

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer

**Der Effekt von Statinen, Fluorchinolonen und Fibraten auf die  
kontraktilen Eigenschaften von Skelettmuskelfasern  
Maligne Hyperthermie suszeptibler Schweine  
im In-vitro-Kontrakturtest**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät der

Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lukas Christopher Tadda

aus Gundelsheim bei Bamberg

Würzburg, September 2009

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

Koreferent: Prof. Dr. med. N. Roewer

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2010

Der Promovend ist Arzt.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Definition der Malignen Hyperthermie.....	1
1.2. Historischer Überblick.....	1
1.3. Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie.....	3
1.4. Klinik der Malignen Hyperthermie.....	4
1.5. Therapie der Malignen Hyperthermie.....	5
1.6. Diagnostik der Veranlagung zur Malignen Hyperthermie.....	7
1.7. Das Schwein als Versuchstier.....	9
1.8. Statine.....	9
1.9. Fragestellung.....	10
2. Material und Methoden.....	12
2.1. Material.....	12
2.2. Versuchsaufbau.....	14
2.3. Versuchsablauf.....	15
2.4. Datenerfassung.....	17
2.5. Statistik.....	17
3. Ergebnisse.....	18
3.1. Biometrische Daten.....	18
3.2. Ruhespannung.....	19
3.2.1. Atorvastatin.....	20

3.2.2. Simvastatin.....	21
3.2.3. Ciprofloxacin .....	22
3.2.4. Levofloxacin .....	23
3.2.5. Methanol.....	24
3.2.6. Krebs-Ringer-Lösung.....	25
3.3. Kontraktionsamplitude.....	26
3.4. Kontraktilitätszeiten .....	28
3.5. Gemfibrozil .....	33
4. Diskussion .....	37
4.1. Statine.....	38
4.2. Fluorchinolone.....	41
4.3. Fluor als Hemmstoff der SERCA.....	42
4.4. Gemfibrozil .....	43
4.5. Kontraktilitätszeiten .....	44
4.6. Methodenkritik.....	46
4.7. Resümee .....	50
5. Zusammenfassung.....	51
6. Literaturverzeichnis .....	53
7. Abkürzungsverzeichnis .....	60
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	61
Danksagung	
Lebenslauf	

*Meinen Eltern*

## **1. Einleitung**

### 1.1. Definition der Malignen Hyperthermie

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine metabolische Myopathie[1] und kennzeichnet die Veranlagung zu einer potentiell lebensbedrohlichen Stoffwechsellage, der MH-Krise. Diese kann durch eine Narkose mit volatilen Anästhetika oder depolarisierenden Muskelrelaxantien ausgelöst werden. Aufgrund eines Defekts in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) der Skelettmuskulatur kommt es dabei zu unkontrollierter intramuskulärer Kalziumfreisetzung. Die Folgen sind generalisierte, andauernde Muskelkontraktion und dadurch erhebliche Steigerung des Energieverbrauchs.

Seinen Namen verdankt dieser immer noch gefürchtete Operationszwischenfall dem signifikanten Anstieg der Körpertemperatur während einer fulminanten MH-Krise. Im täglichen Leben bleibt die Disposition im Regelfall unbemerkt.

Die Prävalenz wird auf 1:10.000 geschätzt, die Inzidenz in Deutschland wird mit 1:60.000 Allgemeinanästhesien angegeben[2].

### 1.2. Historischer Überblick

Die Geschichte der Inhalationsanästhesie geht bis auf Hippokrates zurück. Schon 450 v. Chr. ließ dieser seine Patienten bestimmte Kräuterdämpfe inhalieren, um damit Schmerzzustände zu bekämpfen.

Die bahnbrechenden Entwicklungen in der Anästhesie sind allerdings wesentlich jünger: Erst 1800 wurde von Humphrey Davy das Stickoxydul (Lachgas) erforscht, 1831 folgte die Entdeckung des Chloroforms durch Justus von Liebig.

Erstmals mit dem Symptomenkomplex der Malignen Hyperthermie konfrontiert wurden Ärzte nach der Entwicklung der Äthernarkose durch den englischen Zahnarzt

William Thomas Green Morton im Jahr 1846. Die perioperative Überwachung des Patienten war damals auf ein Minimum beschränkt, Komplikationen und Todesfälle waren deshalb nicht selten. Es erschienen erste Berichte über „Äther-Krämpfe“ [3, 4], einen familiären Zusammenhang erkannte man jedoch noch nicht.

In den folgenden 100 Jahren wurden die Möglichkeiten der Narkose stetig verbessert, vor allem mit Einführung der endotrachealen Intubation durch Franz Kuhn (1901) und durch die Entwicklung von Halothan durch Michael Johnstone (1956).

Im Jahr 1960 postulierten Denborough und Lovell erstmals den familiären Hintergrund der Malignen Hyperthermie[5, 6], als ein Patient von zehn unerwarteten, intraoperativen Todesfällen in seiner Familie berichtete. Auch er entwickelte eine MH-Krise während der Operation, wurde aber symptomatisch behandelt und überlebte. Sechs Jahre später gab Gordon diesem Symptomenkomplex seinen Namen[7].

Nach und nach gewann die Maligne Hyperthermie immer mehr das Interesse der Forschung. Besonders hervorzuheben sind die Studien von Kalow und Britt, die den autosomal dominanten Erbgang nachwiesen[8] und eine unangemessene Kontraktur des Maligne Hyperthermie suszeptiblen (MHS) Muskels nach Stimulation mit Koffein und Halothan protokollierten[9]. Dieses Ergebnis legte den Grundstein für die heutige Standardmethode zur Diagnose der Veranlagung zur Malignen Hyperthermie, den In-vitro-Kontrakturtest (IVCT).

Dieser wurde 1983 entwickelt und wird bis heute gemäß zweier Protokolle, dem „europäischen“ und dem „nordamerikanischen“[10, 11], durchgeführt.

Den Meilenstein zur adäquaten Behandlung legte Harrison im Jahr 1975, indem er das Muskelrelaxans Dantrolen entwickelte und damit eine kausale Behandlung der Malignen Hyperthermie ermöglichte[12]. Kolb, Horne und Martz vervollständigten 1982 Harrisons Ansatz mit Bereitstellung eines intravenös applizierbaren Dantrolens, Grundlage der heutigen Therapie einer MH-Krise[13].

Weitere bedeutende Schritte waren die Erkennung des Zusammenhangs der MH mit der intramuskulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Dysregulation und die Erforschung des Ryanodin-Rezeptors, der 1989 von Wagenknecht dreidimensional dargestellt werden konnte[14].

Für die Zukunft können zwei wichtige Ziele ins Auge gefasst werden: Die Identifikation aller Mutationen, die den Menschen für MH prädisponieren, sowie die Entwicklung eines einfachen, minimal- oder nicht-invasiven Tests zur präoperativen Diagnostik.

### 1.3. Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie

Im Rahmen der physiologischen elektromechanischen Kopplung erreicht ein Aktionspotential die motorische Endplatte eines Muskels. Es breitet sich entlang der Zellmembran in die Transversaltubuli aus, wo es Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR) aktiviert[15]. Diese interagieren mit Ryanodin-Rezeptoren vom Skelettmuskeltyp (RYR1), mit welchen sie mechanisch verbunden sind[16].

Der RYR1 ist mit 454 kDa eines der größten bekannten Proteine und sitzt in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums[17]. Seinen Namen hat dieser Rezeptor vom Pflanzenalkaloid Ryanodin, durch dessen Bindung am Rezeptor ein verlängerter Öffnungszustand erreicht wird[18].

Die Öffnung der RYR1 führt zum massiven Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR ins Zytoplasma. Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin wird das ineinander Gleiten der Aktin- und Myosinfilamente ermöglicht und der Skelettmuskel kontrahiert sich.

Es ist wichtig anzumerken, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit des RYR1 neben der Interaktion mit DHPR auch durch viele andere Faktoren beeinflusst werden kann. Einer der Faktoren ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel selbst: Bis zu einer Konzentration von  $10^{-4}$  M steigt die Öffnungswahrscheinlichkeit kontinuierlich an[17]. Studien von Nelson[19] und Ohnishi[20] an isolierten SR-Membranen zeigten, dass die intraluminale Schwellenkonzentration für  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bei MHS-Muskeln deutlich niedriger liegt als bei Maligne Hyperthermie negativen (MHN) Muskeln.



Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des SR (SERCA) pumpt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiv wieder in den Speicher zurück[21] und sorgt so für die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten und für die Relaxation des Muskels.

Die pathophysiologische Ursache einer MH-Krise besteht in einer Entgleisung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels. Durch anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kommt es zu einer dauerhaften Kontraktion des Muskels.

Triggerstoffe für die Entgleisung sind volatile Anästhetika und das depolarisierende Muskelrelaxanz Succinylcholin. Erstere bewirken auch am gesunden Muskel eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR[22, 23]. Bei bestehender Veranlagung zur MH kann so jedoch eine MH-Krise entstehen: Die Dauerkontraktion verbraucht dann schnell die muskulären Energiereserven, zudem schränkt sie die Perfusion ein. Schließlich entstehen Ödem und Rhabdomyolyse.

Seine große Bedrohlichkeit erlangt dieser Vorgang durch das generalisierte Auftreten an der gesamten Muskelmasse des Patienten.

Der Erbgang der MH ist beim Menschen stark heterogen, eine so genannte „MH-hot zone“ befindet sich allerdings zwischen den Aminosäuren 2101 und 2458 des RYR1: Hier sind bereits über 20 Mutationen bekannt, welche eine Disposition zur MH verursachen[17].

#### 1.4. Klinik der Malignen Hyperthermie

Während die Maligne Hyperthermie in unterschiedlich schweren Verlaufsformen kein wirklich klassisches Bild bietet, so ist jedoch eine fulminante MH-Krise klar erkennbar. Entscheidende Symptome sind durch die Gesamtsituation nicht anders zu erklärende Tachykardie, ein deutlicher Anstieg des  $\text{O}_2$ -Verbrauchs und der endexpiratorischen  $\text{CO}_2$ -Konzentration, sowie im weiteren Verlauf eine metabolische und respiratorische Azidose.

Durch Rhabdomyolyse kommt es zu Elektrolytverschiebungen (Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie, Hypokalzämie), was zu Arrhythmien führen kann. Der Anstieg der Körpertemperatur während einer fulminanten Krise kann bis zu 1°C in 5 Minuten betragen, gehört aber zu den Spätzeichen[24].

Insgesamt verlaufen allerdings nur etwa 6,5% aller MH Fälle fulminant, weshalb sich die Diagnosestellung häufig als schwierig erweist[24].

Bleibt eine angemessene Behandlung aus, droht vor dem Hintergrund der generalisierten Rhabdomyolyse die Entwicklung von Lungenödem, Verbrauchskoagulopathie und Crush-Niere bis hin zum letalen HerzKreislaufversagen [25].

Wichtig ist folglich eine gute Kenntnis der Frühzeichen einer MH-Krise: Durch den erhöhten Metabolismus steigen die Herzfrequenz und die endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration an[26]. Als eines der frühesten Zeichen kann zudem ein Masseterspasmus beobachtet werden, oftmals das erste Symptom einer pathologischen Reaktion auf Succinylcholin[12, 13].

Der zeitliche Verlauf lässt sich nicht abschätzen. Während Fälle existieren, bei denen es bereits zehn Minuten nach Verabreichung des Triggers zur Ausprägung des Vollbilds kam, so vergingen bei anderen Patienten mehrere Stunden, bevor sie klinisch auffällig wurden[12].

### 1.5. Therapie der Malignen Hyperthermie

Durch die heute etablierte Therapie der MH konnte die Mortalität auf unter 1% gesenkt werden[17]. Sie stützt sich auf drei Säulen: Die schnelle und ausreichende Verabreichung von Dantrolen, die Aufrechterhaltung einer suffizienten Oxygenierung und Perfusion, sowie die Prophylaxe von Komplikationen.

