamerikanische Protokoll eingeführt (13,14). Erstgenanntes erreicht eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 94% bezüglich einer MH-Veranlagung. Bei 7-15% der getesteten Patienten löst nur eine der Substanzen eine pathologische Kontraktur aus. Diese Patientengruppe wird als MHE (MH equivocal) klassifiziert und klinisch aus Gründen der Patientensicherheit als MH gefährdet eingestuft. Auch die Entwicklung von zusätzlichen *in-vitro*-Tests mit Ryanodin und Chlorokresol konnten dieses Problem nicht endgültig lösen (15).

Eine wenig belastende Serumuntersuchung, wie die bei MH-Anlageträgern häufig leicht erhöhte Kreatinkinase, wies nur eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 50% auf.  $^{31}\text{P}$ -Magnetresonanzspektrometrische Analysen bezüglich Veränderungen von Adenosintriphosphat, organischem Phosphor, Phosphokreatin und intrazellulärem pH während und nach definierter Ischämie beziehungsweise nach ergometrischer Belastung erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. Biochemische Untersuchungen des ATP-Verbrauchs, der glykolytischen Aktivität, der cAMP-, Myophosphorylase- und Adenylatcyclaseaktivität, sowie der Nachweis pathologischer Proteine waren für die Diagnostik nicht verwertbar. Bei 30-50% der MH-Patienten wurden unspezifische histopathologische Veränderungen im Muskelbiopsat nachgewiesen. Zum Ausschluss anderer neuromuskulärer Erkrankungen wird diese Untersuchung neben dem IVCT durchgeführt. Die Entwicklung eines breit einsetzbaren molekulargenetischen

---

„Screenings“ scheint, aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Mutationen bei Patienten mit MH-Veranlagung, in absehbarer Zeit nicht realisierbar (16).

#### 1.1.8 Pharmakologie von Koffein, Ryanodin und Dantrolen

Das Methylxanthin Koffein beeinflusst den zellulären Metabolismus auf drei verschiedene Wege: (a) Es führt über eine Inhibition der Phosphodiesterase zu einer Erhöhung der intrazellulären Adenosintri-phosphat-Konzentration (cAMP). cAMP reguliert den Glykogenmetabolismus. Es hemmt in der Zelle die Glykogen-Synthase und aktiviert die Phosphorylase, die Glykogen in Glukose umwandelt. (b) In relativ niedriger Dosis werden Adenosin-Rezeptoren durch Koffein blockiert. A<sub>1</sub>-Rezeptoren erhöhen die Öffnungswahrscheinlichkeit von neuronalen Kalium-Kanälen im Gehirn durch Bindung an das inhibitorische G-Protein während der Signaltransduktion. A<sub>2</sub>-Rezeptoren steigern die Konzentration von cAMP. (c) Aufgrund hoher Affinität zum Ryanodin-Rezeptor erniedrigt Koffein die Schwelle für die sarkoplasmatische Kalzium-Freisetzung und führt in höheren Konzentrationen zu einer Kontraktur der Skelettmuskulatur (17). Dies wird im diagnostischen Koffein-Kontrakturtest ausgenutzt. Ryanodin, ein Pflanzenalkaloid, moduliert den Ryanodin-Rezeptor und führt dadurch zu einer gesteigerten Kalzium-Freisetzung aus dem saroplasmatischen Retikulum (18).

Das Hydantoinderivat Dantrolen hemmt die Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch Inhibierung der Signaltransduktion des Dihydropyridin-Rezeptors sowie durch Bindung an den Ryanodin-Rezeptor ohne die Kalzium-Wiederaufnahme zu beeinflussen (19).

## 1.2 Mikrodialyse

### 1.2.1 Geschichte der Mikrodialyse

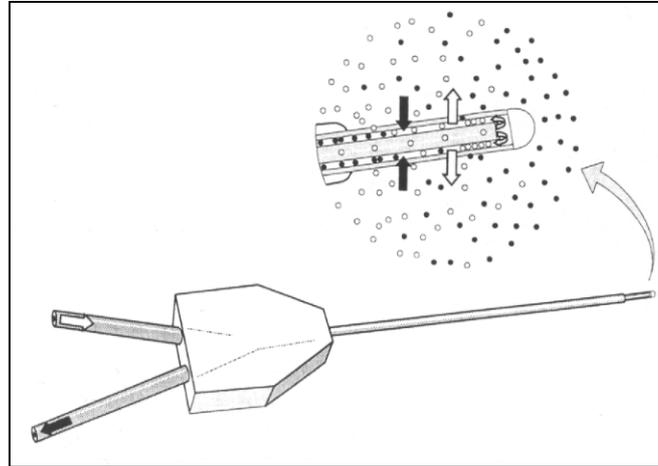
GADDUM stellte 1961 die sogenannte „*push-pull*“ Methode vor, bei der die Perfusionslösung durch eine Kanüle in das Gehirngewebe gepumpt (*push*) und gleichzeitig bei konstanter Geschwindigkeit von einer parallel angrenzenden zweiten Kanüle wieder abgezogen (*pull*) wurde. Nachteilig war der hohe technische Aufwand und die Ödembildungen durch Flüssigkeitsaufnahme in die Zellen. Bei von BITO ET AL. 1966 durchgeführten Versuchen wurden sogenannte „*dialysis sacs*“, die Salzlösung mit 6% Dextrane enthielten, in das subkutane Nackengewebe und Parenchym einer zerebralen Hemisphäre von Hunden implantiert. Nach einigen Wochen wurden diese Säckchen chirurgisch entfernt und die Aminosäurekonzentration der Lösungen bestimmt. Durch diese Experimente wurde erstmals das Prinzip eines von einer Dialysemembran umgebenen separaten Volumens, welches sich mit der extrazellulären Umgebung äquilibriert, eingeführt. Allerdings war es nicht möglich akut auftretende Konzentrationsveränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten zu messen. 1972 vereinigte DELGADO ET AL. mit der Entwicklung einer sogenannten „*dialytrode*“, bestehend aus zwei Stahlröhrchen, die eine push-pull-Kanüle bilden und in einer permeablen Dialysemembran enden, die vorher beschriebenen Methoden. Aufgrund der ausgeprägten Traumatisierung konnte sich dieses Verfahren nicht etablieren. Die heute eingesetzten *Mikrodialysesonden* wurden 1974 von UNGERSTEDT und PYCOCK entwickelt und werden mittlerweile in fast allen Organsystemen im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen eingesetzt (20).

### 1.2.2 Prinzip der Mikrodialyse

Das Prinzip der Mikrodialyse basiert auf Diffusion von Molekülen entlang eines bestehenden Konzentrationsgefälles zwischen zwei Kompartimenten, die durch eine semi-permeable Membran getrennt sind. In-vivo sind dies der Extrazellulärraum des Gewebes und das sogenannte *Perfusat* innerhalb der Mikrodialysesonde. Extrazelluläre Substanzen, zum Beispiel Neurotransmitter und Metabolite diffundieren in die Perfusionslösung, während dem *Perfusat* zugesetzte Substanzen in den Extrazellulärraum diffundieren (Abbildung 1). Das abfließende *Dialysat* wird gesammelt und analysiert.

Die Diffusion einer Substanz ist von der Molekülgröße, der Lipophilie bzw. Hydrophilie des *Perfusates*, der Perfusionsgeschwindigkeit, dem Konzentrationsgradienten und den Diffusionseigenschaften der Mikrodialysemembran abhängig. Meist werden Membranen mit einer Moleküldurchlässigkeit von 3.000 bis 20.000 Da zum Nachweis

von Aminosäuren, Glukose, Laktat, Glycerol und Adenosin oder pharmakologischen Substanzen wie Methylxanthinen verwendet. Spezielle Membranen bis 100.000 Da erlauben auch die Diffusion kleiner Proteine (21).



**Abb. 1:** Mikrodialysesonde: Das Perfusat fließt über den zuführenden Schenkel entlang einer semi-permeablen Membran und wird über den abführenden Schenkel als Dialysat abgeleitet (21).

### 1.2.3 Definition der Recovery

Das Fick'sche Gesetz stellt die einfachste mathematische Beschreibung der Diffusion dar:

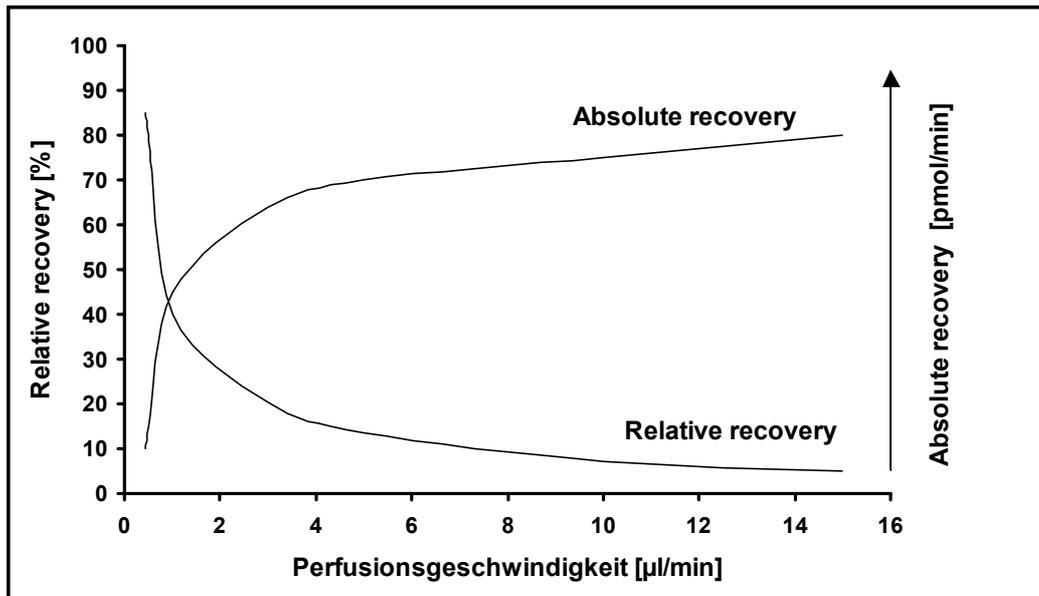
$$DQ / dt = D * F * \Delta C / l$$

Q = Stoffmenge; t = Zeiteinheit; D = Diffusionskoeffizient; F = Austauschfläche;  
l = Diffusionsstrecke;  $\Delta C$  = Konzentrationsdifferenz

Zwischen den Substanzkonzentrationen im Extrazellulärraum und im Perfusat stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein. Das Konzentrationsverhältnis zwischen diesen beiden Kompartimenten wird als „*recovery*“ bezeichnet.

Die *relative recovery* entspricht dem prozentualen Substanzanteil, der aus dem Interstitium in die Perfusatlösung diffundiert. Durch die Perfusion der Mikrodialysesonde mit einer vorgegebenen Stoffmenge kann über die Differenz von *Ausgangskonzentration* und *Dialysatkonzentration* auf die *relative loss recovery* geschlossen werden. Diese wird bei Applikation exogener Substanzen über das Perfusat bestimmt. Sowohl die *relative recovery*, als auch die *relative loss recovery* korrelieren negativ mit der Perfusionsgeschwindigkeit.

Die *absolute recovery* in  $\text{pmol min}^{-1}$  ist definiert als die Stoffmenge einer Substanz, die das Dialysat nach einer vorgegebenen Zeitspanne enthält. Sie nimmt bei steigendem Perfusionsfluss bis zum Erreichen eines Plateaus zu. Aufgrund möglicher Konzentrationsänderungen im Extrazellulärraum und der damit verbundenen Beeinflussung des extrazellulären Milieus wird diese Methode selten eingesetzt (22) (Abbildung 2).



**Abb. 2:** Einfluss der Perfusionsgeschwindigkeit ( $\mu\text{l min}^{-1}$ ) auf relative und absolute recovery einer Mikrodialysemembran (CMA/10, Membranlänge 4 mm) (21)

#### 1.2.4 Möglichkeiten der Recovery-Bestimmung

Um Substanzkonzentrationen im dialysierten Medium zu ermitteln, kommen verschiedene Methoden zur Messung der *in-vitro* und *in-vivo recovery* zur Anwendung. Bei der *in-vitro recovery*-Bestimmung wird die Mikrodialysesonde in einer Lösung mit bekannter Konzentration platziert und bei konstanter Flussrate das Dialysat analysiert. Die *in-vitro recovery* errechnet sich mit der Formel:

$$\text{Recovery} = \text{Konzentration im Dialysat} / \text{Ausgangskonzentration der Lösung} \times 100$$

Mit dieser Vorgehensweise können die Diffusionseigenschaften der Metabolite über die Mikrodialysemembran verglichen werden.

Mittels der *in-vivo recovery* können die extrazellulären Konzentrationen quantifiziert werden.

Bei der *various-flow-rates-recovery* wird die Sonde *in situ* mit verschiedenen Geschwindigkeiten perfundiert. Die *relative recovery* nimmt dabei mit abnehmender

Perfusionsrate zu. Unter der Annahme, dass bei keinem Fluss die Konzentration auf beiden Seiten der Membran gleich ist (*relative recovery* entspricht 100%) kann durch Extrapolation die Substanzkonzentration im Interstitium bestimmt werden. LÖNNROTH ET AL. entwickelte 1987 die *no-net-flux* Methode. Hierbei werden vier bis fünf unterschiedliche Dosierungen des zu bestimmenden Metaboliten appliziert, bis die Konzentration im Dialysat gleich der des Perfusats ist, was der gesuchten *recovery* *in-vivo* entspricht. Nachteilig erwies sich bei beiden Vorgehensweisen, dass sie zeitaufwendig sind und ein physiologisches Gleichgewicht voraussetzen. Ein weiteres Verfahren ist die Kalibrierung mittels der *internal reference Technik*. Sie basiert auf der Annahme, dass die Diffusion von Substanzen mit ähnlichen chemischen Eigenschaften über die Membran in beiden Richtungen gleich ist. Der Perfusionsflüssigkeit wird zum Beispiel ein Isotop beigesetzt. Im Dialysat sind prozentualer Verlust des Referenzwertes und prozentuale *recovery* der zu bestimmenden Substanz aus dem Interstitium kongruent. Die Indikatorsubstanz kann während des gesamten Versuches dem Perfusat beigesetzt werden und ermöglicht eine Kontrolle der Diffusionseigenschaften sowie der physiologischen Veränderungen (23).

#### 1.2.5 Beeinflussende Faktoren

Material und Porengröße der Mikrodialysemembran bestimmen wesentlich deren Diffusionseigenschaften. So vermindern lipophile Membranen die Diffusion hydrophiler Substanzen und umgekehrt.

Das Perfusat sollte an die physiologischen Gegebenheiten des Extrazellulärraumes angepasst werden, um geringe Veränderungen im Interstitium zu erfassen und um Auswirkungen der Perfusionslösung auf den Gewebestoffwechsel zu vermeiden. Geringere Bedeutung wird der Perfusatemperatur beigemessen. DE LANGE ET AL. äußerten die Vermutung, dass eine Anpassung an die Körpertemperatur nur bei hypotonen Lösungen nötig sei (24).