Die Vereinigung für Maligne Hyperthermie der Vereinigten Staaten (<http://www.mhaus.org>) hat einen Behandlungsalgorithmus entwickelt:

Der zuständige Arzt soll demnach rasch Hilfe holen und das in operativ tätigen Kliniken stets verfügbare Dantrolen verabreichen. Der Operateur muss instruiert werden, den Eingriff so schnell wie möglich zu beenden. Die verantwortlichen Triggersubstanzen müssen sofort entfernt werden. Falls die Narkose mit volatilen Anästhetika geführt wurde, soll der Vaporisator komplett aus dem Beatmungsgerät entnommen werden. Zudem müssen alle Beatmungsschläuche ausgetauscht werden, das Beatmungsgerät soll aber wegen des mit einem Austausch verbundenen erheblichen Zeitverlusts weiterverwendet werden[27]. Es soll fortan mit 100% O<sub>2</sub> und einem Frischgasfluss von mindestens 12 l/min hyperventiliert werden, um die endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration im Normbereich zu halten. Die Narkose soll mit Opioiden und Sedativa vertieft werden.

Die kausale Behandlung erfolgt durch die Gabe von Dantrolen, das direkt an zwei spezifische Bindungsplätze des RYR1[28] bindet und diesen blockiert. Dadurch wird die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR verhindert, ohne aber die Wiederaufnahme zu beeinflussen. Der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel wird somit gesenkt[29, 30].

Empfohlen ist die schnelle Bolusgabe von 2,5 mg/kg Körpergewicht (KG), nach Bedarf bis zu 10 mg/kg KG. Tritt nach 30 Minuten keine Besserung ein, muss die Diagnosestellung überdacht werden.

Da der Rigor die muskuläre Perfusion beeinträchtigt, muss diese Maßnahme so schnell wie möglich ergriffen werden[1].

Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker verbessern die Überlebensrate nicht[31]. Sie können durch Wechselwirkung mit Dantrolen unter Umständen sogar zu erhöhten Serum-K<sup>+</sup>-Spiegeln und somit zu schweren Arrhythmien und myokardialer Depression führen[32, 33]. Auch Digitalis sollte aufgrund der möglicherweise bestehenden Hyperkaliämie während der Therapie nicht verabreicht werden[34].

Zur Pufferung einer metabolischen Azidose wird Natriumbikarbonat eingesetzt. Weiterhin muss die Nierenfunktion durch Bilanzierung überwacht werden. Es soll eine

forcierte Diurese angestrebt werden, wobei mittels Infusionsgabe eine ausgeglichene Flüssigkeitsbilanz erhalten wird. Die Verwendung von Glukoselösungen in Kombination mit Insulin ermöglicht die Absenkung des erhöhten Serum-K<sup>+</sup>-Spiegels.

Den erheblichen Temperaturanstieg behandelt man physikalisch durch eisgekühlte Infusionen, Blasenspülungen und externe Kühlmaßnahmen.

Nach Beendigung der Operation muss der Patient mindestens 24 Stunden auf der Intensivstation überwacht und anschließend in ein Zentrum für MH-Diagnostik verlegt werden. Sollten die Symptome noch nicht abgeklungen sein, wird das Dantrolen für 24 Stunden weitergegeben (10 mg/kg KG x h).

## 1.6. Diagnostik der Veranlagung zur Malignen Hyperthermie

### *In-vitro-Kontrakturtest (IVCT)*

Der Goldstandard zur Diagnostik ist heute der IVCT. Er wird gemäß dem „europäischen“ oder dem „nordamerikanischen“ Protokoll durchgeführt[10, 11].

Dabei wird eine Muskelbiopsie aus dem vastus lateralis des musculus quadriceps femoris entnommen und auf Stücke von 15-25 mm Länge und 2-3 mm Dicke präpariert, die in einer Testkammer eingespannt werden (s. auch Teil 2: Methodik).

Es werden vier Tests durchgeführt, jeweils zwei Halothantests und zwei Koffeintests. Dabei wird das Präparat in ansteigenden Konzentrationen mit Halothan bzw. Koffein inkubiert. Steigt die Muskelgrundspannung um mindestens 2 mN an, wird die aktuelle Konzentration als Halothan- bzw. Koffeinschwelle bezeichnet.

Das europäische Protokoll sieht dabei folgende Diagnosekriterien vor:

Maligne Hyperthermie suszeptibel (MHS): Eine Halothanswellenkonzentration von 0,44 mmol/l oder weniger und eine Koffeinswellenkonzentration von 2,0 mmol/l oder weniger.

Maligne Hyperthermie negativ (MHN): Eine Halothanswellenkonzentration über 0,44 mmol/l und eine Koffeinschwelle von 3,0 mmol/l.

Alle anderen Ergebnisse werden als Maligne Hyperthermie verdächtig („malignant hyperthermia equivocal“, MHE) bezeichnet und aus Gründen der Patientensicherheit als MH-gefährdet eingestuft.

Die Sensitivität des europäischen Protokolls wird mit 99% angegeben, die Spezifität mit 94%.

### *Genetisches Screening*

Derzeit sind mehr als 50 Punktmutationen am für den RYR1 kodierenden Genlokus bekannt, die mit der Veranlagung zur MH in Verbindung gebracht werden[35, 36]. Eine präoperative Diagnostik auf genanalytischer Basis erscheint deshalb wenig sinnvoll.

Ist allerdings die Veranlagung bereits bekannt, so kann der Patient genetisch getestet werden, um die Muskelbiopsie für den IVCT bei seinen Verwandten zu umgehen. Sollte auf genetischem Niveau jedoch keine Übereinstimmung festgestellt werden können, so muss der IVCT dennoch durchgeführt werden[37].

### *Minimal-invasive Diagnostik*

Eine viel versprechende Möglichkeit, den IVCT und die damit verbundene Muskelbiopsie in Zukunft umgehen zu können, stellt die minimal-invasive Diagnostik dar. Dabei wird ein Triggerstoff lokal in den Muskel appliziert und anschließend mit Hilfe von Mikrodialysesonden die lokale Konzentration von Laktat und CO<sub>2</sub> bestimmt.

Beim MHS-Patienten wären im Gegensatz zum Gesunden aufgrund des überschießenden Energieumsatzes deutlich höhere Werte zu erwarten[38].

Diese Alternative ist für eine sichere MH-Diagnostik bis dato jedoch noch nicht zugelassen.

### 1.7. Das Schwein als Versuchstier

Durch gezielte Kreuzung von Schweinen zur Erhöhung ihrer Muskelmasse und damit Ertragssteigerung für die Fleischindustrie wurde eine Punktmutation weitergegeben, welche die Tiere für ein „stress syndrom“ prädisponierte. Ludvigsen bezeichnete 1954 die typische Fleischbeschaffenheit solcher Schweine als „pale, soft and exsudative“.

Später wurde entdeckt, dass bei diesen Schweinen durch Anästhetika eine MH-Krise ausgelöst werden kann[39]. Vergleichsstudien zwischen Mensch und Tier zeigten eine starke Ähnlichkeit der Reaktionen und damit eine gute Eignung der Schweine für weitere Versuche[40].

Ein bedeutender Unterschied zwischen Mensch und Schwein besteht allerdings in der Vererbung: Während beim Schwein exakt eine Mutation (Arg615Cys) für die MH-Veranlagung verantwortlich gemacht werden kann[41], liegt beim Menschen ein stark heterogener Erbgang vor.

### 1.8. Statine

Statine sind aus der heutigen Medizin nicht mehr wegzudenken. Über die Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Koenzym-A-Reduktase senken sie nachhaltig den intrazellulären Cholesterinspiegel und bewirken sekundär eine Hochregulierung der „low density lipoprotein“ (LDL)-Rezeptoren, was zu einer verbesserten LDL-Resorption aus dem Plasma und somit niedrigeren LDL-Plasmaspiegeln führt[42]. Auf diese Weise wird bei Patientengruppen mit erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Zwischenfälle dieses nachweislich um 20-40% reduziert[43-45].

Arteriosklerose und Hypercholesterinämie sind chronische Zustände, die einer lebenslangen Therapie bedürfen. Deshalb ist ein günstiges Nebenwirkungs- und Verträglichkeitsprofil für Statine äußerst wichtig. Generell liegt ein solches auch vor,

doch mit einer Inzidenz von 1-7% entstehen myotoxische Nebenwirkungen, die sich durch leichte Myalgien bis hin zu schweren Rhabdomyolysen äußern[46].

Cerivastatin wurde 2001 vom Markt genommen, nachdem es weltweit zu 52, mit derartigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen assoziierten, Todesfällen unter einer Therapie mit diesem Statin gekommen war[47].

Nach den Ursachen dieser unerwünschten Arzneimittelwirkungen wird intensiv geforscht, und 2003 brachten Guis, Bendahan und Kozak-Ribbens erstmals die myotoxischen Effekte der Statine in Zusammenhang mit der MH. Die Autoren berichteten über einen Patienten, der unter der Behandlung mit Atorvastatin Rhabdomyolysen entwickelte und anschließend im IVCT als MHS diagnostiziert wurde[48].

### 1.9. Fragestellung

Nach Diagnosestellung einer Veranlagung zur MH verbietet sich automatisch die Anwendung der bekannten Auslöser während einer Narkose.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich nun mit der Frage, ob zukünftig auch die Applikation weiterer Medikamente bei MHS-Patienten überdacht werden muss.

Im speziellen Interesse stehen hier Statine und Fluorchinolone, da hier Rhabdomyolysen im Nebenwirkungsprofil auftauchen. Beide Medikamentengruppen sind heute weit verbreitet und kommen größtenteils unkritisch zur Anwendung.

Eine amerikanische Forschungsgruppe konnte im IVCT einen durch Atorvastatin ausgelösten, signifikant höheren Anstieg der Grundspannung von MHS-Muskeln gegenüber MHN-Muskeln bereits zeigen[49], allerdings war die Versuchszahl (3x MHS, 4x MHN) extrem gering.

Es existieren zudem zahlreiche Untersuchungen und Erklärungsansätze zur Myotoxizität von Statinen und Fluorchinolonen. So wurde beispielsweise schon 1992 von Murphy und Coll gezeigt, dass Fluor ein Hemmstoff der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoendoplasmatischen Retikulums (SERCA) ist[50, 51] und zu erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln führt. Detaillierte Ausführungen hierzu sind im Diskussionsteil zu finden.

Folgende Vermutung soll also überprüft werden:

Ist der MHS-Muskel soweit vorgeschädigt, dass eine zusätzliche geringe Beeinträchtigung durch die Anwendung bestimmter Medikamente bereits fatale Auswirkungen haben kann?

In die Versuchsreihe wurde ergänzend Gemfibrozil aufgenommen, da mit diesem Fibrat in zwölf unter Cerivastatin aufgetretenen Todesfällen eine Kombinationstherapie erfolgt war[52].



## 2. Material und Methoden

Die bestehende Fragestellung wurde mittels IVCT untersucht. Zur Anwendung kamen dabei aber nicht wie üblich Koffein und Halothan, sondern die beschriebenen Medikamente. Die Versuche wurden an Schweinemuskelfasern durchgeführt.

### 2.1. Material

#### *Substanzen*

Als Perfusionslösung während der Versuche wurde Krebs-Ringer-Lösung (NaCl 118,1 mmol/l, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mmol/l, Glucose 11,1 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mmol/l, KCl 3,4 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 25,0 mmol/l) (Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland) verwendet.

Die Herstellung der Vorratslösungen erfolgte durch Lösen der Medikamente in Methanol in folgenden Konzentrationen:

10 mg Simvastatin in 10 ml Methanol

25 mg Atorvastatin in 10 ml Methanol

400 mg Gemfibrozil in 10 ml Methanol

Die Fluorchinolone Ciprofloxacin (2mg/ml) und Levofloxacin (5mg/ml) wurden fertig gelöst in physiologischer Kochsalzlösung von der Hausapotheke geliefert.

Während der gesamten Versuchsdauer wurde das Muskelpräparat mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast.