Unterschiedliche Perfusionsgeschwindigkeiten wirken sich sowohl auf die *recovery*, als auch auf das zu untersuchende Gewebe aus. Sie beeinflussen die Filtration durch die Mikrodialysesonde, den Konzentrationsgradienten zwischen Perfusat und Interstitium sowie das Volumen, das pro Zeiteinheit durch das Mikrodialysesystem fließt (25).

Das Gewebetrauma nach Platzierung der Mikrodialysesonden scheint keinen ungünstigen Einfluss auf das interstitielle Milieu zu haben. Bereits nach einer etwa 15-minütigen Äquilibrationszeit können im menschlichen M. quadriceps stabile Werte für Glukose und Laktat gemessen werden (26).

### 1.2.6 Perspektiven

Die Mikrodialysetechnik als *minimal-invasive* Methode eröffnet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. Beispielsweise können Messungen über mehrere Tage durchgeführt werden. Das Dialysat ist je nach gewählter Membran protein- und keimfrei. Der Nachweis lokaler Konzentrationen von systemisch applizierten Substanzen ist möglich, was bei der Neuentwicklung von Medikamenten von Bedeutung ist, um Rückschlüsse auf deren Einfluss in den einzelnen Geweben zu erhalten (27).

### 1.3 Fragestellung

Seit mehr als drei Jahrzehnten stellt der in-vitro-Kontraktur-Test das einzige zuverlässige Verfahren in der Diagnostik der malignen Hyperthermie Veranlagung dar. Das Vorgehen ist aufwendig und birgt als invasive Methode für den Patienten Risiken, wie Wundheilungsstörungen, Blutungen und lange Rekonvaleszenz.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Tiermodell zur isolierten Organperfusion der Skelettmuskulatur entwickelt werden, um das Prinzip der Mikrodialyse für Untersuchungen zur malignen Hyperthermie nutzbar zu machen. Verschiedene theoretische Überlegungen zum intramuskulären Stoffwechsel sollten überprüft werden:

- Kann der lokale, intramuskuläre Metabolismus, gemessen an der intramuskulären Laktatkonzentration, durch lokal applizierte Substanzen wie Koffein und Kalzium gesteigert werden?
  
- Kann die lokale, intramuskuläre Laktatkonzentration durch die systemische Perfusion mit Substanzen, welche Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum des Skelettmuskels freisetzen (Ryanodin) beziehungsweise deren Freisetzung hemmen (Dantrolen), moduliert werden?

## 2 METHODIK

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Mikrodialysesonden

##### 2.1.1.1 Eigenschaften und Pflege

Für alle Messungen wurden CMA/20 Mikrodialysesonden (CMA/MIKRODIALYSE, Stockholm, Schweden) verwendet. Die tubuläre Membran besteht aus Polycarbonat mit einer Moleküldurchlässigkeit bis 20.000 Dalton. Der Membranaußendurchmesser beträgt 0,5 mm bei einer Membranlänge von 10 mm. Die Länge des zuführenden Schenkels, über welchen das Perfusat appliziert wird, sowie des abführenden Schenkels für das Dialysat, beträgt 200 mm. Das Totraumvolumen der Membran und des abführenden Schenkels beläuft sich auf 7,6 µl (28).

Vor erstmaligen Gebrauch wurden die Sonden für 12 Stunden bei einer Geschwindigkeit von 1 µl min<sup>-1</sup> mit 70% Ethanol (MALINCKRODT BAXTER B.V., Deventer, Holland) perfundiert, um Glycerol, welches die Austrocknung der Membran während der Lagerung verhindert, auszuwaschen. Anschließend wurden diese, ebenfalls bei 1 µl min<sup>-1</sup> Fluss, für 3 Stunden mit aqua ad injectabile (BRAUN, Melsungen, Deutschland) gespült. Nach jedem Versuch wurden die Mikrodialysesonden für 30 min bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 0,5 µl min<sup>-1</sup> mit 70% Ethanol und im Anschluss, bis zur nächsten Verwendung, mit aqua ad injectabile gespült.

##### 2.1.1.2 Kalibrierung der Sonden in-vitro

Um stabile Diffusionseigenschaften zu gewährleisten, wurde vor der erstmaligen Verwendung und nach jeweils sechs Versuchen die *relative recovery* in-vitro für eine bekannte Laktatkonzentration bestimmt. Betrug der ermittelte Wert bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 µl min<sup>-1</sup> weniger als 70%, wurde die Sonde ersetzt.

#### 2.1.2 Substanzen und Material

##### 2.1.2.1 Pipetten

Für die Gesamtdauer der Arbeit wurden stets dieselben Pipetten (EPPENDORF, Hamburg, Deutschland) mit einem Volumen von 1 ml beziehungsweise 0-200 µl und dazu passende Pipettenspitzen (HARTMANN, Hamburg, Deutschland) verwendet. Vor Beginn der Studie und in regelmäßigen Abständen wurde die exakte Eichung beider Pipetten durch Pipettieren einer vorgegebenen Volumenmenge auf einer Präzisionswaage Typ R 180 D (SARTORIUS GMBH, Göttingen, Deutschland) bestimmt.

### 2.1.2.2 Systemische und lokale Perfusionslösungen

Für die isolierte Organperfusion wurden Ringerlösung ( $\text{Na}^+$  147,1 mM,  $\text{K}^+$  4,0 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  2,25 mM,  $\text{Cl}^-$  155,6 mM) (FRESENIUS, Bad Homburg, Deutschland), Ringerlösung mit Dantrolen 1  $\mu\text{M}$  (SIGMA CHEMICALS, Deisenhofen, Deutschland) sowie Ringerlösung mit Ryanodin 0,25  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  (PROCTER & GAMBLE, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

Zur Herstellung der 80 mM Sorbitollösung wurden zu 100 ml Ringerlösung 1457,6 mg Sorbitol ( $M = 182,2 \text{ g mol}^{-1}$ ) (SIGMA CHEMICALS, Deisenhofen, Deutschland) zugesetzt und mittels Rührmagnetstab bei Raumtemperatur gelöst.

Um 20 mM, 40 mM beziehungsweise 80 mM Kalziumlösungen herzustellen, wurden 294,04 mg, 588,08 mg beziehungsweise 1176,16 mg Kalziumchlorid-Dihydrat ( $M = 147,02 \text{ g mol}^{-1}$ ) (MERCK, Darmstadt, Deutschland) mit 100 ml Ringerlösung zersetzt.

Für 40 mM und 80 mM Koffeinlösungen wurden 776,7 mg beziehungsweise 1553,4 mg Koffein ( $M = 194,19 \text{ g mol}^{-1}$ ) (MERCK, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml Ringerlösung aufgelöst.

Für die spektrophotometrische Messung von Laktat wurde Laktatreagenz (SIGMA CHEMICALS, Deisenhofen, Deutschland) in 10 ml aqua ad injectabile gelöst. Das Reagenz enthielt 400  $\text{U l}^{-1}$  Laktatoxidase, 2 400  $\text{U l}^{-1}$  Peroxidase, chromogene Vorstufen, verschiedene Stabilisatoren, sowie Füllstoffe bei einem pH-Wert von 7,2. Das gelöste Reagenz war bei Raumtemperatur (18-26°C) 8 Stunden und gekühlt (2-8°C) 7 Tage stabil (29).

### 2.1.3 Geräte

Es wurde die Präzisionsspritzenpumpe CMA/100 (CMA/MIKRODIALYSE, Stockholm, Schweden) mit drei dazu kompatiblen 1 ml Spritzen Exmire Microsyringe (CMA/MIKRODIALYSE, Stockholm, Schweden) verwendet. Mittels CMA/11 Umschalters (CMA/MIKRODIALYSE, Stockholm, Schweden) war es während der Versuche möglich, zwischen den Spritzen mit ihren verschiedenen Lösungen ohne Veränderungen des Flusses zu wechseln.

Zur isolierten Organperfusion wurde die Infusionspumpe VP/1000-Infusomat (FRESENIUS, Bad Homburg, Deutschland) mit kompatibelem Schlauchsystem (FRESENIUS, Bad Homburg, Deutschland) verwendet.

Die Bestimmung der Dialysatkonzentrationen von Laktat und Koffein erfolgten mit Hilfe des HP 8453-UV-Visible Spektrophotometers (HEWLETT PACKARD, Waldbronn, Deutschland), kombiniert mit einem Vectra XA-Computer (HEWLETT PACKARD) und dem Programm Visible-Chem-Station Software (HEWLETT PACKARD).

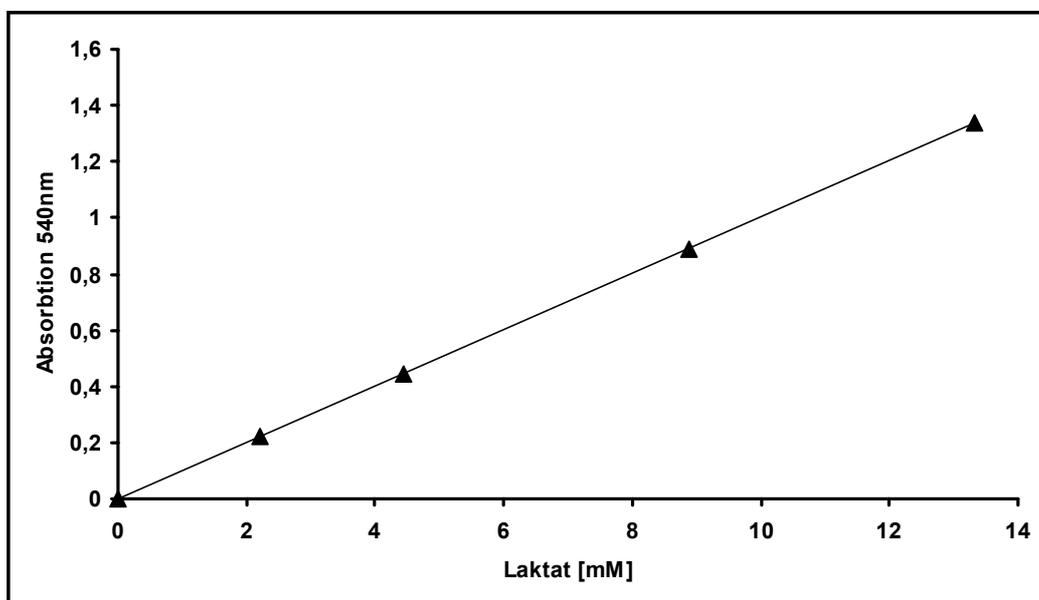
### 2.1.4 Versuchstiere

Es wurden 61 männliche *Sprague-Dawley* Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 300 Gramm verwendet. Futter und Trinkwasser wurde ihnen ad libitum bis unmittelbar vor Versuchsbeginn angeboten.

## 2.2 Ermittlung der Standardkurven

### 2.2.1 Standardkurve für Laktat

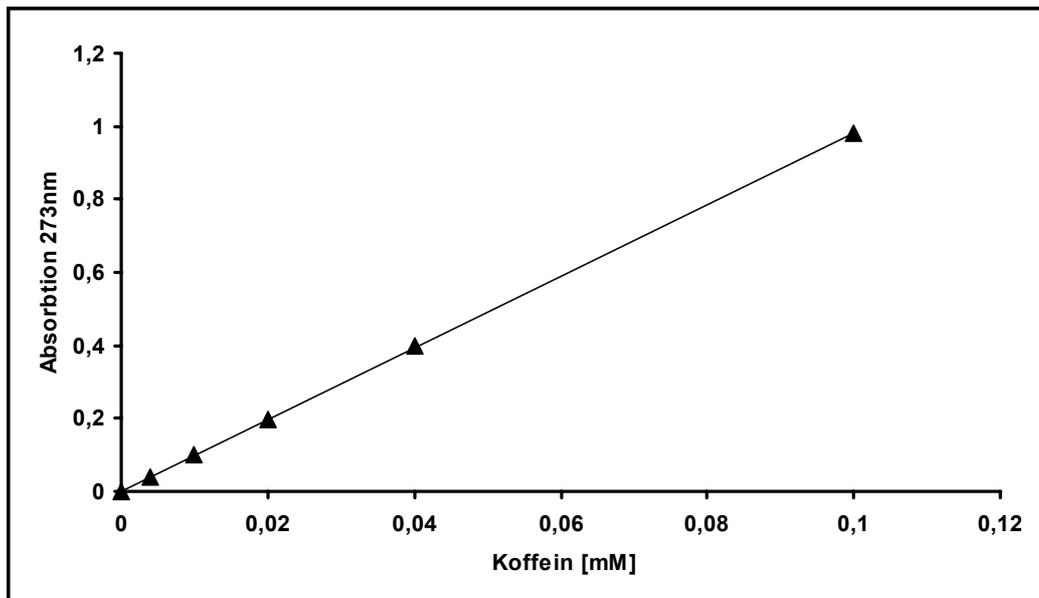
Zur Erstellung der spektrometrischen Laktat-Standardkurve wurden jeweils zwei Messungen verschiedener Konzentrationen eines Laktatstandards (Laktat 20 mg dl<sup>-1</sup>, 40 mg dl<sup>-1</sup>, 80 mg dl<sup>-1</sup>, 120 mg dl<sup>-1</sup>) (SIGMA CHEMICALS, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt. Je 10 µl des Laktatstandards wurden zu 1000 µl Laktatreagenz gegeben und für 10 min in einer Präzisionsküvette (HELLMA, Hamburg, Deutschland) im Dunkeln inkubiert. Bei diesem enzymatischen Bestimmungsverfahren wird Milchsäure durch Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) umgewandelt. In Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert Peroxidase die oxidative Kondensierung chromogener Vorstufen, die einen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 540 nm bilden. Die gemessene Absorption ist der Laktatkonzentration in der Probe direkt proportional (30). Aus den gemessenen Werten wurde eine lineare Standardkurve durch den Nullpunkt nach dem Lambert-Beer-Gesetz erstellt (31) (Abbildung 3).



**Abb. 3:** Laktat-Standardkurve

### 2.2.2 Standardkurve für Koffein

Für die Bestimmung der Koffein-Standardkurve wurden jeweils zwei Messungen einer bekannten Koffeinkonzentration (Koffein 0,004 mM, 0,01 mM, 0,02 mM, 0,04 mM, 0,1 mM) bei einem Absorptionsmaximum von 273 nm durchgeführt. Aus den gemessenen Werten wurde eine lineare Standardkurve durch den Nullpunkt nach dem Lambert-Beer-Gesetz erstellt (31) (Abbildung 4).



**Abb. 4:** Koffein-Standardkurve

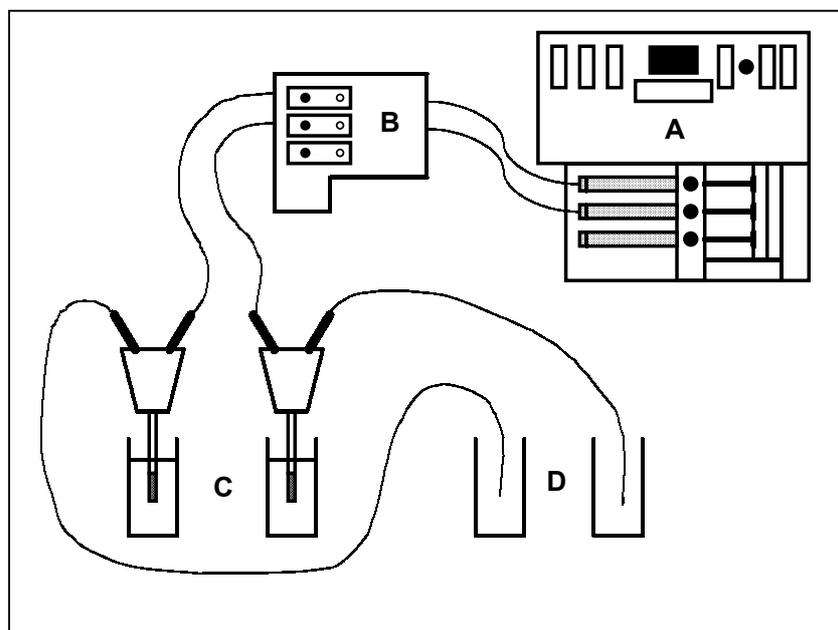
## 2.3 Versuchsaufbau

### 2.3.1 Versuchsbedingungen

Sämtliche Versuche wurden bei Raumtemperatur (19-21°C) durchgeführt.