#### *Geräte*

Es wurden 4 IVCT-Bäder mit zentral geheiztem Wärmekreislauf (Fa. Sauer, Würzburg, Deutschland) eingesetzt. Sie wurden durch eine Heizspirale Assistent 3180

(Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland) auf 37 °C erhitzt. Das Gerät besitzt eine eingebaute Umwälzpumpe (ca. 5 l/min).

Für die Vordehnung der Muskelpräparate wurden Mikromanipulatoren mit elektronischer Steuerung eingesetzt (Eigenbau Feinmechaniker Hr. Sauer, Physiologisches Institut der Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland). Der Reizstrom wurde von einem Stimulator Type 215/I (Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) erzeugt.

Zur Messung der Kontraktilitätsparameter war das Muskelpräparat mit einem Kraftaufnehmer Lectromed Isometric Force Transducer T4150 (Lectromed Limited, Welwyn Garden City, England) verbunden, der das Signal über einen Brückenverstärker Musco (RS Biomed tech, Sinzing, Deutschland) und eine AC/DC PC Card in einen Computer einspeiste. Als Sicherheitssystem wurde zusätzlich ein Multipen Recorder R-64 (Rikadenki Kogyo Co., Tokio, Japan) eingesetzt, der das Signal analog aufzeichnete.

Die kontinuierliche Perfusion des Muskelpräparats mit Krebs-Ringer-Lösung erfolgte durch einen Pumpenantrieb BVP (ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz).

Die Medikamente wurden mit Eppendorf research 200 bzw. 1000 Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abgemessen.

### *Versuchstiere*

Für die Versuche standen 30 Schweine zur Verfügung, von denen durch genetische Analyse 18 MH-suszeptibel und 12 MH-negativ getestet waren. Eine Genehmigung der örtlichen Ethikkommission lag vor.

## 2.2. Versuchsaufbau

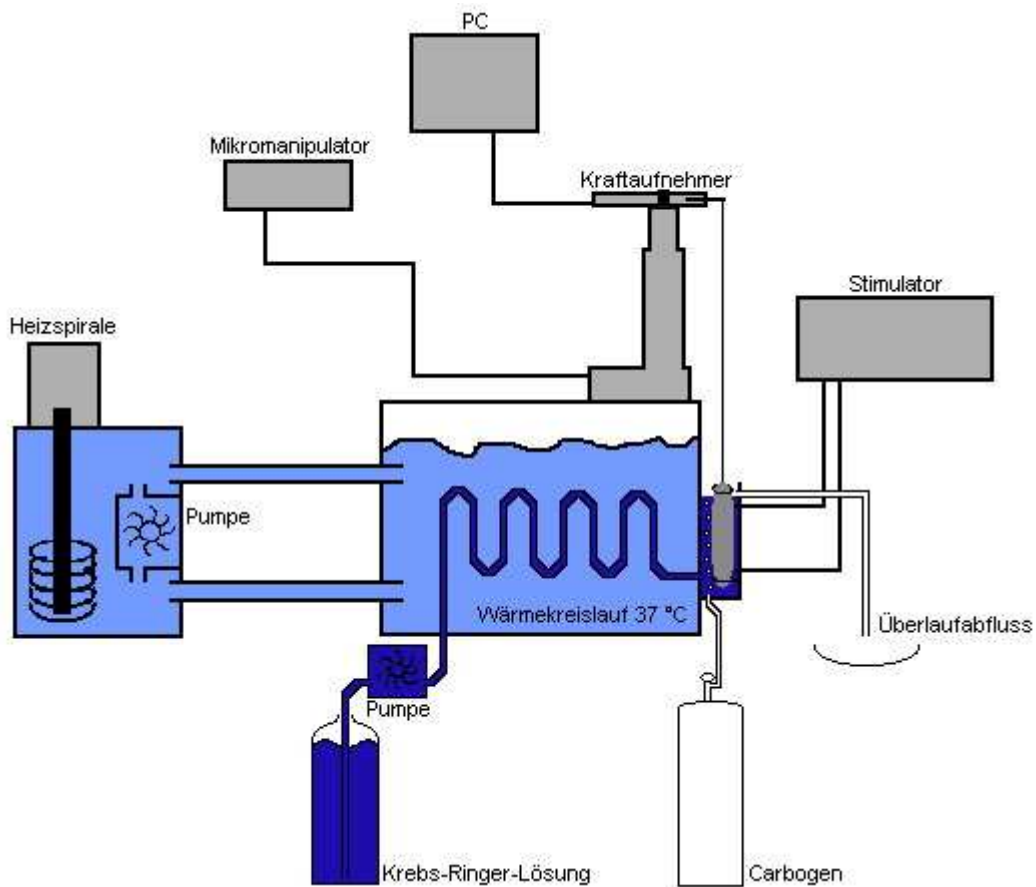


Abb. 1: Versuchsanordnung.

Mittelpunkt des Versuches stellt die nach oben offene Messkammer dar, in der das Muskelbündel vertikal befestigt ist.

Sie wird kontinuierlich mit frischer Krebs-Ringer-Lösung gespült, welche durch den Wärmekreislauf auf 37 °C aufgeheizt wird. Der Überlaufabfluss der Messkammer sorgt für das konstante Volumen von 20 ml. Zusätzlich besteht ein geringer Fluss von Carbogen in die Messkammer um pH- und pO<sub>2</sub>-Wert konstant zu halten.

Mit dem Mikromanipulator kann das Präparat auf eine gewünschte Spannung vorgedehnt werden. Diese wird durch den Kraftaufnehmer fortlaufend erfasst und an den Computer weitergeleitet.

Der Stimulator erzeugt alle 5 Sekunden einen Reizstrom, welcher eine Muskelkontraktion auslöst.

### 2.3. Versuchsablauf

Dem Versuchstier wird von einem Anästhesisten in tiefer Narkose eine 25-50 g schwere Biopsie aus dem vastus lateralis des musculus quadriceps femoris entnommen. Sie wird entlang der Faserrichtung in mehrere schmale Stücke zerteilt, um eine möglichst kurze Diffusionsstrecke für den Gasaustausch der Zellen zu schaffen. Für den Transport ins Labor (Dauer ca. 5 Minuten) wird die Biopsie in ausreichend mit Carbogen gesättigter Krebs-Ringer-Lösung aufbewahrt. Um die fortlaufende Sauerstoffversorgung zu garantieren, begasten wir die Biopsie im Labor kontinuierlich mit Carbogen.

Anschließend werden entlang der Faserrichtung kleine Muskelbündel mit einem Gewicht von 530-565 mg und einer Länge von 18-22 mm präpariert. Sie werden mittels Nahtmaterial vertikal auf der Frontplatte des Versuchsbades fixiert und mit dem Kraftaufnehmer verbunden. Dem Versuchsbad wird kontinuierlich frische Krebs-Ringer-Lösung und Carbogen zugeführt, durch einen Überlauf bleibt das Volumen von 20 ml dabei unverändert.

Das Muskelpräparat liegt dabei im Versuchsbad zwei Stimulationselektroden an (Edelstahl 1,5 mm), deren Abstand voneinander 1,7 cm misst.

Nach dem Nullabgleich des Kraftaufnehmers wird der Muskel mit Hilfe des Mikromanipulators vorgedehnt, bis seine Grundspannung auf 20 mN angestiegen ist. Währenddessen wird durch den Stimulator alle 5 Sekunden eine Kontraktion ausgelöst.

Der Versuch startet, wenn sich die Grundspannung gemäß eines Algorithmus der Steuersoftware stabilisiert hat und die Kontraktionsamplitude bei Stimulation innerhalb von 10 Minuten um weniger als 10% abnimmt.

Zur Kontrolle wird die Temperatur in der Messkammer mit einem handelsüblichen Glasthermometer gemessen und protokolliert. Dann wird die Zufuhr von Krebs-Ringer-Lösung gestoppt und das Medikament in die Messkammer pipettiert. Um die richtige Konzentration zu gewährleisten, wird vorher die gleiche Menge an Krebs-Ringer-Lösung entnommen. Von diesem Zeitpunkt an läuft der Versuch für 90 Minuten.

Es wurden zehn Versuchsreihen mit folgenden Medikamentenkonzentrationen in der Messkammer durchgeführt:

1. Simvastatin 10 µg/ml (200 µl der Vorratslösung in 20 ml)
2. Atorvastatin 25 µg/ml (200 µl der Vorratslösung in 20 ml)
3. Ciprofloxacin 0,2 mg/ml (2 ml der Vorratslösung in 20 ml)
4. Levofloxacin 0,5 mg/ml (2 ml der Vorratslösung in 20 ml)
5. Gemfibrozil 0,05 mg/ml (25 µl der Vorratslösung in 20 ml)
6. Gemfibrozil 0,1 mg/ml (50 µl der Vorratslösung in 20 ml)
7. Gemfibrozil 0,2 mg/ml (100 µl der Vorratslösung in 20 ml)
8. Gemfibrozil 0,4 mg/ml (200 µl der Vorratslösung in 20 ml)
9. Lösungsmittel für die Statine und Gemfibrozil: 1% Methanol (200 µl Methanol in 20ml)
10. Reine Krebs-Ringer Lösung (Lösungsmittel für die Fluorchinolone)

#### 2.4. Datenerfassung

Während des gesamten Versuchs zeichnet der PC sowohl Grundspannung und Kontraktionsamplitude, als auch die Kontraktilitätszeiten „time to peak tension“ 10 und 50 (TPT 10, TPT 50) sowie „relaxation time“ 50 und 10 (RT 50, RT 10) bei jeder Kontraktion auf und legt die Werte in einer Textdatei ab.

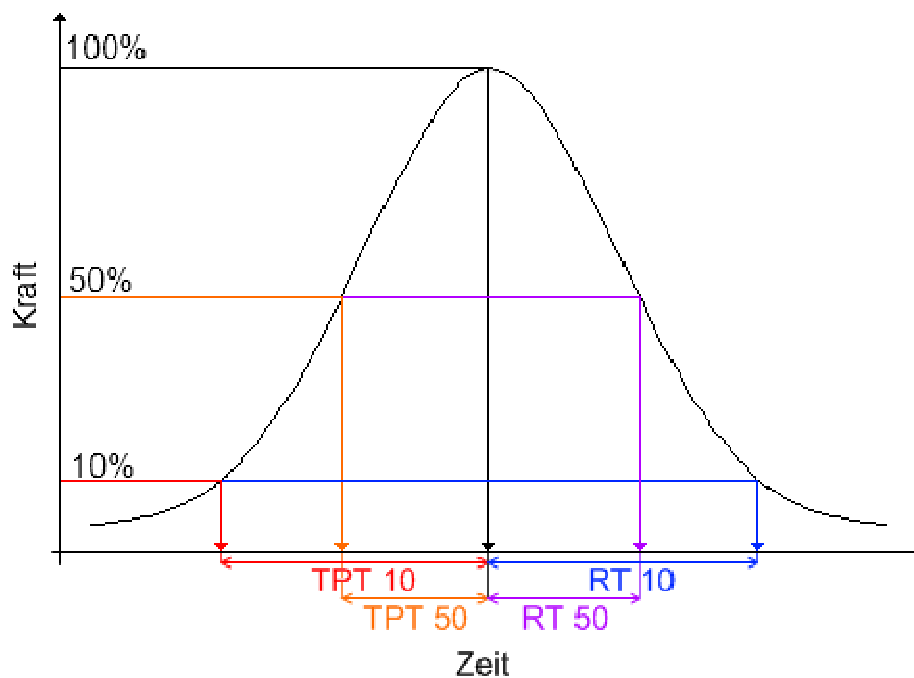


Abb. 2: Kontraktilitätszeiten einer einzelnen Muskelkontraktion.

## 2.5. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software „SPSS 13.0“ durchgeführt.

Zum Vergleich der Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Testgrößen verwendet. Dabei wurde ein  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet. Bei mehrfachen Tests zu einem Versuch wurde eine Adjustierung des  $\alpha$ -Fehlers mit Hilfe der Bonferroni-Holm-Prozedur vorgenommen.