### 2.3.2 Versuchsaufbau für die Bestimmung der in-vitro *recovery*

Sowohl für die Bestimmung der *relative recovery*, als auch der *relative loss recovery* wurde der in Abbildung 5 gezeigte Versuchsaufbau verwendet.



**Abb. 5:** A: Präzisionspritzenpumpe mit Perfusionslösungen; B: Umschalter; C: Mikrodialysesonden im Medium; D: Sammelgefäße für das Dialysat

#### 2.3.2.1 Ermittlung der *relative recovery* von Laktat

Zur Bestimmung der Diffusionseigenschaften der Membran in-vitro wurden die Mikrodialysesonden in Eppendorf Reaktionsgefäßen (EPPENDORF, Hamburg, Deutschland) mit 1 ml einer 10 mM Laktatkonzentration platziert und mittels Ringerlösung bei Geschwindigkeiten von 0,5; 1; 3; 5; und 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  perfundiert. Es wurden je zwei Proben mit einer Volumenmenge von 15  $\mu\text{l}$  gesammelt und sofort analysiert. Die erste Probe zu Beginn und nach jeder Flussgeschwindigkeitsänderung wurde verworfen.

### 2.3.2.2 Ermittlung der *relative loss recovery* von Koffein

Zur Bestimmung der *relative loss recovery* wurden die Sonden in Ringerlösung platziert und mit einer 40 mM Koffeinkonzentration bei Flussgeschwindigkeiten von 0,5; 1; 3; 5 und 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  perfundiert. Das gesammelte Dialysatvolumen betrug 15  $\mu\text{l}$ . Die erste Probe nach Versuchsbeginn, sowie nach jeder Perfusionsänderung wurde verworfen. Das mit Ringerlösung 1:1000 verdünnte Dialysat wurde spektrophotometrisch bei 273 nm gemessen.

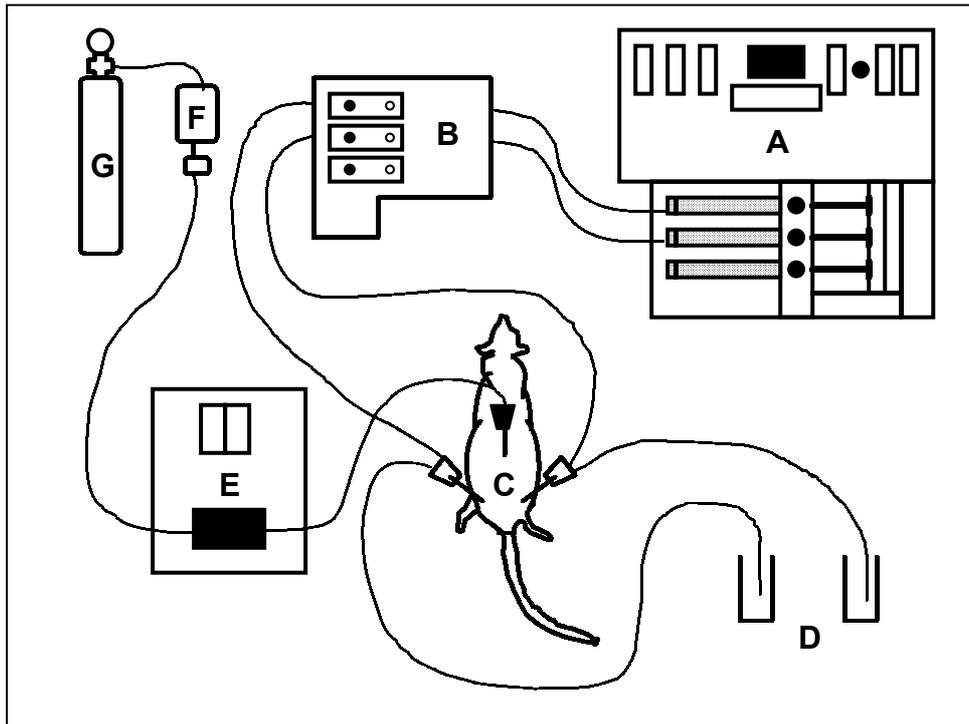
### 2.3.2.3 Ermittlung der *relative loss recovery* von Kalzium

Die in Ringerlösung platzierten Dialysesonden wurden bei Flussgeschwindigkeiten von 0,5; 1; 3; 5 und 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  mit einer 20 mM Kalziumlösung perfundiert. Die gesammelte Menge des Dialysats betrug 60  $\mu\text{l}$ . Die erste Messung zu Beginn und nach jeder Perfusionsänderung wurde verworfen. Bis zur flammenspektrometrischen Analyse durch das Zentrallabor der Universität Würzburg, wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:10 mit aqua ad injectabile verdünnt und bei 4°C gelagert.

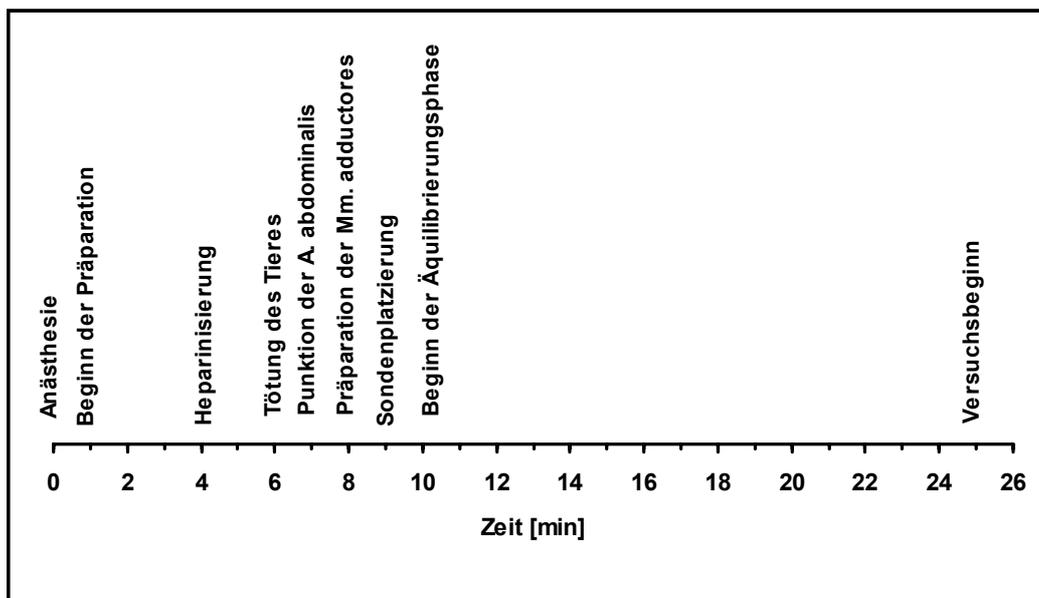
## 2.3.3 Isolierte Organperfusion des Skelettmuskels der Ratte

### 2.3.3.1 Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden unter Inhalationsanästhesie mit Isoflurane (Forene, ABBOTT GMBH, Wiesbaden, Deutschland) bei erhaltener Spontanatmung und Herz-Kreislauffunktion laparotomiert und nach Darstellung der abdominalen Gefäße unter stumpfer Präparation mit 500 U  $\text{l}^{-1}$  Heparin (Liquemin N 25.000, ROCHE, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) über die Vena renalis antikoaguliert. Im Anschluss wurden die Versuchstiere durch Entbluten aus der Vena renalis in tiefer Narkose getötet. Nun folgte die antegrade Kanülierung der Aorta abdominalis mittels eines 26 G Venenkatheters (BOC OHMEDA AB, Helsingborg, Schweden). Nach Fixierung des Katheters durch einen chirurgischen Faden 5/0 (PETERS, Bobigny, Frankreich) und Anschluss einer mit Carbogengas-oxygenierten (95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$ ) Infusionslösung, wurden beide Hinterläufe mit 30  $\text{ml h}^{-1}$  perfundiert. Nach beidseitiger Freilegung der Mm. adductores wurden die Beckenorgane, der Enddarm mit versorgenden Arterien, sowie der Dünndarm on bloc ligiert. Mit Hilfe einer 18 G Führungskanüle wurden die Mikrodialysesonden in der Adduktorengruppe beider Extremitäten, jeweils 1 cm medial der Femoralgefäße platziert. Die Zeitspanne von Anästhesie bis zur Sondenplatzierung betrug 9 - 10 min (Abbildung 6 und 7).



**Abb. 6:** A: Präzisionsspritzenpumpe; B: Umschalter; C: Versuchstier mit Mikrodialogsesonden in den Mm. adductores und Venenkatheter in der Aorta abdominalis; D: Sammelgefäße für das Dialysat; E: Infusionspumpe; F: Infusionslösung; G: Carbogenflasche (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>)



**Abb. 7:** Zeitlicher Ablauf der Tierpräparation

### 2.3.3.2 Basale Laktatkonzentrationen in beiden Hinterläufen

Zum Vergleich der Laktatkonzentration beider Extremitäten ohne Einfluss von Medikamenten wurde das Organpräparat mit carboxygener Ringerlösung perfundiert (n = 6). Je eine Mikrodialyse-sonde wurde in den Adduktorengruppen beidseits platziert und mit Ringerlösung perfundiert. Nach 15-minütiger Äquilibrationsphase wurden jeweils neun Proben im Abstand von 15 min, bei einer Versuchsdauer von 135 min, gesammelt.

### 2.3.3.3 Einfluss der Osmolarität des Mikrodialyse-Perfusats auf die Laktatkonzentration

Der Einfluss der Osmolarität des Perfusats auf die Laktatkonzentration im Dialysat wurde ebenfalls an 6 Organpräparaten untersucht. Nach Platzierung der Dialysesonden und 15-minütiger Äquilibration wurde ein beidseitiger Kontrollwert *ohne* Sorbitol erhoben. Im Anschluss wurden je acht Proben im Abstand von 15 min gesammelt, wobei die rechte hintere Extremität über die Mikrodialyse-sonde mit 80 mM Sorbitollösung und die Kontrollseite weiterhin mit Ringerlösung perfundiert wurde.

### 2.3.3.4 Einfluss von Kalzium im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration

Der Einfluss von 20 mM, 40 mM beziehungsweise 80 mM Kalzium/Ringerlösung auf die Laktatkonzentration im Dialysat wurde an 6 Präparaten untersucht. Nach Platzierung der Dialyse-sonde wurde die rechte hintere Extremität mit 20 mM, 40 mM beziehungsweise 80 mM Kalziumlösung und die linke hintere Extremität mit Ringerlösung perfundiert. Im Anschluss an die Äquilibrationsphase wurden je neun Dialysatproben gesammelt.

### 2.3.3.5 Einfluss von Koffein im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration

Um die Wirkung von Koffein (40 mM bzw. 80 mM) im Mikrodialyse-Perfusat zu untersuchen, wurden je sechs Versuchstiere präpariert und die Hinterläufe isoliert perfundiert. Nach Einbringen in die Adduktorengruppe wurden beide Mikrodialyse-sonden mit Ringerlösung perfundiert, 15 min lang äquilibriert und ein Kontrollwert *ohne* Koffein bestimmt. Im Anschluss wurde die rechte hintere Extremität mit 40 mM beziehungsweise 80 mM Koffeinlösung und die linke hintere Extremität weiterhin mit Ringerlösung perfundiert.

### 2.3.3.6 Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 0,25 $\mu\text{M}$ sowie 1 $\mu\text{M}$ Ryanodinlösung

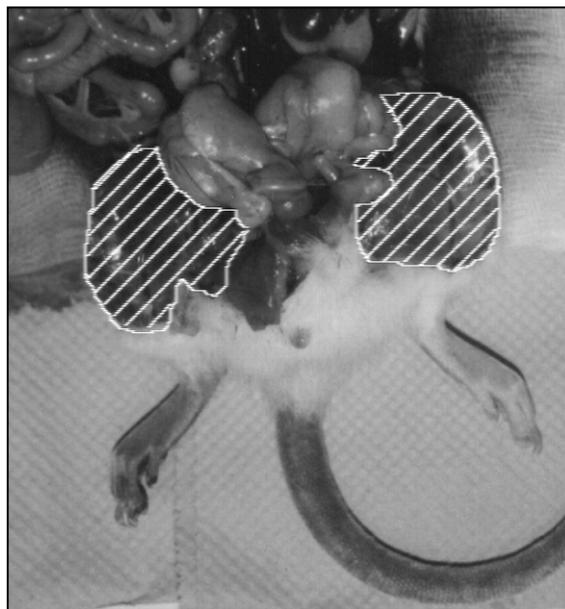
Der Ablauf entsprach der Versuchsreihe mit 40 mM Koffein mit dem Unterschied, dass für die systemische Organperfusion carboxygenierte 0,25  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 1  $\mu\text{M}$  Ryanodinlösung verwendet wurde.

### 2.3.3.7 Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 1 $\mu\text{M}$ Dantrolenlösung

Der Ablauf entsprach der Versuchsreihe mit 40 mM Koffein mit dem Unterschied, dass für die systemische Organperfusion 1  $\mu\text{M}$  Dantrolenlösung verwendet wurde.

### 2.3.3.8 Perfusionskontrolle

Am Versuchsende wurde die seitengleiche und homogene Perfusion des Organpräparates durch Applikation von 1 ml Methylenblau (NEOPHARMA, Aschau im Chiemgau, Deutschland) in die Aorta abdominalis kontrolliert (Abbildung 8). Bei fehlender seitengleicher Verfärbung des Muskelgewebes wurden die Versuchsergebnisse wegen des Verdachts einer Organperfuionsstörung verworfen.



**Abb. 8:** Der schraffierte Bereich zeigt schematisch die gleichmäßige Perfusion der Extremitäten nach Gabe von 1 ml Methylenblau.

## 2.4 Probenanalyse

10 µl des frischen Dialysats wurden zu 1000 µl Laktatreagenz pipettiert, vermischt und in Dunkelheit für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Laktat wurde spektrophotometrisch bei 540 nm gemessen.

## 2.5 Histologische Untersuchung der Muskelpräparate

Um Auswirkungen der Sondenimplantation und der applizierten Substanzen auf das Muskelgewebe zu untersuchen, wurden von untersuchtem Gewebe histologische Präparate mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt (Institut für Pathologie).

## 2.6 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mittels EXCEL 2000, SPSS 9.0.1 sowie alternativ mittels SAS VERSION 8 durchgeführt.