Um eine Fokussierung auf die unmittelbaren Auswirkungen der Versuchsparameter zu erreichen, wurden alle statistischen Berechnungen sowohl mit den absoluten Werten als auch mit den Werten der relativen Änderung in Bezug auf den Versuchsstart durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Biometrische Daten

Es standen 30 Versuchstiere zur Verfügung. Davon waren 18 Tiere homozygote Träger der Arg615Cys-Mutation und damit suszeptibel für Maligne Hyperthermie (davon 5 männlich und 13 weiblich). Die anderen 12 (1 männlich und 11 weiblich) waren Wildtypen und wiesen die Mutation nicht auf.

Bezüglich des Gewichts der Tiere (Median MHS 30 kg, MHN 31 kg) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Für alle Versuche wurden Länge und Gewicht des verwendeten Muskelstücks protokolliert:

	Median Länge MHS [mm]	Median Länge MHN [mm]	Signifik. U-Test	Median Gewicht MHS [mg]	Median Gewicht MHN [mg]	Signifik. U-Test
Atorvastatin	19	21	0,241	540	560	0,212
Simvastatin	19	18,5	0,832	540	550	0,500
Methanol	20	21	0,487	560	530	0,488
Ciprofloxacin	19,5	18	0,707	540	545	0,278
Levofloxacin	20	18	0,080	530	530	0,894
Krebs-Ringer	21	19,5	0,242	565	535	0,281
Gemfibrozil 200µl	20	20	0,933	560	540	0,117
Gemfibrozil 100µl	21	20	0,218	555	560	0,634
Gemfibrozil 50µl	21	20	0,536	565	550	0,460
Gemfibrozil 25µl	22	21	0,389	555	560	0,510

Tabelle 1: Vergleich von Länge und Gewicht der untersuchten Muskelbündel von MHS- und MHN-Tieren.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass zwischen Länge und Gewicht der verwendeten MHS- und MHN-Muskelfasern kein signifikanter Unterschied bestand.

### 3.2. Ruhespannung

Im IVCT wird die Diagnose MHS oder MHN durch den Verlauf der Ruhespannung des Muskels gestellt. Diese stellte daher auch für unsere Versuche den wichtigsten Parameter dar.

Atorvastatin, Simvastatin, Levofloxacin und Ciprofloxacin verursachten dabei einen gegenüber MHN-Muskeln signifikanten Anstieg der Ruhespannung von MHS-Muskeln.

Die Kontrollversuche mit den Lösungsmitteln Methanol und Krebs-Ringer-Lösung zeigten diesen Unterschied nicht.



### 3.2.1. Atorvastatin

Nach Zugabe von Atorvastatin stieg die Ruhespannung der MHS-Gruppe im Median innerhalb von 90 Minuten um 41% an, von 17 mN auf 24 mN.

Nach 30 Minuten bestand ein signifikanter Unterschied zur Ruhespannung der MHN-Gruppe, der Median fiel dort um 27% ab, von 15 mN auf 11 mN.

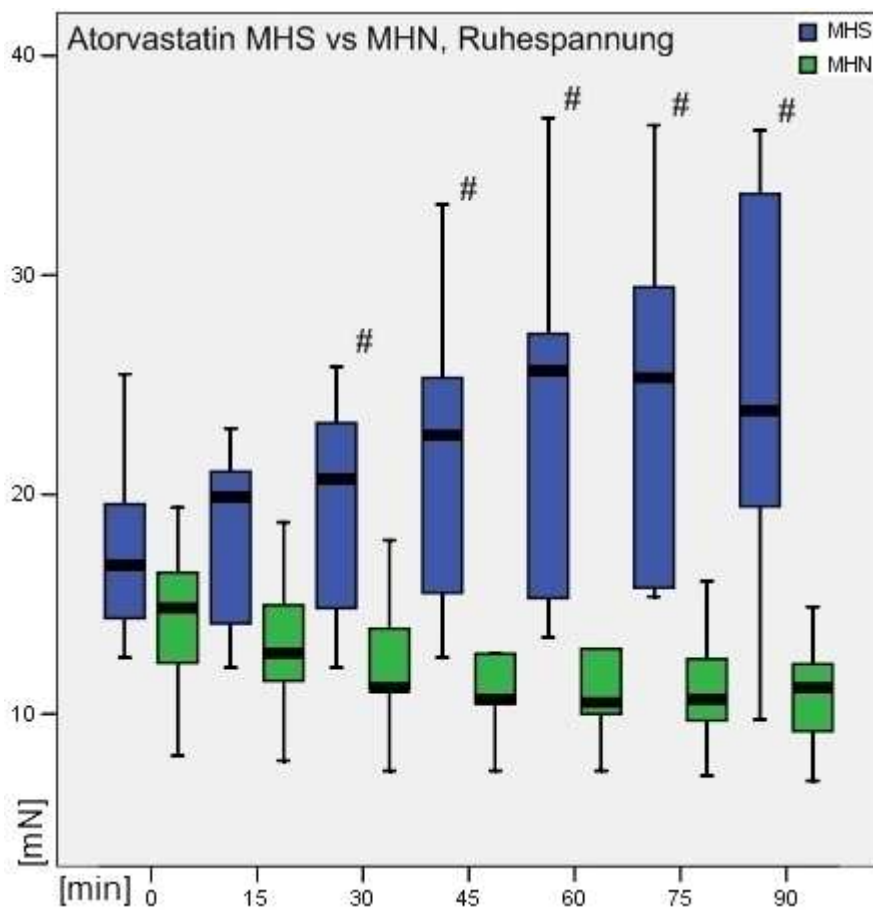


Abb. 3: Verlauf der Ruhespannung unter 25 µg/ml Atorvastatin.  
M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #: p<0,05 für MHS vs MHN.

### 3.2.2. Simvastatin

Nach Zugabe von Simvastatin stieg die Ruhespannung der MHS-Gruppe im Median innerhalb von 90 Minuten um 33% an, von 15 mN auf 20 mN.

Die Ruhespannung der MHN-Gruppe fiel um 8%, von 12 mN auf 11 mN.

Ein signifikanter Unterschied der Absolutwerte zwischen den beiden Gruppen ließ sich erst nach 75 Minuten zeigen und hielt bis zum Versuchsende an. Die relativen Änderungen boten allerdings schon nach 30 Minuten einen anhaltenden signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

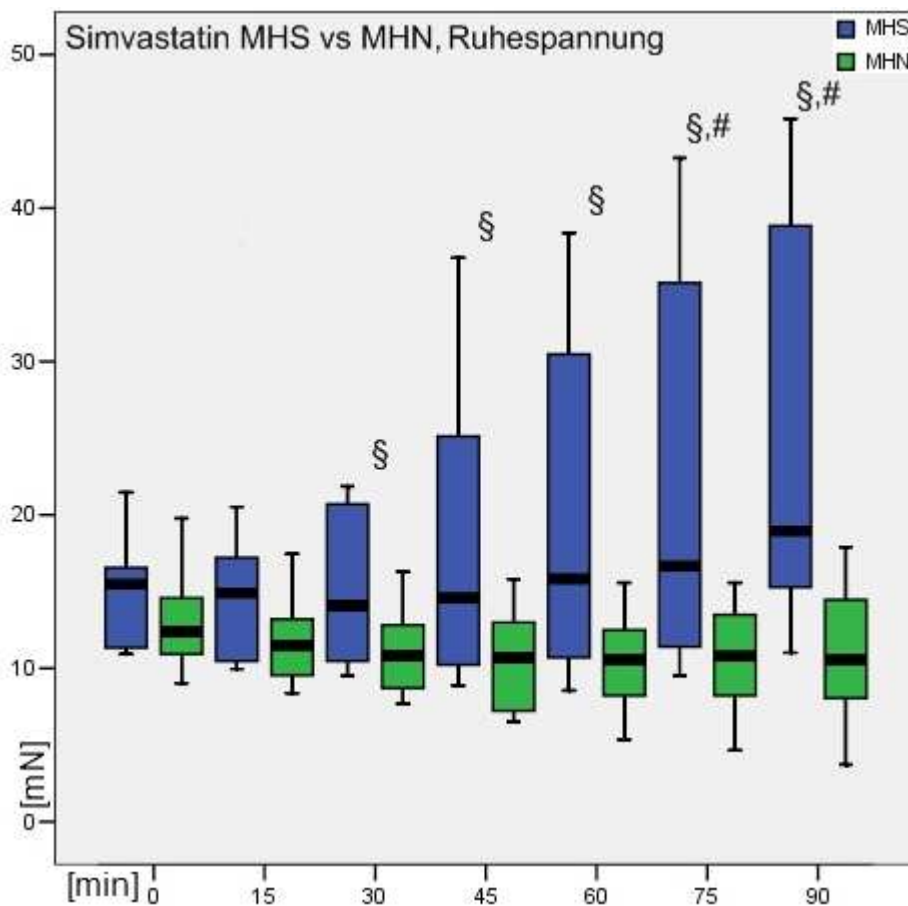


Abb. 4: Verlauf der Ruhespannung unter 10 µg/ml Simvastatin.  
M + Q25, Q75; MHN: n=10; MHS: n=11; #: p(absolut)<0,05 für MHS vs MHN; §: p(relativ)<0,05 für MHS vs MHN.

### 3.2.3. Ciprofloxacin

Nach Zugabe von Ciprofloxacin stieg die Ruhespannung der MHS-Gruppe im Median innerhalb von 90 Minuten um 71% an, von 14 mN auf 24 mN.

Die Ruhespannung der MHN-Gruppe fiel um 27%, von 15 mN auf 11 mN.

Für die Absolutwerte ließen sich keine signifikanten Unterschiede zeigen. Die Relativwerte zeigten aber beginnend von 30 Minuten bis zum Versuchsende einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen an.

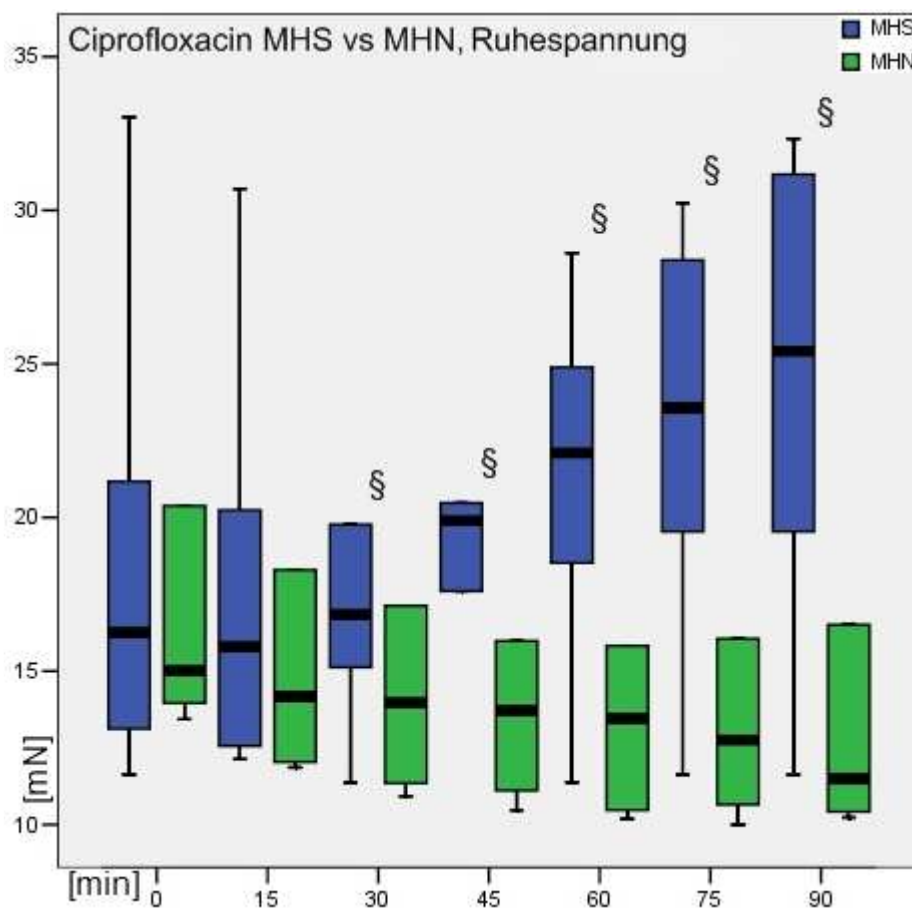


Abb. 5: Verlauf der Ruhespannung unter 0,2 mg/ml Ciprofloxacin.  
M + Q25, Q75; MHN: n=6; MHS: n=12; §: p(relativ)<0,05 für MHS vs MHN.

### 3.2.4. Levofloxacin

Nach Zugabe von Levofloxacin stieg die Ruhespannung der MHS-Gruppe im Median innerhalb von 90 Minuten um 100% an, von 15 mN auf 30 mN.

Die Ruhespannung der MHN-Gruppe fiel um 30%, von 13 mN auf 10 mN.

Ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN lag für die Absolutwerte nach 45 Minuten bis zum Versuchsende vor, bei den Relativwerten bereits nach 30 Minuten.

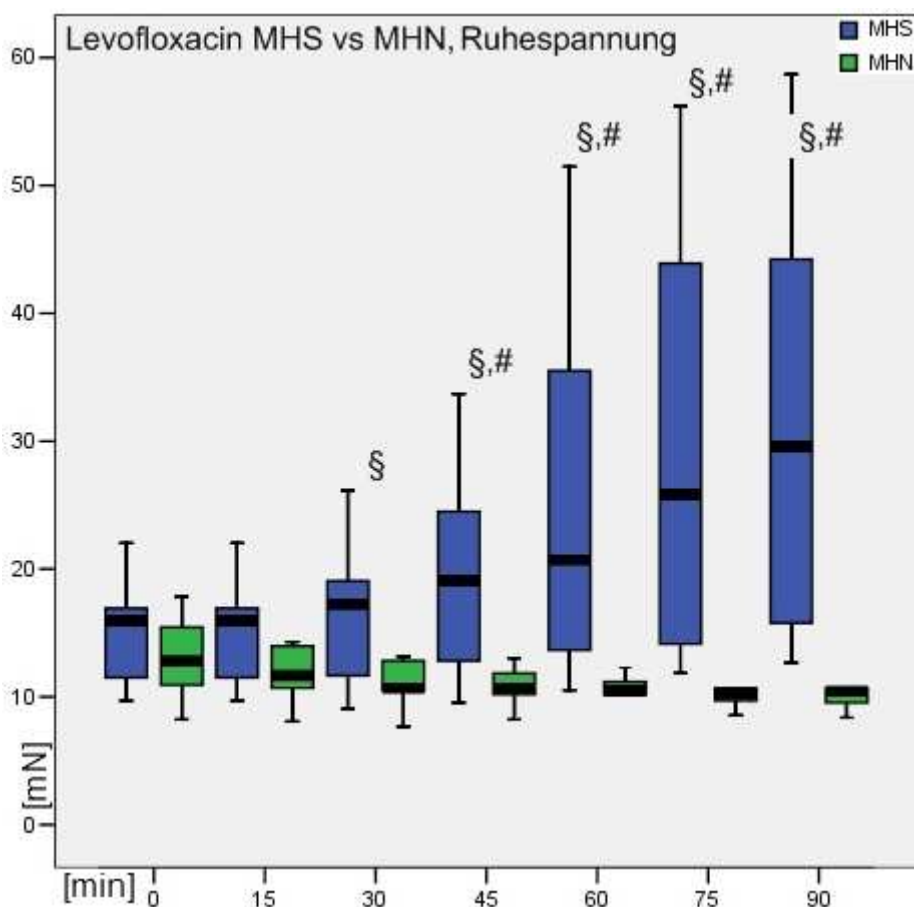


Abb. 6: Verlauf der Ruhespannung unter 0,5 mg/ml Levofloxacin.

M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #: p(absolut)<0,05 für MHS vs MHN; §: p(relativ)<0,05 für MHS vs MHN.

### 3.2.5. Methanol

Beide Statine waren für den Versuch in Methanol gelöst, deshalb wurden Kontrollversuche mit Methanol durchgeführt, um etwaige Einflüsse des Lösungsmittels aufzudecken.

Nach Zugabe von Methanol stieg die Ruhespannung der MHS-Gruppe im Median innerhalb von 90 Minuten um 25% an, von 12 mN auf 15 mN.

Die Ruhespannung der MHN-Gruppe fiel um 31%, von 13 mN auf 9 mN.

Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN vor.

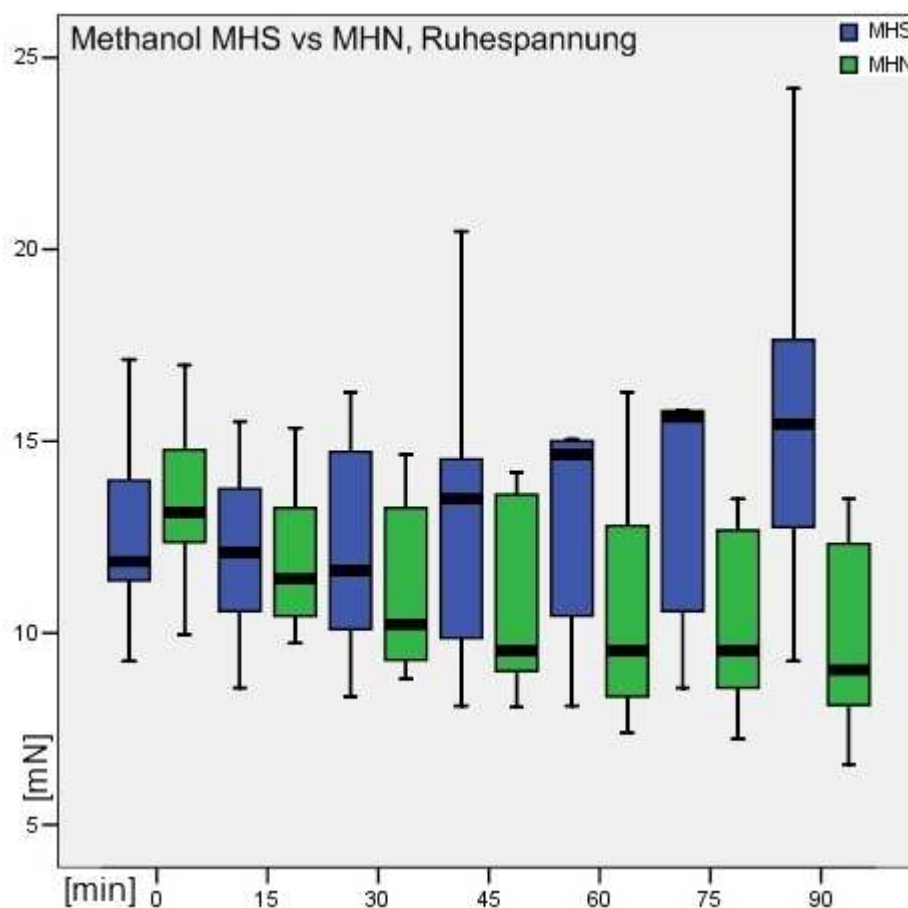


Abb. 7: Verlauf der Ruhespannung unter 1% Methanol.

M + Q25, Q75; MHN: n=7; MHS: n=10; ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN lag nicht vor.

### 3.2.6. Krebs-Ringer-Lösung

Um Einflüsse des Lösungsmittels der Fluorchinolone zu erkennen, wurde eine separate Versuchsreihe mit Krebs-Ringer-Lösung durchgeführt.

Hierbei stieg die Ruhespannung der MHS-Gruppe im Median innerhalb von 90 Minuten um 31% an, von 16 mN auf 21 mN.

Die Ruhespannung der MHN-Gruppe hielt sich konstant bei 13 mN.

Bereits bei Start des Versuchs lag ein signifikanter Unterschied der absoluten Werte zwischen der MHS und MHN-Gruppe vor, der auch über die gesamte Versuchsdauer bestehen blieb. Die relative Veränderung der Ruhespannung beider Gruppe wies jedoch keinen signifikanten Unterschied auf.

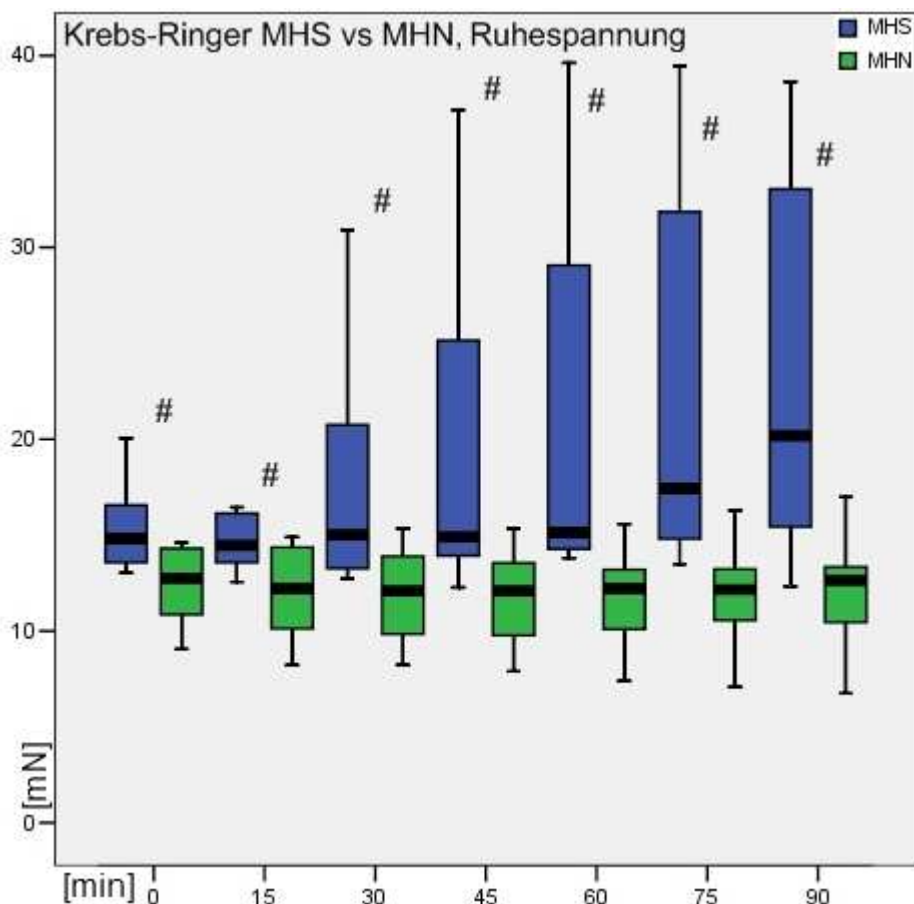


Abb. 8: Verlauf der Ruhespannung unter Krebs-Ringer-Lösung.  
M + Q25, Q75; MHN: n=8; MHS: n=10; #:  $p(\text{absolut}) < 0,05$  für MHS vs MHN.