Die Daten sind angegeben als Mittelwert (M) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Aufgrund der geringen Streuung werden die Messungen der *recovery* als Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) dargestellt. Verwendet wurde der *Shapiro-Wilk-Test* zum Nachweis der Normalverteilung, der *Mann-Whitney-U-Test* mit Bonferroni-Korrektur zur Bestätigung von Verschiedenheiten der Gruppen zum jeweiligen Messzeitpunkt, sowie die Multivarianzanalyse nach *Puri & Sen*.

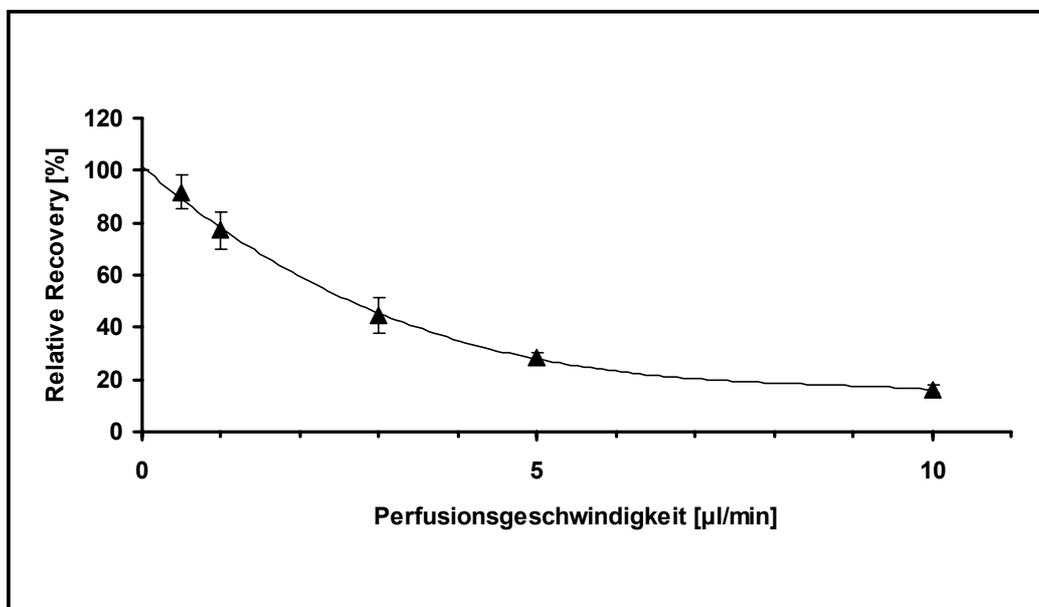
Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Bestimmung der *relative recovery* und der *relative loss recovery*

##### 3.1.1 Bestimmung der *relative recovery* von Laktat in-vitro

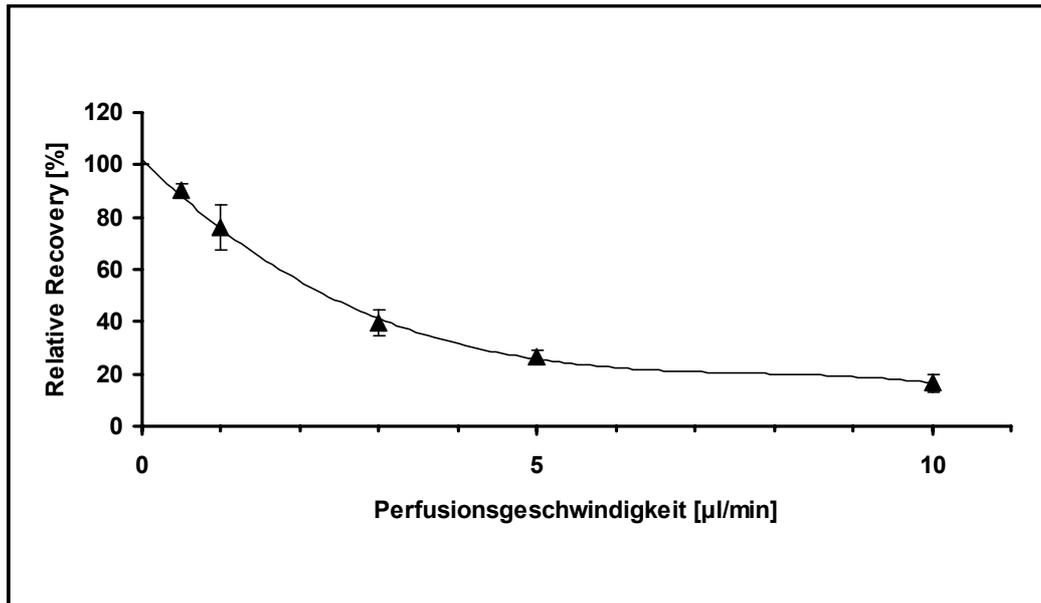
Für eine vorgegebene Laktatkonzentration wurde die *relative recovery* der Mikrodialysesonden in-vitro bestimmt. Die verwendeten Perfusionsgeschwindigkeiten von 0,5; 1 ;3; 5 und 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  korrelierten negativ mit der *relative recovery*. Die *relative recovery* erreichte bei 0,5  $\mu\text{l min}^{-1}$   $92 \pm 6\%$  und fiel bei 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  auf  $16 \pm 2\%$  ab. Bei einer Perfusion mit 1  $\mu\text{l min}^{-1}$  wurde eine *relative recovery* von  $77 \pm 7\%$  ermittelt (Abbildung 9).



**Abb. 9:** Recovery von Laktat über die Membran einer CMA/20 Mikrodialysesonde bei verschiedenen Perfusionsgeschwindigkeiten;  $M \pm SD$ ;  $n = 12$ .

##### 3.1.2 Bestimmung der *relative loss recovery* von Koffein in-vitro

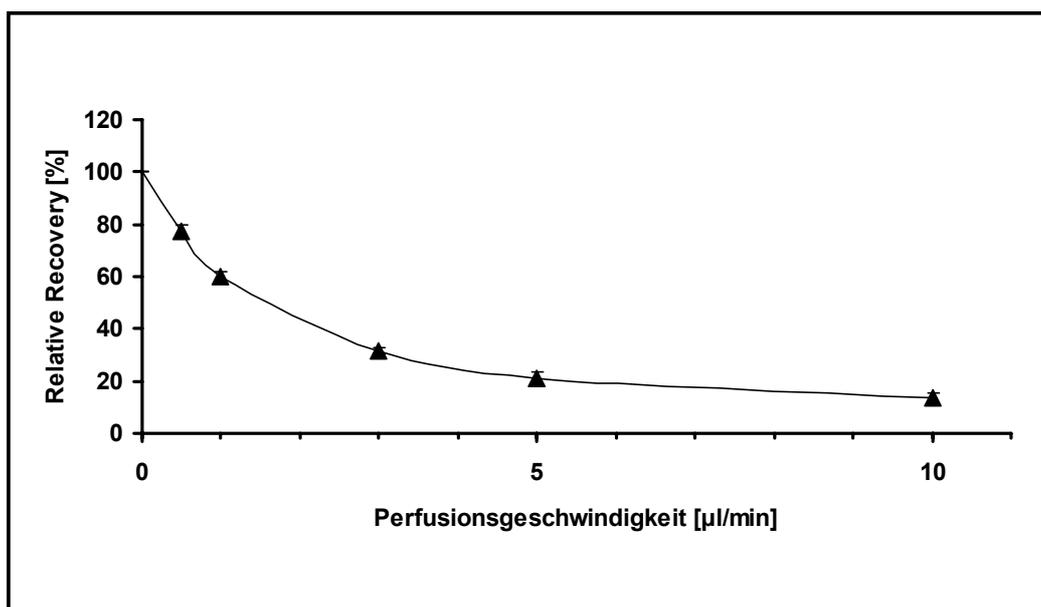
Für die Bestimmung der in-vitro *relative loss recovery* von Koffein, wurden die Sonden mit einer bekannten Koffeinkonzentration perfundiert. Bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 0,5  $\mu\text{l min}^{-1}$  wurde eine *relative loss recovery* von  $90 \pm 2\%$  ermittelt, die bei 10  $\mu\text{l min}^{-1}$  auf  $17 \pm 4\%$  abfiel. Für 1  $\mu\text{l min}^{-1}$  Fluss betrug die *relative loss recovery*  $76 \pm 8\%$  (Abbildung 10).



**Abb. 10:** Relative loss recovery von Koffein über die Membran einer CMA/20 Mikrodialysesonde bei verschiedenen Perfusionsgeschwindigkeiten;  $M \pm SD$ ;  $n = 10$ .

### 3.1.3 Bestimmung der *relative loss recovery* von Kalzium in-vitro

Die Mikrodialysesonden wurden mit einer bekannten Kalziumkonzentration perfundiert. Die ermittelten Werte lagen zwischen  $77 \pm 2\%$  bei  $0,5 \mu\text{l min}^{-1}$  und  $13 \pm 2\%$  bei  $10 \mu\text{l min}^{-1}$ . Für eine Perfusion von  $1 \mu\text{l min}^{-1}$  betrug die *relative loss recovery* von Kalzium  $60 \pm 2\%$  (Abbildung 11).

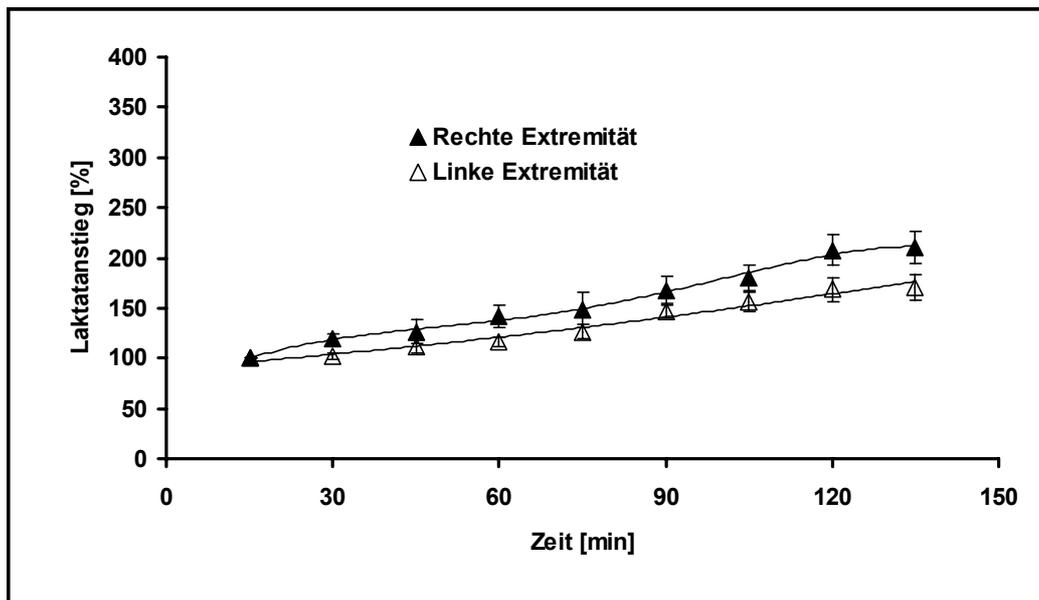


**Abb. 11:** Relative loss recovery von Kalzium über die Membran einer CMA/20 Mikrodialysesonde bei verschiedenen Perfusionsgeschwindigkeiten  $M \pm SD$ ;  $n = 4$ .

## 3.2 Ergebnisse der isolierten Organperfusion

### 3.2.1 Basale Laktatkonzentrationen in beiden Hinterläufen

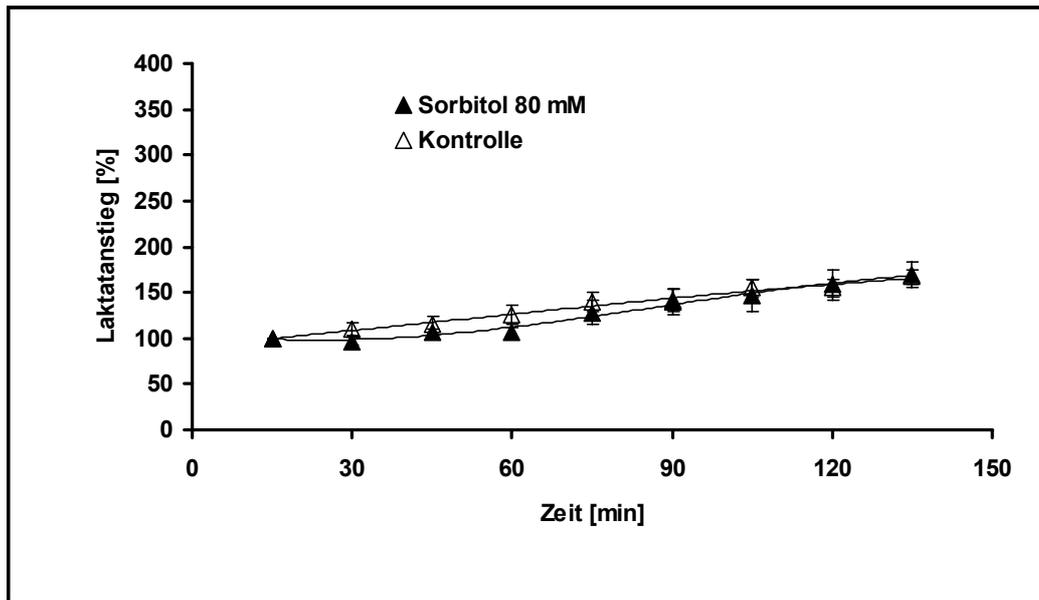
Nach Platzierung und Äquilibration der Sonde in beiden Adduktorengruppen wurde eine Laktatkonzentration von  $1,25 \pm 0,22$  und  $1,56 \pm 0,15$  mM gemessen. Unter Ringerperfusion stieg die lokale Laktatkonzentration bis auf  $210 \pm 16\%$  in der rechten hinteren Extremität beziehungsweise auf  $171 \pm 13\%$  in der linken hinteren Extremität (Abbildung 12).



**Abb. 12:** Intramuskulärer Laktatanstieg unter isolierter Organperfusion mit Ringerlösung;  $M \pm SEM$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$  für (\*) rechte vs. linke Extremität.

### 3.2.2 Einfluss der Osmolarität des Mikrodialyse-Perfusats auf die Laktatkonzentration

Die Laktatausgangswerte betragen  $1,13 \pm 0,21$  und  $1,27 \pm 0,02$  mM. Unter Perfusion der Mikrodialysesonde mit 80 mM Sorbitol stieg die Laktatkonzentration auf  $170 \pm 14\%$  verglichen mit  $167 \pm 7\%$  für die Kontrollgruppe der kontralateralen Extremität (Abbildung 13).