### 3.3. Kontraktionsamplitude

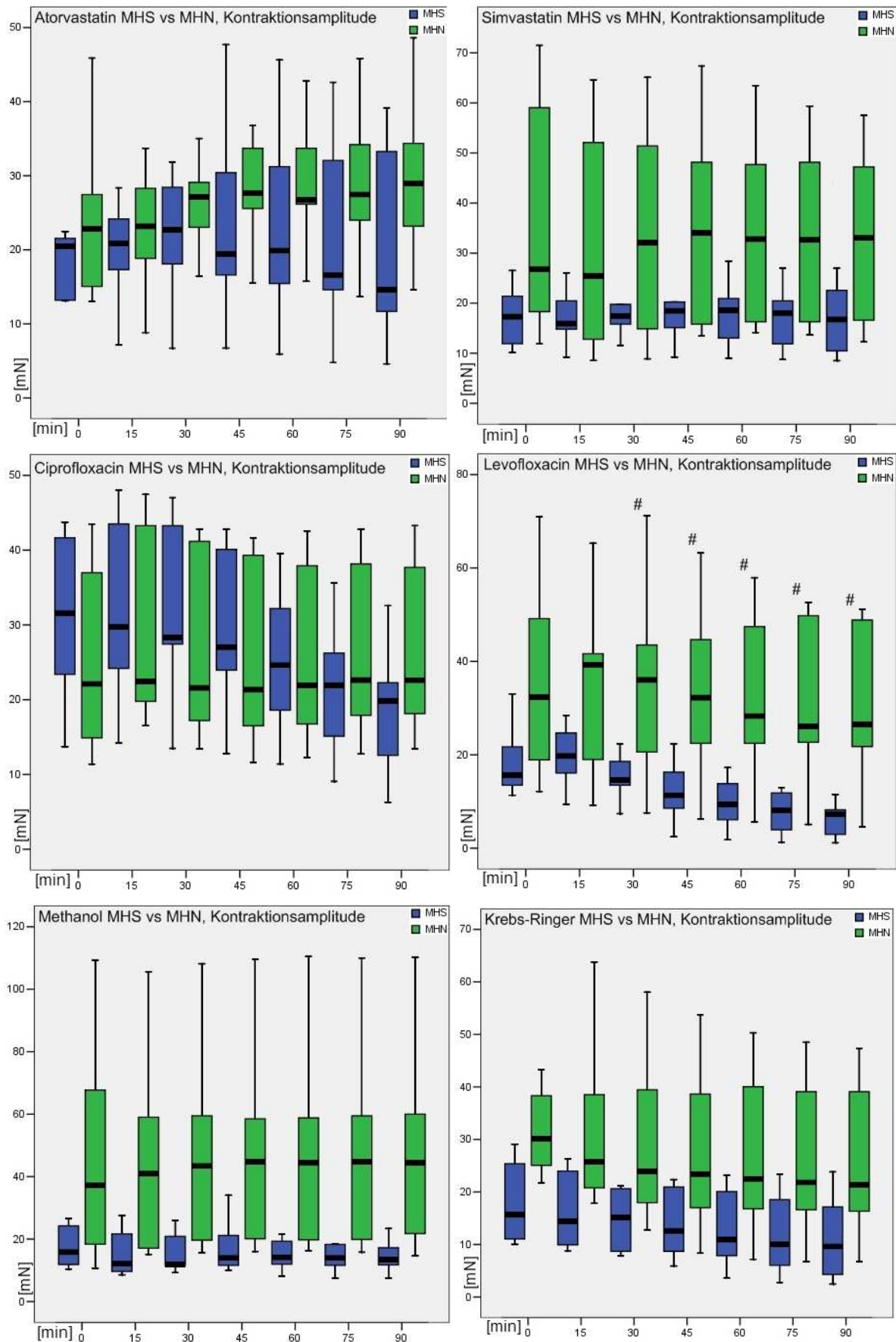
Die Kontraktionsamplitude verhielt sich abgesehen von Levofloxacin bei allen Versuchen identisch: Die Amplitude der MHN-Gruppe stieg leicht an, während sie bei der MHS-Gruppe abfiel.

Ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN konnte nicht nachgewiesen werden.

Einzigste Ausnahme bildete die Versuchsreihe mit Levofloxacin. Hier fiel die Amplitude bei beiden Gruppen ab. Der Abfall in der MHS-Gruppe war dabei signifikant stärker.

	N		Kontraktionsamplitude bei Versuchsbeginn	Kontraktionsamplitude nach 90 Minuten
Atorvastatin	9	MHN	23 (15;27)	29 (23;34)
	9	MHS	20 (13;22)	15 (12;33)
Simvastatin	10	MHN	27 (19;55)	33 (17;46)
	11	MHS	18 (14;22)	17 (11;24)
Ciprofloxacin	6	MHN	22 (16;34)	23 (18;35)
	12	MHS	24 (13;38)	17 (11;23)
Levofloxacin	9	MHN	32 (19;49)	27 (22;49)
	9	MHS	16 (13;22)	7* (3;8)
Methanol	7	MHN	23 (23;52)	28 (27;31)
	10	MHS	28 (24;70)	32 (27;45)
Krebs-Ringer-Lösung	8	MHN	30 (26;36)	21 (17;38)
	10	MHS	18 (11;27)	10 (6;22)

**Tabelle 2: Kontraktilitätsamplitude. M + Q25, Q75 bei Versuchsbeginn und Ende; \*: p<0,05 MHS vs MHN.**

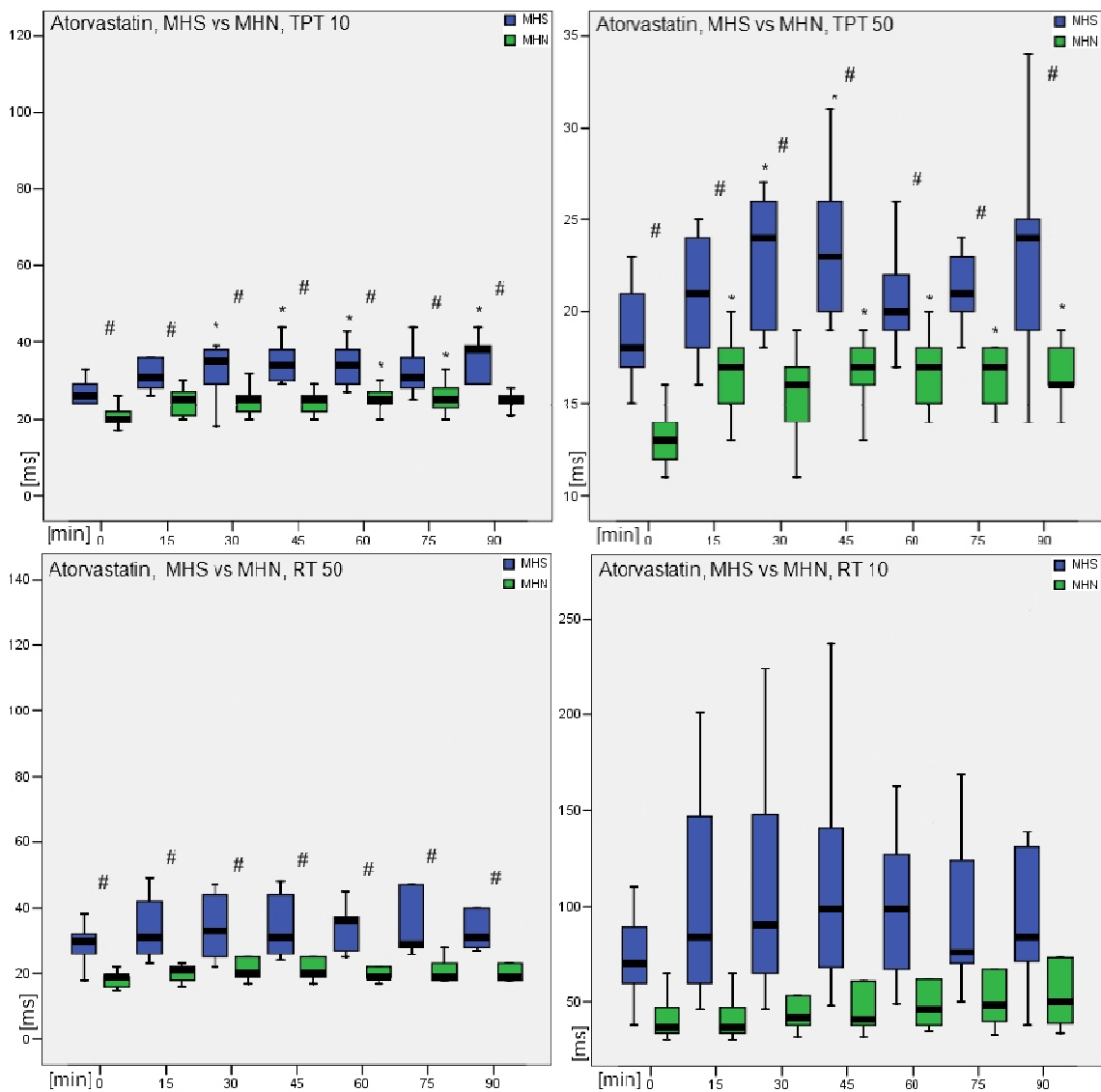


**Abb. 9: Verlauf der Kontraktionsamplituden.**  
M + Q25, Q75; n: s. jeweilige Abb. zur Ruhespannung; #: p<0,05 MHS vs MHN.