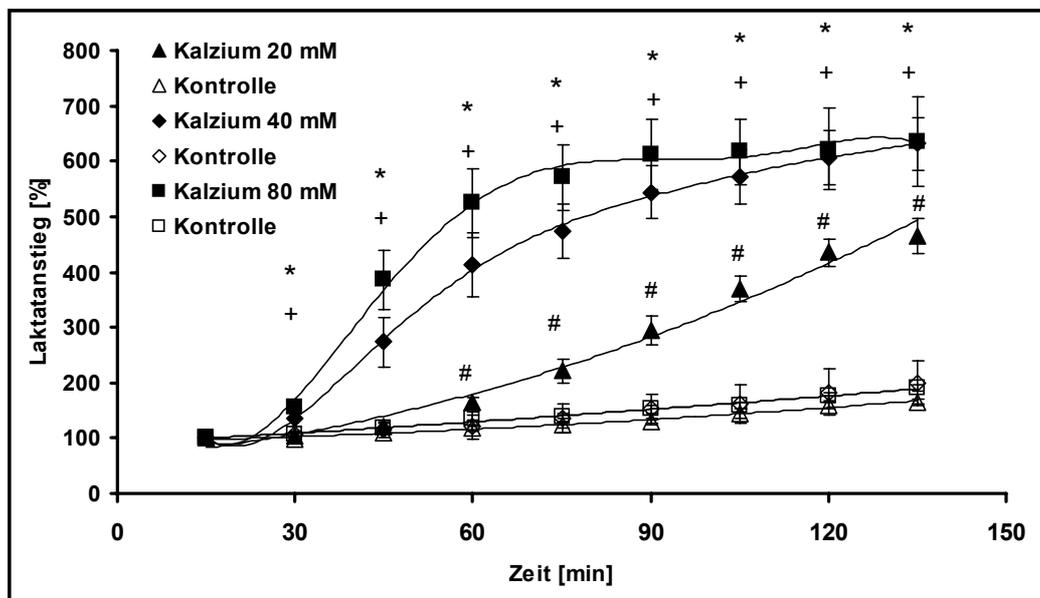
**Abb. 13:** Intramuskulärer Laktatanstieg mit und ohne Sorbitolzusatz im Perfusat;  $M \pm SEM$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$  für (\*) Sorbitolgruppe vs. Kontrolle.

### 3.2.3 Einfluss von Kalzium im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration

Die Laktatwerte zu Beginn betragen  $1,62 \pm 0,15$  und  $1,84 \pm 0,15$  mM. Unter Perfusion der Sonde mit 20 mM Kalzium stieg die lokale Laktatkonzentration signifikant auf  $466 \pm 31\%$  im Vergleich zu  $165 \pm 6\%$  für die Kontrollgruppe.

Bei den Experimenten mit 40 mM Kalzium wurden Laktatausgangswerte von  $1,84 \pm 0,18$  und  $2,04 \pm 0,15$  mM gemessen. Die Laktatkonzentration stieg signifikant auf  $632 \pm 48\%$  für die Kalziumgruppe gegenüber  $201 \pm 38\%$  für die Kontrolle.

Für die Versuche mit 80 mM Kalzium lagen die Ausgangswerte von Laktat bei  $1,34 \pm 0,14$  und  $1,63 \pm 0,14$  mM und die Laktatkonzentration stieg unter Stimulation mit Kalzium signifikant auf  $635 \pm 81\%$  im Gegensatz zu  $191 \pm 5\%$  für die Kontrollmessungen (Abbildung 14).

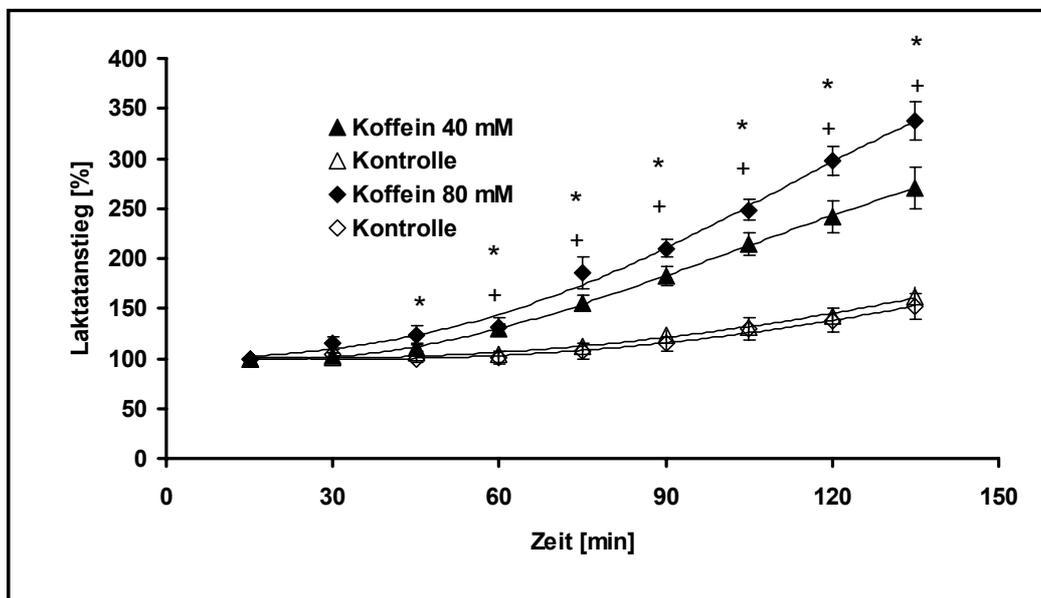


**Abb. 14:** Intramuskulärer Laktatanstieg unter Stimulation mit 20 mM, 40 mM und 80 mM Kalzium sowie ohne Kalziumstimulation;  $M \pm SEM$ ;  $n = 6$  pro Gruppe;  $p < 0,05$  für (#) Kalzium 20 mM vs. Kontrolle; (+) Kalzium 40 mM vs. Kontrolle; (\*) Kalzium 80 mM vs. Kontrolle.

### 3.2.4 Einfluss von Koffein im Mikrodialyse-Perfusat auf die Laktatkonzentration

Für die Versuchsreihe mit 40 mM Koffein lagen die Laktatausgangswerte bei  $1,28 \pm 0,16$  und  $1,73 \pm 0,19$  mM. Unter Stimulation mit 40 mM Koffein stieg die Laktatkonzentration signifikant auf  $270 \pm 21\%$  im Vergleich zu  $182 \pm 9\%$  für die Kontrollgruppe.

Bei einer weiteren Testreihe mit 80 mM Koffein wurden Ausgangswerte von  $1,39 \pm 0,15$  und  $2,07 \pm 0,11$  mM ermittelt. In der Stimulansgruppe stieg die lokale Laktatkonzentration signifikant auf  $337 \pm 19\%$  gegenüber  $152 \pm 13\%$  für die Kontrolle (Abbildung 15).

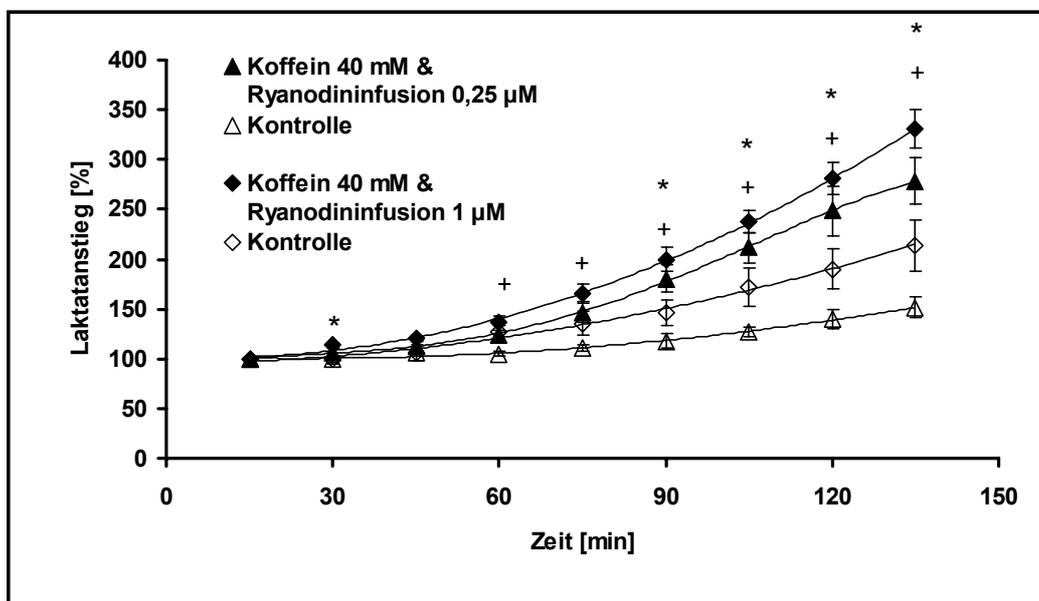


**Abb. 15:** Intramuskulärer Laktatanstieg unter Stimulation mit 40 mM und 80 mM Koffein sowie ohne Koffeinstimulation;  $M \pm SEM$ ;  $n = 6$  pro Gruppe;  $p < 0,05$  für (+) Koffein 40 mM vs. Kontrolle; (\*) Koffein 80 mM vs. Kontrolle.

### 3.2.5 Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 0,25 $\mu\text{M}$ sowie 1 $\mu\text{M}$ Ryanodinlösung

Unter isolierter Organperfusion mit 0,25  $\mu\text{M}$  Ryanodinlösung äquilibrierten sich die Laktatausgangswerte bei  $1,32 \pm 0,16$  und  $2,25 \pm 0,14$  mM. Nach Perfusion der Mikrodialysesonde mit 40 mM Koffein stieg die lokale Laktatkonzentration signifikant auf  $279 \pm 23\%$  gegenüber  $151 \pm 11\%$  in der Kontrollgruppe.

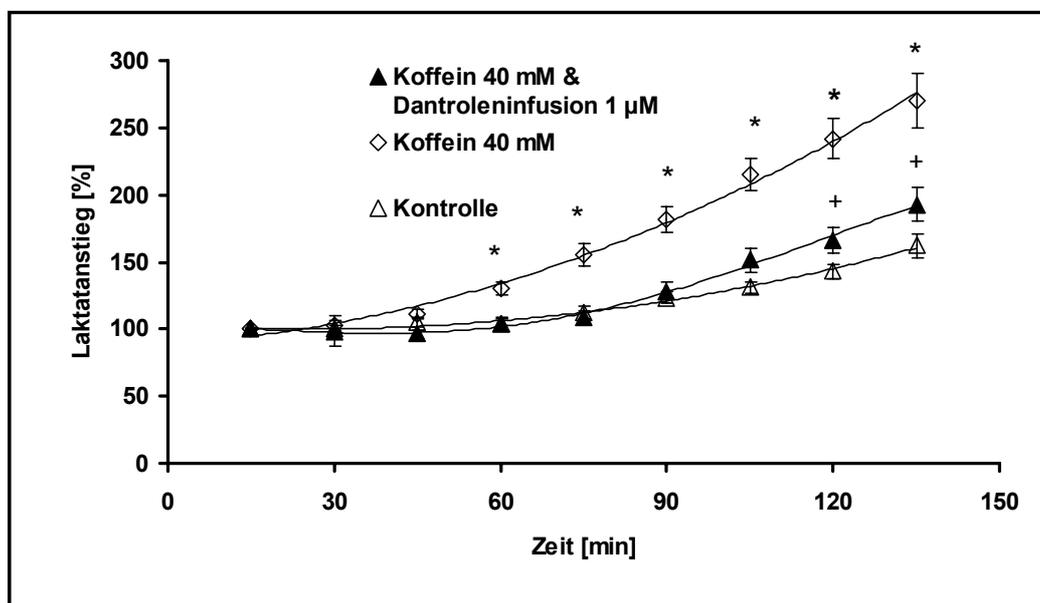
Bei Perfusion des Skelettmuskelpräparates mit 1  $\mu\text{M}$  Ryanodinlösung wurden Laktatwerte von  $1,46 \pm 0,13$  und  $1,84 \pm 0,30$  mM gemessen. Durch Stimulation mit 40 mM Koffein konnte die Laktatkonzentration signifikant auf  $331 \pm 19\%$  im Vergleich zu  $214 \pm 26\%$  für die Kontrollreihe gesteigert werden (Abbildung 16).



**Abb. 16:** Intramuskulärer Laktatanstieg unter Stimulation mit 40 mM Koffein und Organperfusion mit 0,25  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 1  $\mu\text{M}$  Ryanodinlösung sowie ohne Koffeinstimulation;  $M \pm \text{SEM}$ ;  $n = 6$  pro Gruppe;  $p < 0,05$  für (+) Koffein & Ryanodin 0,25  $\mu\text{M}$  vs. Kontrolle; (\*) Koffein & Ryanodin 1  $\mu\text{M}$  vs. Kontrolle.

### 3.2.6 Lokale Koffeinstimulation und gleichzeitige Organperfusion mit 1 $\mu$ M Dantrolenlösung

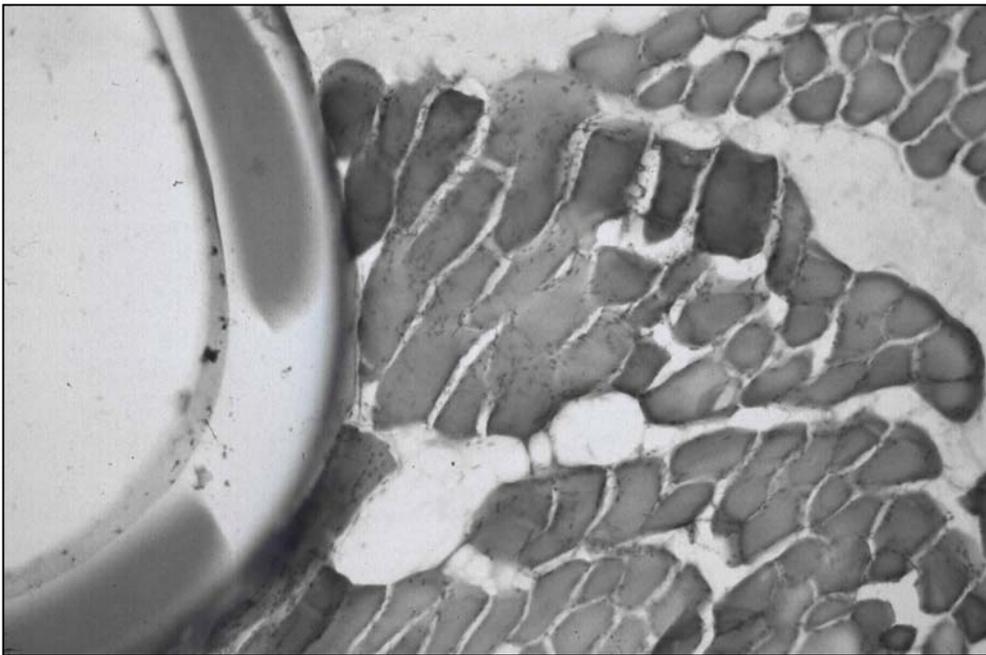
Für die Versuchsreihe unter isolierter Organperfusion mit 1  $\mu$ M Dantrolenlösung wurde ein Laktatausgangswert von  $1,05 \pm 0,19$  mM gemessen. Nach Stimulation mit 40 mM Koffein stieg die lokale Laktatkonzentration auf  $193 \pm 13\%$  an. Zum Vergleich lagen die Laktatwerte der Kontrollgruppen mit beziehungsweise ohne Koffeinstimulation unter Organperfusion mit Ringerlösung bei  $1,28 \pm 0,16$  mM sowie  $1,73 \pm 0,19$  mM und stiegen bis zum Versuche auf  $270 \pm 21\%$  beziehungsweise  $162 \pm 9\%$  (Abbildung 17).