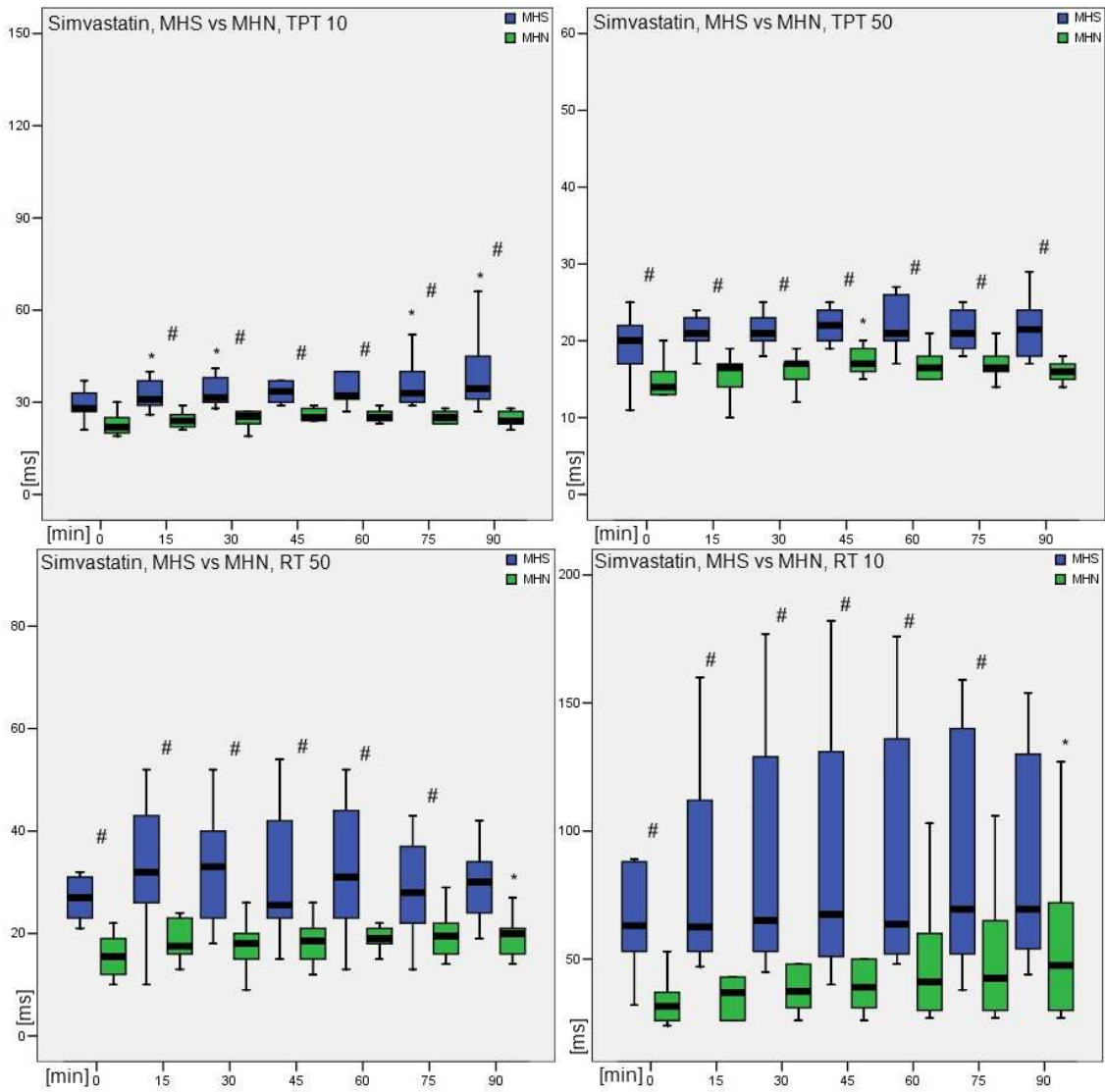


### 3.4. Kontraktilitätszeiten

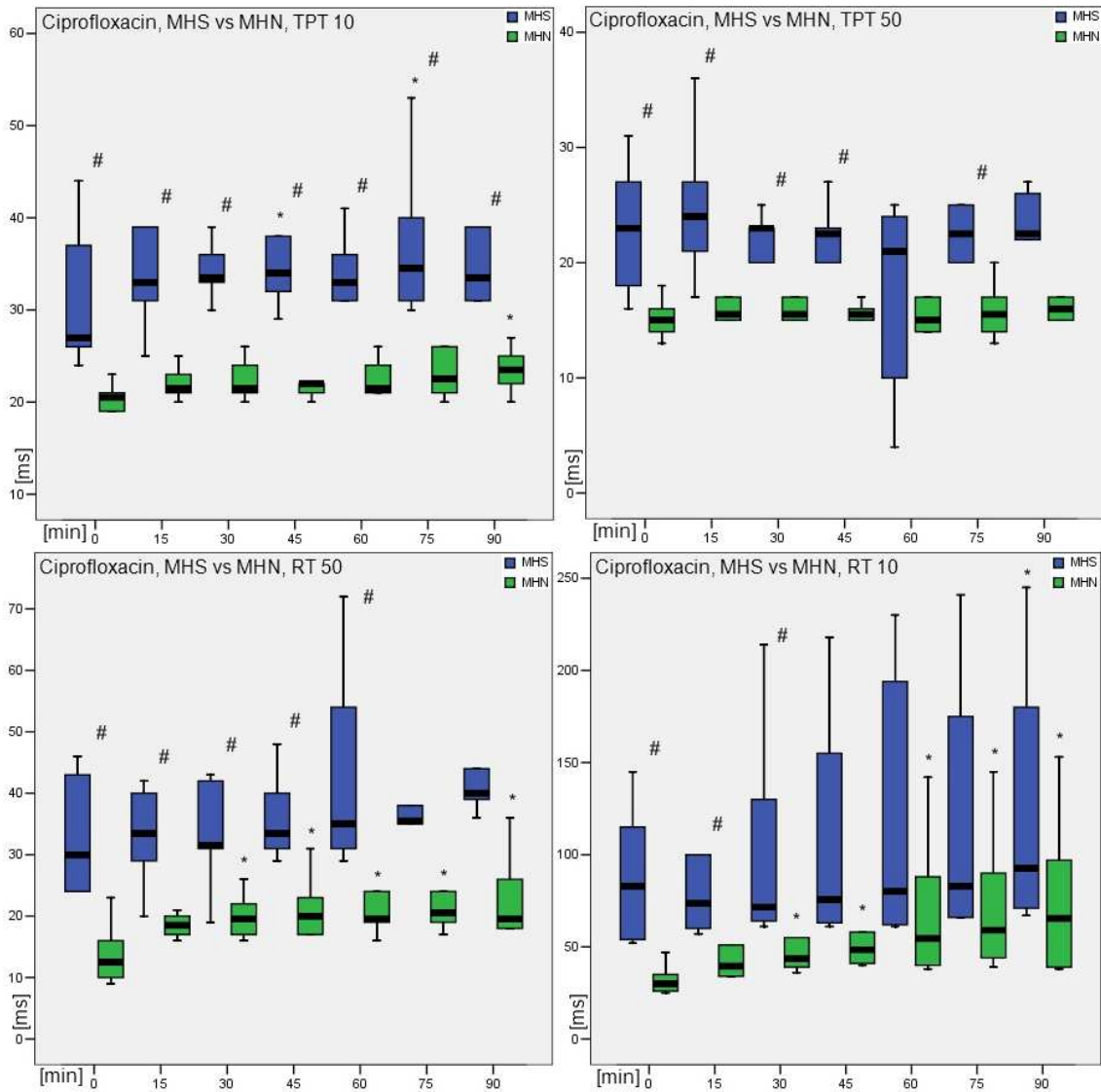
Zusätzlich zu Ruhespannung und Kontraktionsamplitude wurden für jeden Versuch die Kontraktilitätszeiten (TPT 10, TPT 50, RT 50, RT10) protokolliert. Die Abbildungen 10-13 zeigen die Kontraktilitätszeiten unter Atorvastatin, Simvastatin, Ciprofloxacin und Levofloxacin.



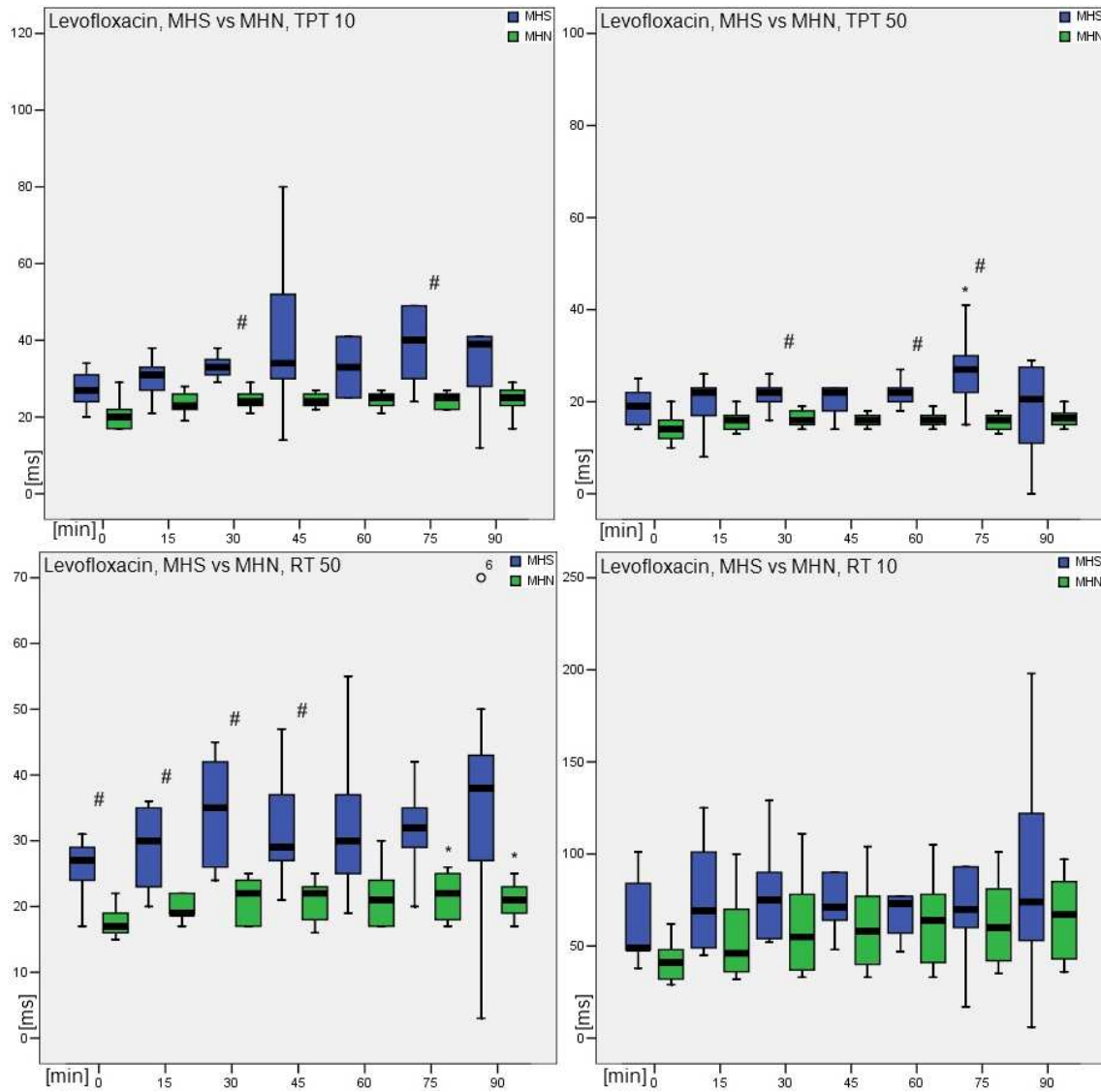
**Abb. 10: Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Atorvastatin.**  
M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #: p<0,05 MHS vs MHN; \*: p<0,05 vs 0min.



**Abb. 11: Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Simvastatin.**  
M + Q25, Q75; MHN: n=10; MHS: n=11; #:  $p < 0,05$  MHS vs MHN; \*:  $p < 0,05$  vs 0min.



**Abb. 12: Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Ciprofloxacin.**  
M + Q25, Q75; MHN: n=6; MHS: n=12; #: p<0,05 MHS vs MHN; \*:p<0,05 vs 0min.



**Abb. 13: Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Levofloxacin.**  
M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #: p<0,05 MHS vs MHN; \*: p<0,05 vs 0min.

Für weitere statistische Berechnungen wurden die Kontraktilitätszeiten zusätzlich in Bezug zur Kontraktionsamplitude gesetzt, da eine erhöhte Amplitude automatisch auch erhöhte Zeiten bedingt.

Lag bereits zu Versuchsbeginn ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN vor, so wurde wie schon bei Ruhespannung und Kontraktionsamplitude die relative Veränderung des Faktors Kontraktilitätszeit/Kontraktionsamplitude berechnet und für die Statistik verwendet.

Ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN nach 90 Minuten konnte so für folgende Versuche/Zeiten nachgewiesen werden:

Atorvastatin: RT 10

Simvastatin: TPT 10

Ciprofloxacin: TPT 10, TPT 50

Levofloxacin: TPT 10, RT 50, RT 10

### 3.5. Gemfibrozil

Die anfänglich gewählte Konzentration von 0,4 mg/ml in der Testkammer zeigte erhebliche Abfälle der Kontraktionsamplitude schon nach kurzer Zeit. Es wurden deshalb drei weitere Versuchsreihen angelegt, um die Testsubstanz in absteigender Konzentration (0,2 mg/ml – 0,1 mg/ml – 0,05 mg/ml) zu untersuchen.

Folgende Tabelle zeigt den beobachteten Abfall der Kontraktilitätsamplitude. Dieser fiel bei sinkender Konzentration schwächer aus.

Zudem war der Abfall in der MHS-Gruppe ausgeprägter als in der MHN-Gruppe.

	0,05 mg/ml	n	0,1 mg/ml	n	0,2 mg/ml	n	0,4 mg/ml	n
MHS	89,5 min	8	28 min	8	10,5 min	7	6 min	8
MHN	> 90 min	9	50,5 min	8	23,5 min	6	15,5 min	9

**Tabelle 3: Zeit (Median) bis zum Absinken der Kontraktilitätsamplitude unter 50% des Anfangswertes.**

Für Beobachtungen bezüglich Grundspannung, Kontraktilitätsamplitude und Kontraktilitätszeiten wurde die geringste Konzentration (0,05 mg/ml) ausgewählt.

### Verlauf der Ruhespannung

Nach Zugabe von Gemfibrozil stieg die Ruhespannung der MHS-Gruppe im Median innerhalb von 90 Minuten um 25% an, von 16 mN auf 20 mN.

Die Ruhespannung der MHN-Gruppe fiel um 8%, von 13 mN auf 12 mN.

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ließ sich nicht nachweisen.