**Abb. 17:** Intramuskulärer Laktatanstieg unter Stimulation mit 40 mM Koffein und Organperfusion mit 1  $\mu$ M Dantrolenlösung sowie unter Stimulation mit 40 mM Koffein und Organperfusion mit Ringerlösung;  $M \pm SEM$ ;  $n = 6$  pro Gruppe;  $p < 0,05$  für (+) 40 mM Koffein und Organperfusion mit 1  $\mu$ M Dantrolenlösung vs. Kontrollgruppe unter Organperfusion mit Ringerlösung; (\*) 40 mM Koffein und Organperfusion mit 1  $\mu$ M Dantrolenlösung vs. 40 mM Koffein und Organperfusion mit Ringerlösung.

### 3.3 Histologische Untersuchung der Muskelpräparate

In den histologischen Untersuchungen von drei Muskelpräparaten nach isolierter Perfusion und Koffein-Applikation per Mikrodialyse ergaben sich bis auf dezente interstitielle Ödeme keine Hinweise auf eine Schädigung des Muskelgewebes durch die Platzierung der Mikrodialysesonden beziehungsweise durch die Applikation der verwendeten Substanzen (Abbildung 18).



**Abb. 18:** Muskelgewebe mit angeschnittener Führungskanüle (links). Färbung: Hämatoxylin-Eosin

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass (a) mittels der minimal-invasiven Mikrodialysetechnik lokale Laktatmessungen im Skelettmuskel der Ratte möglich sind, (b) eine wesentliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Osmolarität der Perfusionslösungen beziehungsweise durch die Implantation der Sonden ausgeschlossen werden kann, (c) die intramuskuläre Laktatkonzentration durch lokale Applikation von Koffein und Kalzium mit Hilfe einer Mikrodialysesonde sowie (d) durch systemische Organperfusion mit Ryanodinlösung gesteigert wird, während die systemische Dantroleninfusion den koffeininduzierten Laktatanstieg hemmt.

Die Substanzkonzentration im Dialysat ist abhängig von der Stoffmenge im Gewebe sowie von der Fläche und dem Material der gewählten Mikrodialysemembran (21). Der Konzentrationsunterschied zwischen Gewebe und Perfusat ist die treibende Kraft für die Diffusion über die Mikrodialysemembran. Je größer die Austauschfläche der Sonde ist, umso höher liegt die *recovery*. Allerdings führen sehr lange Membranen zu einem Verlust von Perfusatflüssigkeit bedingt durch nichtpermeable Proteine, die einen osmotischen Gradienten aufbauen. Ebenso begrenzt die Porengröße der Membran die Substanzdiffusion in das Perfusat. Vergleiche von unterschiedlichen Membranmaterialien ergaben bei identischen Substanzkonzentrationen Differenzen in der *recovery* (32). Die verwendeten CMA/20 Sonden wurden bei früheren Untersuchungen des Laktatstoffwechsels im Skelettmuskel von Ratten und Menschen verwendet, wobei eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Membranmaterial nicht beobachtet wurde (33).

Um einer Veränderung des perimembranären Interstitiums, verursacht durch die Zusammensetzung des Perfusats, entgegen zu wirken, sollte dieses in Bezug auf Ionen-Zusammensetzung und Osmolarität möglichst der Extrazellulärflüssigkeit entsprechen. In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Substanzen in Ringer gelöst. Obwohl dies in früheren Untersuchungen keinen Einfluss auf das interstitielle Milieu gezeigt hat, kann eine Veränderung der interstitiellen Ionen-Zusammensetzung und des pH-Wertes unmittelbar an der Mikrodialysemembran und damit einhergehend ein Einfluss auf die Laktatkonzentration nicht völlig ausgeschlossen werden (34).

Die Wahl einer optimalen Perfusionsgeschwindigkeit ist ausschlaggebend, um zuverlässige Messergebnisse zu erhalten. Niedrige Flussgeschwindigkeiten erhöhen die *relative recovery*, weil mehr Zeit für die Diffusion zur Verfügung steht. Nachteilig erweist sich aber die geringe absolute Menge des gewonnenen Dialysats, die eine Bestimmung mit hochempfindlichen Methoden, z. B. UV-Spektrometrie, HPL-Chromatographie oder Massenspektrometrie, notwendig macht. Ein hoher

Perfusionsfluss vergrößert die Menge des gewonnen Volumens, verringert aber die Substanzkonzentration im Dialysat. Ebenso üben hohe Flussraten einen hydrostatischen Druck an der Mikrodialysemembran aus, der zur Ultrafiltration von Flüssigkeit mit Perfusatverlust in das Interstitium führt (20). Bei Flussgeschwindigkeiten bis  $10 \mu\text{l min}^{-1}$  wurden weniger als 0,1% des Perfusativolumens in das Interstitium filtriert (25). Somit kann in der vorliegenden Arbeit bei einem Fluss von  $1 \mu\text{l min}^{-1}$  ein wesentlicher Filtrationseffekt ausgeschlossen werden.

Bereits in früheren Untersuchungen wurden exogene Substanzen über die Mikrodialysemembran appliziert und die ausgelösten Stoffwechseländerungen im Dialysat untersucht (20). Dies wird möglich, weil Substanzen sowohl aus dem Perfusat heraus, wie auch aus dem Extrazellulärraum in das Perfusat diffundieren können (35). Um die Diffusionseigenschaften und damit die Membranqualität der Mikrodialysesonden zu überprüfen, wurde zu Beginn und nach jeder Versuchsreihe die *relative recovery* von Laktat in-vitro bestimmt (23). Die in-vitro *recovery* Werte in der vorliegenden Untersuchung entsprechen weitgehend den Messergebnissen früherer Publikationen (33). Allerdings lässt die in-vitro *recovery* nur bedingt Rückschlüsse auf die in-vivo Substanzkonzentration im Interstitium zu, weil Zellmembranen die Diffusion vor allem hydrophiler Stoffe beeinträchtigen und der für den Massentransport relevante Extrazellulärraum nur einen Teil des Gewebevolument darstellt (36). In dieser Arbeit wurde keine Sondenkalibrierung in-vivo durchgeführt, da aufgrund des Versuchsaufbaus kein physiologisch stabiles Gleichgewicht in der Muskulatur erreicht wurde und daher die Laktatkonzentration im Verlauf zwar gering aber stetig anstieg. Bei vergleichbaren absoluten Ausgangswerten der beiden Extremitäten unter Ringerperfusion, wurden in Anlehnung an ARNER ET AL. nur die relativen Veränderungen bewertet (37). Um absolute Laktatkonzentrationen zu bestimmen, hätte die Anwendung eines internen Standards im Perfusat eine Alternative dargestellt, da diese Methode keine „*steady-state*“-Bedingungen im Gewebe voraussetzt und Veränderungen im Extrazellulärraum unmittelbar nachweist (21).

Untersuchungen von Anästhetikawirkungen auf den Stoffwechsel der Skelettmuskulatur von Ratten zeigen für das in unserer Arbeit verwendete Anästhetikum Isofluran nur geringe Veränderungen des Laktatstoffwechsels. Noch geringere Effekte sind nur unter Enfluran oder intraperitonealer Ketamininjektion beschrieben (38). Die Beeinflussung durch das verwendete Anästhetikum scheint vernachlässigbar klein zu sein. Ein Einfluß auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist daher unwahrscheinlich.

Bereits nach 5-minütiger Ischämiezeit kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Laktatkonzentration im Muskelgewebe (39). Um das Risiko einer emboliebedingten

Perfusionsstörung und eines damit verbundenen Laktatanstieges im Skelettmuskel zu vermeiden, wurden die Versuchstiere vor dem Exitus über die Vena renalis heparinisiert. Obwohl minimal-invasiv, so kommt es auch bei der Mikrodialyse durch die Sondenplatzierung zu einem umschriebenen Gewebetrauma. Inwieweit sich die Gewebeverletzung auf die Messungen auswirkt, wird für die einzelnen Organe unterschiedlich diskutiert. Untersuchungen am Skelettmuskel belegen, dass 15 min nach Sondenplatzierung stabile Ergebnisse erzielt werden (26) während zuverlässige Messungen im Gehirngewebe erst am zweiten Tag nach Implantation der Mikrodialysesonden erreicht wurden (20). In der vorliegenden Arbeit wurde eine 15-minütige Äquilibrationszeit gewählt, da das von uns gewählte Tiermodell nur eine Annäherung an die physiologischen Bedingungen darstellt. Eine wesentliche Schädigung des Muskelgewebes durch die Implantation der Sonden konnten wir in histologischen Schnitte ausschließen. Nur vereinzelt wurden interstitielle Ödeme im untersuchten Gewebe nachgewiesen.

Um anfallende Metabolite in der Skelettmuskulatur zu entfernen, wurden die hinteren Extremitäten über einen Katheter in der Aorta abdominalis mit Ringer, Dantrolen/Ringer beziehungsweise Ryanodin/Ringer perfundiert. Wir nahmen an, dass ein Teil der entstehenden Stoffwechselprodukte durch die Perfusion abtransportiert wird. In früheren Publikationen konnte mittels der Ethanol-Technik nachgewiesen werden, dass sich sowohl bei vermindertem, wie auch bei vermehrtem Blutfluss die Laktatwerte in der Muskulatur nur minimal ändern (40). Trotz isolierter Organperfusion kam es in unserer Untersuchung auch in der Kontrollgruppe zu einem kontinuierlichen Laktatanstieg über die Versuchszeit. Wir folgerten daraus, dass sich durch die unphysiologische Perfusion mit Ringerlösung in Abwesenheit von Sauerstoffträgern eine Laktatazidose entwickelte. Für unsere Arbeit hatte dies zwei Konsequenzen: Die Versuchszeit war durch den allmählichen Laktatanstieg zeitlich begrenzt und machte eine Kontrollmessung in der kontralateralen Extremität notwendig, um intrinsische und extrinsische Effekte durch das applizierte Pharmakon trennen zu können beziehungsweise um Perfusionsstörungen im Muskelpräparat zu erkennen. Durch die Perfusion mit einer raumtemperierten Infusionslösung (19-20°C) glich sich die Temperatur im untersuchten Organpräparat rasch an die Umgebungstemperatur an. Der Vergleich der Laktatplasmaspiegel von anästhesierten Ratten während akuter Hypothermie (30°C und 20°C) zeigt für beide Gruppen nur einen geringen Anstieg (41). Folglich dürfte die Auswirkung der Hypothermie auf die Messergebnisse vernachlässigbar gering sein.

Um eine Beeinflussung des Laktatanstieges durch die Osmolarität der applizierten Lösungen auszuschließen wurde eine Mikrodialysesonde mit 80 mM Sorbitollösung

und die Kontrollseite mit Ringerlösung perfundiert. Dieses Vorgehen geht auf BONEN ET AL. zurück, die belegen konnten, dass Sorbitol die Laktatkonzentration im Skelettmuskel nicht erhöht (42). Die gemessenen relativen Laktatveränderungen zeigen im Vergleich keine signifikanten Unterschiede. Wir schlussfolgerten, dass die Laktatkonzentration nicht wesentlich durch die Osmolarität der verwendeten Lösungen beeinflusst wird.

Unter physiologischen Bedingungen führt ein Nervenimpuls zur Acetylcholin-Freisetzung an der motorischen Endplatte und zur Entstehung von Endplattenpotentialen. Viele Miniatur-Endplattenpotentiale lösen schließlich das Muskelmembranpotential aus, welches fortgeleitet in den transversen Tubuli zu einer Konformationsänderung am sarkolemmalen Dihydropyridin-Rezeptor und dadurch zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodin-Rezeptor in das Zytosol führt. Steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf 10  $\mu\text{M}$  an, so kontrahiert sich der Muskel (43). Darüber hinaus steigern Kalziumionen die Glykolyse durch direkte Aktivierung der Phosphorylasekinase, die Glukose und ATP in Glukose-6-phosphat, ADP sowie  $\text{H}^+$  umwandelt. Im Verlauf kommt es unter anaeroben Verhältnissen zu einem vermehrten Anfall von Laktat. Bei maligne Hyperthermie veranlagten Patienten können Triggersubstanzen zu einem massiven Anstieg der zytosolären Kalziumkonzentration über den Ryanodin-Rezeptor führen. Der intrazelluläre Botenstoff Kalzium aktiviert sodann die Myosin-Aktin-Filamente, erhöht über eine Stoffwechselsteigerung den  $\text{O}_2$ -Verbrauch und die  $\text{CO}_2$ -Produktion mit der Folge einer Laktatazidose, und führt schließlich zu Rhabdomyolyse und Zelluntergang (16). In der vorliegenden Untersuchung wurden diese pathophysiologischen Abläufe durch die exogene Applikation hochkonzentrierter Kalziumlösungen induziert und zum Nachweis der Auswirkung auf den zellulären Stoffwechsel die Laktatkonzentrationen gemessen. Die verwendeten Kalziumlösungen führten zu deutlichen Laktatanstiegen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Wir schlossen daraus, dass durch die lokale Applikation von Kalzium über eine Mikrodialysesonde der intrazelluläre Metabolismus moduliert werden kann. Unklar bleibt, wie hoch die Konzentration der perfundierten Triggersubstanz im Interstitium des Muskels ist. Trotz der signifikanten Laktatanstiege ist eine Verdünnung durch die extrazelluläre Flüssigkeit im sondenumgebenden Muskelgewebe wahrscheinlich.

Koffein führt durch Interaktion am Ryanodin-Rezeptor zur Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (44). Dieser Wirkungsmechanismus wird für die Diagnostik der malignen Hyperthermie Veranlagung im in-vitro-Kontraktur-Test ausgenutzt. Durch die lokale Applikation von 40 mM beziehungsweise 80 mM Koffeinlösung kam es zu signifikanten Laktatanstiegen gegenüber den

Kontrollgruppen, die aber im Vergleich zu den Kalziumgruppen schwächer ausfielen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Koffein erst nach der Diffusion in die Zelle und Bindung am Ryanodin-Rezeptor Kalzium als „second-messenger“ freisetzt, während nach Gabe der Kalziumlösungen der Muskelmetabolismus wahrscheinlich unmittelbar moduliert wird.

In Anwesenheit von Ryanodin wurde für den Ryanodin-Rezeptor eine verlängerte Öffnungszeit mit verstärkter Kalzium-Freisetzung beschrieben (45). Wir konnten zeigen, dass bei konstanter lokaler Koffeinperfusion die Laktatkonzentration abhängig von der Konzentration der Ryanodinlösung zusätzlich gesteigert werden kann. Dies legt nahe, dass beide Wirkstoffe agonistisch die Kalzium-Freisetzung beeinflussen.

Das Hydantoinderivat Dantrolen verringert die zytosoläre Kalziumkonzentration durch Hemmung der Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, ohne die Wiederaufnahme von Kalzium in die intrazellulären Speicher zu beeinflussen. Dieser Wirkmechanismus wird durch eine Inhibierung der Signaltransduktion des Dihydropyridin-Rezeptors beziehungsweise durch eine spezifische Dantrolenbindungsstelle am Ryanodin-Rezeptor vermittelt (19). In der vorliegenden Arbeit konnte der koffeininduzierte Laktatanstieg durch die systemische Applikation von 1  $\mu$ M Dantrolen inhibiert werden. Wir folgern daraus, dass Dantrolen die pharmakologische Wirkung von Koffein antagonisiert.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Untersuchungen nach, dass mit Hilfe der Mikrodialysetechnik lokale Laktatmessungen in der Skelettmuskulatur möglich sind. Durch die Sondenplatzierung beziehungsweise durch die Applikation der Substanzen kommt es zu keinen wesentlichen Schädigungen des Muskelgewebes. Die Versuchsdauer ist aufgrund der sich entwickelnden Laktatazidose zeitlich begrenzt. Eine erhöhte Osmolarität der Perfusionslösung beeinflusst die Laktatkonzentration nicht. Die lokale intramuskuläre Laktatkonzentration kann durch Applikation von Kalzium-beziehungsweise Koffeinlösungen über eine Mikrodialysesonde gesteigert werden. Durch die systemische Perfusion von Ryanodin kann die lokale intramuskuläre Laktatkonzentration gesteigert werden, während die systemische Applikation von Dantrolen einem koffeininduzierten Laktatanstieg entgegenwirkt. Aufgrund der Modulierbarkeit des lokalen intramuskulären Stoffwechsels scheint die Technik der Mikrodialyse für minimal-invasive Untersuchungen zur Diagnostik der maligne Hyperthermie Veranlagung gut geeignet zu sein.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die maligne Hyperthermie ist eine metabolische Muskelerkrankung, die durch eine unkontrollierte Kalzium-Freisetzung in das Zytosol der Muskelzelle zu einer Aktivierung des kontraktiven Apparates und zu einer Beschleunigung des Zellstoffwechsels führen kann. Der in-vitro-Kontraktur-Test am Skelettmuskel ist zur Zeit das einzige zuverlässige Verfahren zur Erkennung einer MH-Veranlagung.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden inwieweit die lokale Laktatkonzentration durch die Applikation von Kalzium und Koffein mit Hilfe einer Mikrodialysesonde beziehungsweise durch die systemische Infusion von Ryanodin und Dantrolen beeinflusst wird.

Mit Tierschutz-Genehmigung wurden 61 Sprague-Dawley Ratten anästhesiert und post exitum über die Aorta die Hinterbeine mit Ringer-, Ryanodin- (0,25  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) oder Dantrolenlösung (1  $\mu$ M) perfundiert (30 ml h<sup>-1</sup>, 19-20°C). Über Mikrodialysesonden (1  $\mu$ l min<sup>-1</sup>) in den Mm. adductores wurde Ringer, Sorbitol (80 mM), Kalzium (20 mM, 40 mM, 80 mM) oder Koffein (40 mM, 80 mM) appliziert und im Dialysat Laktat spektrometrisch gemessen.

Bei einer *relativen recovery* von  $77 \pm 2\%$  für Laktat in-vitro stieg die Laktatkonzentration unter Perfusion mit 20 mM, 40 mM beziehungsweise 80 mM Kalziumlösung auf  $466 \pm 31\%$ ,  $632 \pm 48\%$  beziehungsweise  $635 \pm 81\%$ , während unter Perfusion mit 40 mM und 80 mM Koffein eine relative Zunahme auf  $270 \pm 21\%$  und  $377 \pm 21\%$  beobachtet wurde. Unter systemischer Organperfusion mit 0,25  $\mu$ M und 1  $\mu$ M Ryanodinlösung und lokaler Applikation von 40 mM Koffein wurden relative Laktatanstiege von  $279 \pm 23\%$  und  $331 \pm 19\%$  gemessen. Dagegen stieg die relative Laktatkonzentration bei systemischer Infusion von 1  $\mu$ M Dantrolenlösung und lokaler Perfusion mit 40 mM Koffein nur bis auf  $193 \pm 13\%$  an.

Diese methodische Untersuchung beweist, dass durch die lokale Perfusion von Kalzium und Koffein sowie die systemische Infusion von Ryanodin ein Anstieg der lokalen Laktatkonzentration induziert, beziehungsweise durch systemische Applikation von Dantrolen dieser Anstieg inhibiert werden kann.

Systemische Effekte müssen allerdings im in-vivo Tierversuch ausgeschlossen werden, um die Mikrodialysetechnik für die Entwicklung eines minimal-invasiven Verfahrens zur Diagnostik der malignen Hyperthermie nutzbar machen zu können.

---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 GIBSON C.: Heat stroke as a post-operative complication. *Med News (N.Y.)* 1900; 77: 883-888
- 2 DENBOROUGH M.A., LOVELL R.R.H.: Anaesthetic deaths in a family. *Lancet* 1960; 2: 45
- 3 ORDING H.: Epidemiology of Malignant Hyperthermia In: SCHULTE AM ESCH J., SCHOLZ J., WAPPLER F. (Eds.) Malignant Hyperthermia, *Pabst Science Publishers* 2000; 26-29
- 4 HARTUNG E., ANETSEDER M., OLTHOFF D., DEUTRICH C., LEHMANN-HORN F., BAUR CH., TEGAZZIN V., DOETSCH S., QUASTHOFF S., HOFMANN M., SCHWEFLER B., JANTZEN J.P., WAPPLER F., SCHOLZ J.: Die regionale Verbreitung der Malignen-Hyperthermie-Veranlagung in Deutschland: Stand 1997. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1998; 33: 238-243
- 5 TANABE T., BEAM K.G., ADAMS B.A.: Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 1990; 346: 567-569
- 6 HAYEK S.M., ZHU X., BHAT M.B., ZHAO J., TAKESHIMA H., VALDIVIA H.H., MA J.: Characterization of a calcium-regulation domain of the skeletal-muscle ryanodine receptor. *Biochem J* 2000; 351: 57-65
- 7 FIEGE M., WAPPLER F., SCHULTE AM ESCH J.: Skeletal muscle. In: SCHULTE AM ESCH J., SCHOLZ J., WAPPLER F. (Eds.) Malignant Hyperthermia, *Pabst Science Publishers* 2000; 91-97
- 8 STRYER L.: Erzeugung und Speicherung von Stoffwechselenergie. In: STRYER L. (Ed.) *Biochemie 2. Auflage, Spektrum Akad. Verlag* 1994; 325-570
- 9 STEINFATH M., WAPPLER F., SCHOLZ J.: Maligne Hyperthermie: Allgemeine, klinische und experimentelle Aspekte. *Anaesthesist* 2002; 51: 328-347

- 10 GRONERT G.A., ANTOGNINI J.F., PESSAH I.N.: Malignant Hyperthermia. In: MILLER R.D. (Ed.) *Anesthesia Philadelphia, Churchill Livingstone* 2000 pp. 1033-1050
- 11 KALOW W., BRITT B.A., TERRAU M.E., HAIST C.: Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet* 1970; II: 895-898
- 12 ELLIS F.R., HARRIMAN D.G.H., KEANEY N.P., KYEI-MENSAH K., TYRELL J.H.: Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 1971; 43: 721-722
- 13 THE EUROPEAN MALIGNANT HYPERPYREXIA GROUP: A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anaesth* 1984; 56: 1267-1269
- 14 LARACH M.G., FOR THE NORTH AMERICAN MALIGNANT HYPERTHERMIA GROUP: Standardization of the Caffeine Halothane Muscle Contracture Test. *Anesth Analg* 1989; 69: 511-515
- 15 HARTUNG E., ANETSEDER M.: The standard in-vitro contracture test. In: SCHULTE AM ESCH J., SCHOLZ J., WAPPLER F. (Eds.) *Malignant Hyperthermia, Pabst Science Publishers* 2000; 251-261
- 16 KOZACK J.K., MACINTYRE D.L.: Malignant Hyperthermia. *Phys Ther* 2001; 81: 945-951
- 17 SAWYNOK J.: Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs* 1995; 49: 37-50
- 18 HEFFRON J.J.A.: Receptors. In: SCHULTE AM ESCH J., SCHOLZ J., WAPPLER F. (Eds.) *Malignant Hyperthermia, Pabst Science Publishers* 2000; 107-115
- 19 ZHAO F., LI P., CHEN S.R.W., LOUIS C.F., FRUEN B.R.: Dantrolene inhibition of ryanodine receptor  $Ca^{2+}$  release channels. *J Biol Chem* 2001; 17: 13810-13816

- 
- 20 BENVENISTE H., HUTTEMEIER P.C.: Microdialysis: theory and application. *Prog Neurobiol* 1990; 35: 195-215
- 21 UNGERSTEDT U.: Microdialysis – principles and applications for studies in animal and man. *J Intern Med* 1991; 230: 365-73
- 22 ELIASSON A.: Microdialysis – principles of recovery; in *Application Note* 1991; 1-4
- 23 KORTH U., KLEIN J.: Methodik und Anwendung der Mikrodialyse. *Anästhesiol Intensivmed* 2001; 42: 732-739
- 24 DE LANGE E.C.M., DANHOF M., DE BOER A.G., BREIMER D.D.: Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Research Reviews* 1997; 25: 27-49
- 25 LINDEFORS N., AMBERG G., UNGERSTEDT U.: Intracerebral microdialysis: I. Experimental studies of diffusions kinetics. *J Pharmacol Meth* 1989; 22: 141-157
- 26 KORTH U., MERKEL G., FERNANDEZ F.F., 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: 1407-1412
- 27 MÜLLER M.: Microdialysis: Science, medicine and the future. *BMJ* 2002; 324: 588-591
- 28 CMA/MICRODIALYSIS: CMA/20 Microdialysis probe. *User's Manual* 1995 ; 1-4
- 29 SIGMA DIAGNOSTICS: Reagenz zur Bestimmung von Laktat. *Bedienungsanleitung* 1994; 1-4
- 30 BARHAN D., TRINDER P.: An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 1972; 97: 142

- 
- 31 SCHMIDT R.F., THEWS G.: Physiologie des Menschen. *Springer* 1995; 2.Auflage: 606
- 32 TAO R., HJORTH S.: Differences in the in vitro and in vivo 5-hydroxytryptamine extraction performance among three common microdialysis membranes. *J Neurochem* 1992; 59: 1778-1785
- 33 HOLMÄNG A., MÜLLER M., ANDERSSON O.K., LÖNNROTH P.: Minimal influence of blood flow on interstitial glucose and lactate-normal and insulin-resistant muscle. *Am J Physiol* 1998; 275: 446-452
- 34 ELMQUIST W.F., SWACHUK R.J.: Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* 1997; 14: 267-288
- 35 EVRARD P.A., DERIDDER G., VERBEECK R.K.: Intravenous microdialysis in the mouse and the rat: development and pharmacokinetic application of a new probe. *Pharm Res* 1996; 13: 12-17
- 36 PARSONS L.H., JUSTICE J.B. JR.: Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis. *Crit Rev Neurobiol* 1994; 8: 189-204
- 37 ARNER P., BÜLOW J.: Assessment of adipose tissue metabolism in man: comparison of Fick and microdialysis techniques. *Clin Sci* 1993; 85: 247-256
- 38 MCLOUGHLIN J.V., WHEATLEY A.M., WILSON P.: The effect of anaesthetics on the concentration of creatine phosphate, adenosine triphosphate and lactate in brain and skeletal muscle of the rat. *J Comp Pathol* 1987; 97: 341-349
- 39 MÜLLER M., SCHMID R., NIESZPAUR-LOS M., FASSOLT A., LÖNNROTH P., FASCHING P., EICHLER H.G.: Key metabolite kinetics in human skeletal muscle during ischaemia and reperfusion: measurement by microdialysis. *Europ J Clin Invest* 1995; 25: 601-607
- 40 HICKNER R.C., ROSDAHL H., BORG I., UNGERSTEDT U., JORFELDT L., HENRIKSSON J.: The ethanol technique of monitoring local blood flow changes in skeletal muscle: implications for microdialysis. *Acta Physiol Scand* 1992; 146: 87-97

- 
- 41 ALFARO V., PALACIOS L.: Comparison on acid/base status in conscious and anaesthetized rats during acute hypothermia. *Pflugers Arch* 1993; 424: 416-422
- 42 BONEN A., HOMONKO D.A.: Effects of exercise and glycogen depletion on glyconeogenesis in muscle. *J Appl Physiol* 1994; 76: 1753-1758
- 43 BERCHTOLD M.W., BRINKMEIER H., MÜNTENER M.: Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000; 80: 1215-1265
- 44 ZUCCHI R., RONCA-TESTONI S.: The sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 1-51
- 45 STOKES D.L., WAGENKNECHT T.: Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: Structure and function of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5274-5279

## 7 ANHANG

**Tabelle 1:** Absolute Werte der relative recovery von Laktat in mM bei unterschiedlichen Perfusionsgeschwindigkeiten ( $\mu\text{l min}^{-1}$ ). Je 4 Messungen pro Sonde.

$\mu\text{l min}^{-1}$	Absolute Laktatwerte			
0	2,22	2,22	2,13	2,13
0,5	1,57	1,83	2,04	2,04
1	1,42	1,37	1,82	1,79
3	0,98	0,99	1,22	1,23
5	0,57	0,58	0,66	0,66
10	0,29	0,30	0,34	0,34

$\mu\text{l min}^{-1}$	Absolute Laktatwerte			
0	2,28	2,28	2,11	2,11
0,5	2,08	2,06	1,94	1,96
1	1,62	1,56	1,66	1,57
3	0,82	0,87	0,84	0,84
5	0,59	0,58	0,58	0,58
10	0,36	0,41	0,41	0,37

$\mu\text{l min}^{-1}$	Absolute Laktatwerte			
0	8,80	8,80	8,63	8,63
0,5	8,26	8,20	8,14	8,43
1	7,36	7,30	7,09	6,98
3	3,78	3,72	3,73	3,73
5	2,26	2,53	2,66	2,60
10	1,42	1,40	1,43	1,53

**Tabelle 2:** Absolute Werte der relative loss recovery von Koffein in mM bei unterschiedlichen Perfusionsgeschwindigkeiten ( $\mu\text{l min}^{-1}$ ). Je 2 Messungen pro Sonde.

$\mu\text{l min}^{-1}$	Absolute Koffeinwerte			
0	0,17	0,17	0,18	0,18
0,5	0,02	0,02	0,01	0,01
1	0,04	0,03	0,03	0,03
3	0,10	0,10	0,10	0,10
5	0,13	0,13	0,12	0,13
10	0,15	0,15	0,15	0,15

$\mu\text{l min}^{-1}$	Absolute Koffeinwerte			
0	0,18	0,18	0,35	0,35
0,5	0,01	0,02	0,04	0,04
1	0,03	0,03	0,11	0,10
3	0,10	0,11	0,23	0,21
5	0,13	0,14	0,26	0,26
10	0,15	0,16	0,28	0,28

$\mu\text{l min}^{-1}$	Absolute Koffeinwerte	
0	0,35	0,35
0,5	0,04	0,04
1	0,12	0,13
3	0,23	0,24
5	0,27	0,27
10	0,28	0,28

**Tabelle 3:** Absolute Werte der relative loss recovery von Kalzium in mM bei unterschiedlichen Perfusionsgeschwindigkeiten ( $\mu\text{l min}^{-1}$ ). Je 2 Messungen pro Sonde.

$\mu\text{l min}^{-1}$	Absolute Kalziumwerte			
0	4,3	4,3	4,3	4,3
0,5	3,2	3,3	3,4	3,4
1	2,5	2,5	2,6	2,7
3	1,3	1,3	1,4	1,4
5	0,8	0,8	1,0	1,0
10	0,5	0,5	0,6	0,7

**Tabelle 4:** Vergleich der Laktatkonzentrationen beider Extremitäten in mM unter isolierter Organperfusion mit Ringerlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts	Links
15	1,09	1,67	1,80	1,23	0,89	1,37
30	1,25	1,75	2,17	1,13	1,10	1,47
45	1,31	1,77	2,05	1,47	1,34	1,62
60	1,50	1,84	2,30	1,35	1,42	1,68
75	1,40	1,98	2,34	1,64	1,49	2,02
90	1,69	2,22	2,96	1,86	1,69	2,30
105	1,65	2,24	3,12	2,05	1,75	2,47
120	2,06	2,40	3,25	2,33	2,08	2,52
135	2,08	2,40	3,25	2,35	2,10	2,53

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts	Links
15	0,88	1,33	0,80	1,55	2,05	2,22
30	1,20	1,47	0,80	1,59	2,41	2,19
45	1,35	1,55	0,76	1,82	2,52	2,02
60	1,49	1,64	0,88	1,89	3,05	2,43
75	1,53	1,74	0,84	1,76	3,71	2,57
90	1,67	1,90	0,99	2,32	3,81	3,07
105	1,80	2,16	1,26	2,37	4,03	3,13
120	2,02	2,30	1,51	2,80	4,62	3,10
135	2,09	2,47	1,51	2,82	4,63	3,11

**Tabelle 5:** Laktatkonzentrationen in mM mit und ohne 80 mM Sorbitolzusatz im Perfusat und systemischer Organperfusion mit Ringerlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Sorbitol	Ringer	Sorbitol	Ringer	Sorbitol	Ringer
15	0,75	1,32	0,91	1,29	2,12	1,20
30	0,82	1,31	0,84	1,16	2,07	1,66
45	0,92	1,50	0,86	1,18	2,03	1,89
60	0,91	1,37	0,76	1,24	2,07	2,05
75	0,91	1,83	0,91	1,32	2,47	2,15
90	0,99	1,54	1,02	1,29	2,57	2,03
105	0,91	2,12	1,00	1,49	2,86	1,99
120	1,12	2,01	1,18	1,40	2,63	2,09
135	1,29	2,13	1,28	1,77	2,85	2,12

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Sorbitol	Ringer	Sorbitol	Ringer	Sorbitol	Ringer
15	1,11	1,28	0,76	1,28	1,12	1,25
30	1,15	1,42	0,57	1,43	1,14	1,37
45	1,17	1,49	0,86	1,21	1,15	1,46
60	1,20	1,63	0,88	1,60	1,24	1,63
75	1,36	1,67	1,44	1,82	1,32	1,82
90	1,52	1,72	1,57	2,21	1,43	1,95
105	1,56	1,82	1,75	2,35	1,58	2,03
120	1,68	1,98	1,77	2,18	1,79	2,14
135	1,80	2,07	1,76	2,35	1,97	2,29

**Tabelle 6:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 20 mM Kalzium und systemischer Organperfusion mit Ringerlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer
15	1,35	1,98	0,99	1,37	1,91	1,56
30	1,27	2,01	1,32	1,54	1,91	1,41
45	1,59	2,07	1,48	1,79	2,22	1,70
60	2,35	2,30	1,62	1,88	3,19	1,75
75	3,29	2,72	1,90	1,98	3,96	1,92
90	4,05	2,63	2,61	2,07	5,52	2,01
105	4,90	2,50	3,50	2,53	6,27	2,20
120	5,45	3,13	4,54	2,48	7,27	2,21
135	5,70	3,18	4,64	2,59	7,24	2,45

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer
15	1,96	2,34	1,68	1,63	1,83	2,16
30	2,08	2,39	1,40	1,05	2,07	2,02
45	2,37	2,49	1,62	1,72	2,22	2,30
60	3,71	2,55	2,09	1,89	3,04	2,52
75	6,01	2,56	2,36	2,01	4,39	2,45
90	7,01	2,75	3,21	2,35	6,76	2,37
105	8,77	3,17	5,16	2,49	7,71	2,69
120	10,64	3,91	6,41	2,73	8,18	2,99
135	11,87	3,94	7,87	2,78	8,35	3,13

**Tabelle 7:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 40 mM Kalzium und systemischer Organperfusion mit Ringerlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer
15	1,36	1,49	2,53	2,22	2,01	2,08
30	1,74	1,74	2,96	2,44	2,37	2,18
45	3,71	2,10	3,66	2,53	4,71	2,18
60	6,60	2,28	5,57	3,44	7,33	2,29
75	6,90	2,70	7,28	2,88	8,62	2,39
90	7,80	3,03	9,14	3,46	9,89	2,86
105	8,15	3,30	9,78	3,56	10,34	2,95
120	9,37	3,86	10,88	4,08	10,33	3,59
135	9,41	3,99	10,76	4,73	11,63	3,90

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer
15	1,69	2,60	1,45	1,90	1,99	1,93
30	3,64	2,71	1,73	2,03	2,45	1,84
45	7,18	2,67	5,38	2,29	3,82	2,09
60	9,13	2,97	8,36	1,82	5,81	2,03
75	10,38	3,89	8,40	2,13	8,49	2,56
90	11,85	4,07	8,80	2,36	10,57	2,73
105	12,40	4,62	9,19	2,27	11,19	2,92
120	12,60	4,66	9,90	2,55	11,62	3,27
135	12,70	4,53	10,10	2,99	12,88	3,93

**Tabelle 8:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 80 mM Kalzium und systemischer Organperfusion mit Ringerlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer
15	1,91	1,56	1,41	1,63	1,450	1,98
30	2,77	1,60	2,71	1,57	2,22	2,14
45	4,84	1,81	6,15	1,80	5,82	2,19
60	6,42	1,91	7,38	2,41	10,48	2,41
75	7,42	2,04	7,84	2,21	10,81	2,46
90	8,59	2,27	7,35	2,57	11,92	2,47
105	8,24	2,50	7,60	2,44	11,82	2,71
120	9,00	2,64	7,68	2,67	11,63	2,98
135	8,58	3,16	7,82	2,85	11,12	3,46

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer	Kalzium	Ringer
15	1,18	1,76	0,92	1,03	1,15	1,84
30	2,04	1,88	1,57	1,13	1,27	2,19
45	5,63	2,14	5,01	1,20	2,37	2,37
60	7,37	2,43	5,70	1,51	4,01	2,58
75	8,16	2,63	5,99	1,42	4,76	2,89
90	9,10	2,86	6,18	1,54	5,35	3,25
105	8,93	3,08	6,27	1,59	5,77	3,30
120	9,53	3,34	8,10	2,01	5,75	3,31
135	9,84	3,51	8,36	2,02	5,24	3,70

**Tabelle 9:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 40 mM Koffein und systemischer Organperfusion mit Ringerlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,52	1,87	1,56	2,42	1,62	1,60
30	1,69	2,09	1,56	2,50	1,65	1,49
45	1,73	2,11	1,74	2,59	1,69	1,44
60	2,01	2,23	2,07	2,66	1,76	1,52
75	2,32	2,46	2,37	2,89	1,94	1,57
90	2,86	2,60	2,52	2,92	2,38	1,88
105	3,40	2,56	3,10	3,07	2,65	2,02
120	4,21	2,76	3,55	3,15	2,83	2,16
135	4,73	3,13	3,95	3,85	2,86	2,30

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,31	1,12	1,08	1,97	0,60	1,38
30	1,34	1,15	0,95	1,97	0,67	1,24
45	1,51	1,30	1,05	1,94	0,73	1,49
60	1,71	1,11	1,40	1,80	0,88	1,50
75	2,05	1,20	1,81	2,01	1,09	1,61
90	2,53	1,48	2,05	2,18	1,28	1,66
105	2,99	1,57	2,52	2,29	1,44	1,92
120	3,13	1,86	2,85	2,62	1,62	2,01
135	3,64	2,28	3,23	2,95	1,83	2,08

**Tabelle 10:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 80 mM Koffein und systemischer Organperfusion mit Ringerlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,52	2,40	1,80	2,13	1,60	2,39
30	1,50	2,35	1,89	2,21	1,80	2,45
45	1,54	2,37	2,08	2,06	1,84	2,53
60	1,71	2,67	2,15	2,00	2,40	2,34
75	2,34	2,72	2,90	1,95	2,88	3,16
90	2,63	2,56	3,76	2,30	3,64	3,38
105	3,09	2,70	4,27	2,20	4,06	3,61
120	3,50	2,73	5,21	2,29	4,66	3,78
135	3,76	2,99	6,41	2,70	5,24	4,41

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,24	1,87	1,46	1,76	0,74	1,86
30	1,76	1,89	1,56	2,04	0,90	1,85
45	1,94	1,94	1,56	1,99	1,08	1,51
60	2,01	1,94	1,81	2,11	0,90	1,45
75	2,48	1,95	2,30	2,09	1,90	1,52
90	2,91	2,15	3,19	2,18	1,47	1,74
105	3,31	2,46	4,02	3,01	1,89	1,94
120	4,09	2,84	4,86	3,17	2,27	2,21
135	5,10	2,92	5,48	3,41	2,96	2,31

**Tabelle 11:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 40 mM Koffein und systemischer Organperfusion mit 0,25  $\mu$ M Ryanodinlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,21	2,92	1,11	2,33	1,46	2,19
30	1,37	2,86	1,41	2,39	1,38	2,19
45	1,37	3,10	1,44	2,47	1,77	2,24
60	1,56	3,08	1,78	2,30	1,60	2,27
75	1,78	3,25	2,13	2,54	2,06	2,43
90	2,19	2,74	2,63	2,96	2,54	2,70
105	2,52	3,64	2,97	3,27	3,07	2,78
120	2,98	3,71	3,64	4,91	3,18	2,92
135	3,68	4,20	3,58	4,16	3,74	3,19

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,88	2,10	1,47	2,02	0,76	1,95
30	1,85	2,14	1,40	2,16	0,83	1,73
45	1,79	2,40	1,44	2,11	0,91	1,97
60	1,89	2,48	1,81	2,00	0,95	2,04
75	2,18	2,61	2,04	1,98	1,12	2,12
90	2,56	2,66	2,38	1,97	1,45	2,66
105	3,05	2,78	2,65	2,19	1,84	2,55
120	3,34	3,31	3,03	2,15	2,41	2,81
135	3,81	3,44	3,46	2,15	2,68	3,32

**Tabelle 12:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 40 mM Koffein und systemischer Organperfusion mit 1  $\mu$ M Ryanodinlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,18	0,70	1,93	2,22	1,52	2,68
30	1,33	0,82	2,17	2,26	1,83	2,40
45	1,48	0,96	2,46	2,36	1,85	2,41
60	1,87	1,04	2,81	2,91	2,23	2,62
75	2,41	1,22	3,09	3,35	2,70	2,53
90	2,80	1,33	3,87	3,66	3,33	2,88
105	3,37	1,75	4,56	4,22	3,78	3,18
120	4,11	1,90	5,42	4,68	4,67	3,49
135	4,83	2,28	6,21	5,35	5,52	3,94

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,75	1,92	1,20	2,26	1,20	1,23
30	1,85	1,75	1,41	2,24	1,34	1,21
45	1,99	1,67	1,48	2,60	1,34	1,24
60	2,03	1,96	1,42	2,88	1,56	1,91
75	2,38	2,02	1,91	3,23	1,90	1,75
90	2,96	2,32	2,00	3,43	2,45	1,76
105	3,612	2,60	2,55	3,86	2,85	2,04
120	4,21	3,04	2,87	4,25	3,25	2,24
135	4,97	3,47	3,47	4,35	3,80	2,43

**Tabelle 13:** Laktatkonzentrationen in mM unter Stimulation mit 40 mM Koffein und systemischer Organperfusion mit 1  $\mu$ M Dantrolenlösung.

Zeit [min]	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	1,95	1,87	0,97	2,42	1,12	1,60
30	1,36	2,09	0,88	2,50	1,72	1,49
45	1,82	2,11	0,98	2,59	0,97	1,44
60	2,07	2,23	1,02	2,66	1,02	1,52
75	2,04	2,46	1,04	2,89	0,99	1,57
90	2,26	2,60	1,39	2,92	1,09	1,88
105	3,08	2,56	1,52	3,07	1,24	2,02
120	3,47	2,76	1,76	3,15	1,35	2,16
135	3,60	3,13	2,02	3,85	1,68	2,30

Zeit [min]	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer	Koffein	Ringer
15	0,73	1,12	0,76	1,97	0,75	1,38
30	0,62	1,15	0,74	1,97	0,72	1,24
45	0,73	1,30	0,78	1,94	0,70	1,49
60	0,86	1,11	0,83	1,80	0,69	1,50
75	0,91	1,20	0,87	2,01	0,86	1,61
90	0,92	1,48	1,00	2,18	1,13	1,66
105	1,10	1,57	1,20	2,29	1,32	1,92
120	1,21	1,86	1,26	2,62	1,40	2,01
135	1,30	2,28	1,46	2,95	1,83	2,08

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. med. N. Roewer, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der Universität Würzburg, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. M. Anetseder für seine stete Diskussionsbereitschaft und für seine mir jederzeit gewährte Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. med. C.-A. Greim danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Den gesamten Mitarbeitern des Anaesthesie-Labors sage ich herzlichen Dank für die freundliche Hilfe während meiner Untersuchung.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widmen möchte. Ihre ausnahmslose Unterstützung in jeder Hinsicht, die mir immer ein großer Rückhalt war und ist, ermöglichte mir erst diese Ausbildung.

**Persönliche Daten**

Name Frank Schuster  
Adresse Blumengasse 3  
97509 Kolitzheim - Herlheim  
Geburtsdatum, -ort 27. April 1972 in Gerolzhofen  
Familienstand ledig

**SCHULISCHE AUSBILDUNG**

1978 – 1982 Grundschule Gerolzhofen  
1982 – 1991 Gymnasium Franken – Landschulheim Gaibach  
1991 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**ZIVILDienst**

Sep. 1991 – Nov. 1992 Rettungsdienst Bayerisches Rotes Kreuz Schweinfurt

**HOCHSCHULAUSBILDUNG**

März 1994 – Sep. 1996 Vorklinisches Studium, Universität Würzburg  
Okt. 1996 – März 2000 Klinisches Studium, Universität Würzburg  
April 2000 – März 2001 Praktisches Jahr, Leopoldina Krankenhaus, Schweinfurt  
Mai 2001 Abschluss des Studiums

**FAMULATUREN**

März 1997 Ambulante Chirurgie, Praxis, Gerolzhofen  
Okt. 1997 Anaesthesie, Leopoldina Krankenhaus, Schweinfurt  
April 1998 Innere Medizin, Geomed Klinik, Gerolzhofen  
Aug. 1998 Anaesthesie, Universitätsklinik, Würzburg  
März 1999 Notfallmedizin, Methodist Healthcare Hospital, Memphis, TN, U.S.A.  
Aug. 1999 Innere Medizin, Geomed Klinik, Gerolzhofen

**Berufliche Tätigkeit**

Seit Sep. 2001 Arzt im Praktikum an der Klinik für Anaesthesiologie der Universität Würzburg

Herlheim, im September 2002