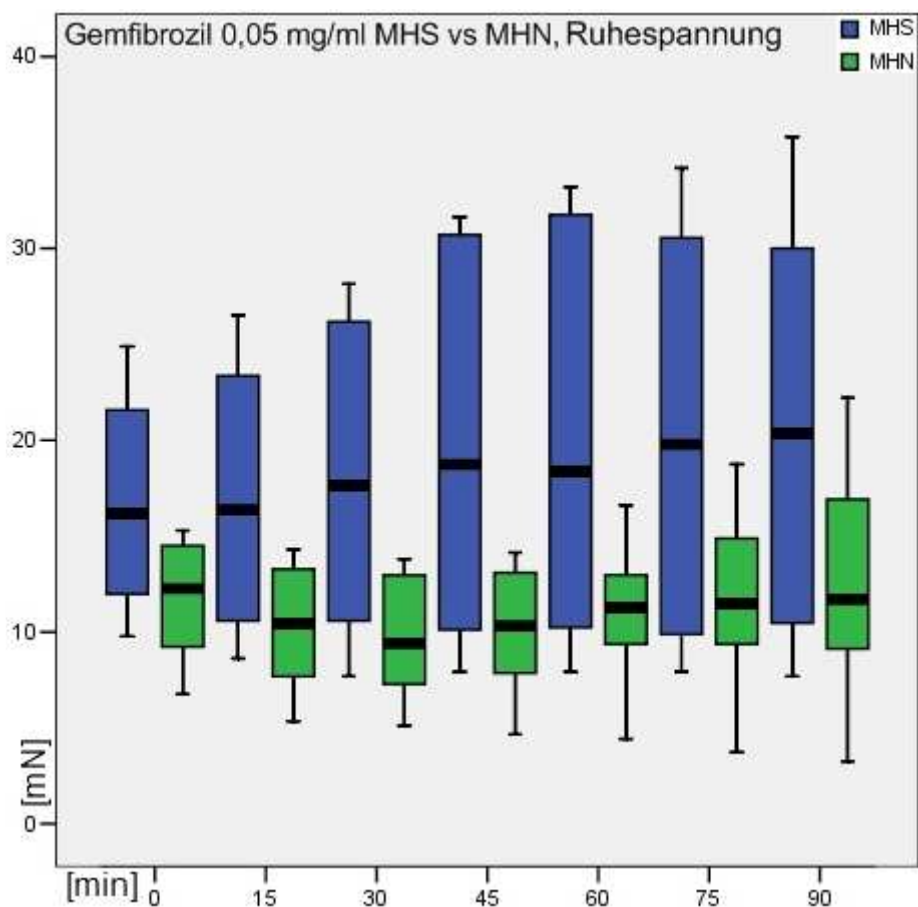


Abb. 14: Verlauf der Ruhespannung unter 0,05mg/ml Gemfibrozil.

M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=8; ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN lag nicht vor.

### Verlauf der Kontraktionsamplitude sowie der Kontraktilitätszeiten

Die Kontraktilitätsamplitude zeigte den schon beschriebenen Abfall: Der Median der MHS-Gruppe fiel um 24%, von 21 mN auf 16 mN. Der Median der MHN-Gruppe fiel von 54 mN auf 33 mN ab (39%).

Die Statistik ergab signifikante Unterschiede der Absolutwerte nach 0, 15, 45, 60 und 75 Minuten. Bei der Betrachtung der Relativwerte zeigten sich die Unterschiede jedoch nicht mehr als signifikant.

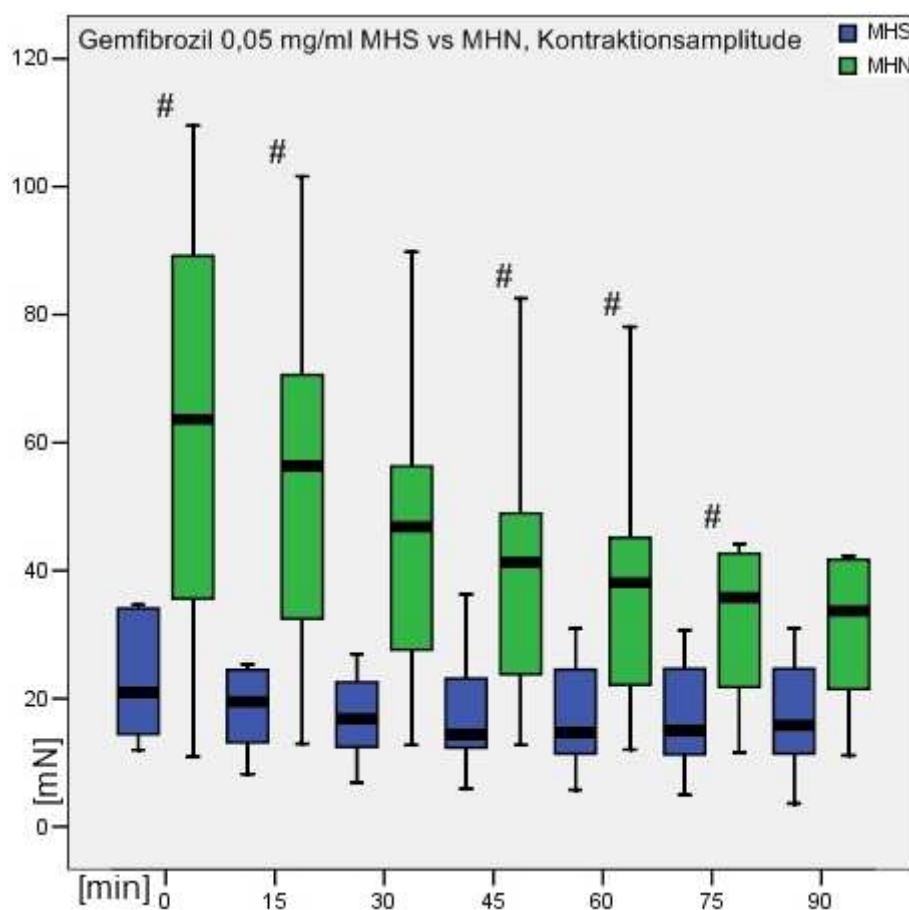


Abb. 15: Verlauf der Kontraktionsamplitude unter 0,05mg/ml Gemfibrozil. M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=8; #: p(absolut)<0,05 MHS vs MHN.



Die Kontraktilitätszeiten der MHS-Mediane lagen fast ausschließlich über denen der MHN-Gruppe (einzige Ausnahme: RT 10 bei 15, 30 und 45 min). Während für die Parameter TPT 10, MHS und MHN und TPT 50, MHN Anstiege protokolliert wurden (TPT 10: MHS von 28,5 auf 31,5 ms, MHN von 23 auf 26 ms; TPT 50: MHN von 15 auf 17 ms), fielen die TPT 50, MHS und RT-Parameter im Verlauf des Versuchs ab (TPT 50: MHS von 20 auf 17 ms; RT 50: MHS von 25,50 auf 24,50 ms, MHN von 20 auf 19 ms; RT 10: MHS von 66,50 auf 49,50 ms, MHN von 52 auf 43 ms).

Die Statistik ergab mit einer einzigen Ausnahme (TPT 10 bei 0 min) keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

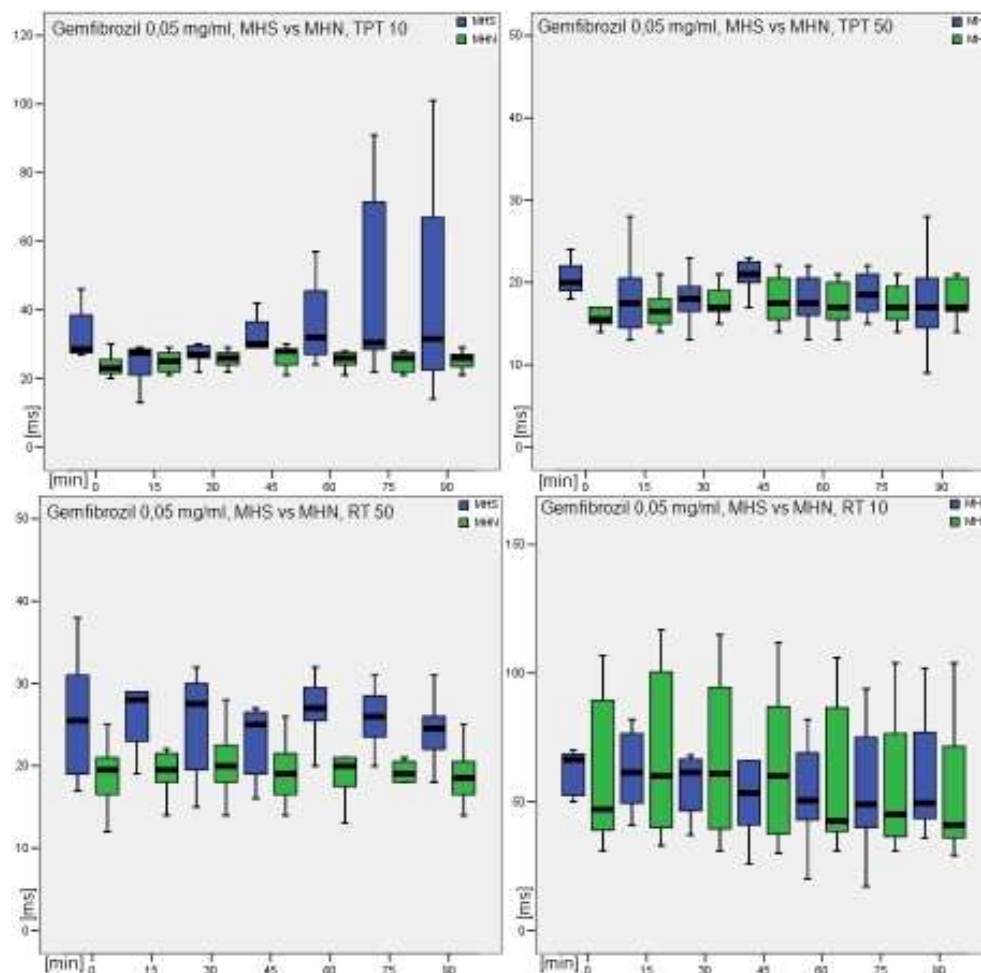


Abb. 16: Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter 0,05mg/ml Gemfibrozil. M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=8.

#### 4. Diskussion

Der entscheidende Parameter für die Diagnosestellung einer Veranlagung zur MH durch den IVCT ist die Ruhespannung des Muskels. Gemäß dem europäischen IVCT-Protokoll folgt die Diagnose MHS aus einem Anstieg der Ruhespannung des Muskels um 2 mN bei einer Konzentration von maximal 2,0 mmol/l Koffein und maximal 0,44 mmol/l Halothan [10].

Wir konnten in unseren Versuchen bei den MHS-Muskeln einen Anstieg der Grundspannung durch Atorvastatin, Simvastatin, Ciprofloxacin und Levofloxacin provozieren. Dieser unterschied sich signifikant von den entsprechenden Daten der MHN-Muskeln.

In den Kontrollversuchen mit den Lösungsmitteln der verwendeten Substanzen, Methanol und Krebs-Ringer-Lösung, bestand kein sicher nachweisbarer Unterschied zwischen den Gruppen. Der Auslöser für den Anstieg der Ruhespannung kann deshalb bei den Medikamenten selbst vermutet werden.

Die Substanz Gemfibrozil hatte hingegen keine Auswirkungen auf die Ruhespannung, jedoch verursachte sie eine dosisabhängige Reduktion der Kontraktilitätsamplitude. Das wirft die Frage auf, ob Gemfibrozil direkt toxisch auf Myozyten wirkt.

#### 4.1. Statine

Es wurde bereits im Oktober 2005 beschrieben, dass Atorvastatin die Ruhespannung eines MHS-Muskels im IVCT signifikant gegenüber MHN erhöht[49]. Die Autoren entwarfen zur Veranschaulichung ein Diagramm, welches die Unterschiede zwischen MHS und MHN sowie zwischen Methanol und Atorvastatin verdeutlicht.

Diese Ergebnisse konnten von uns bestätigt werden:

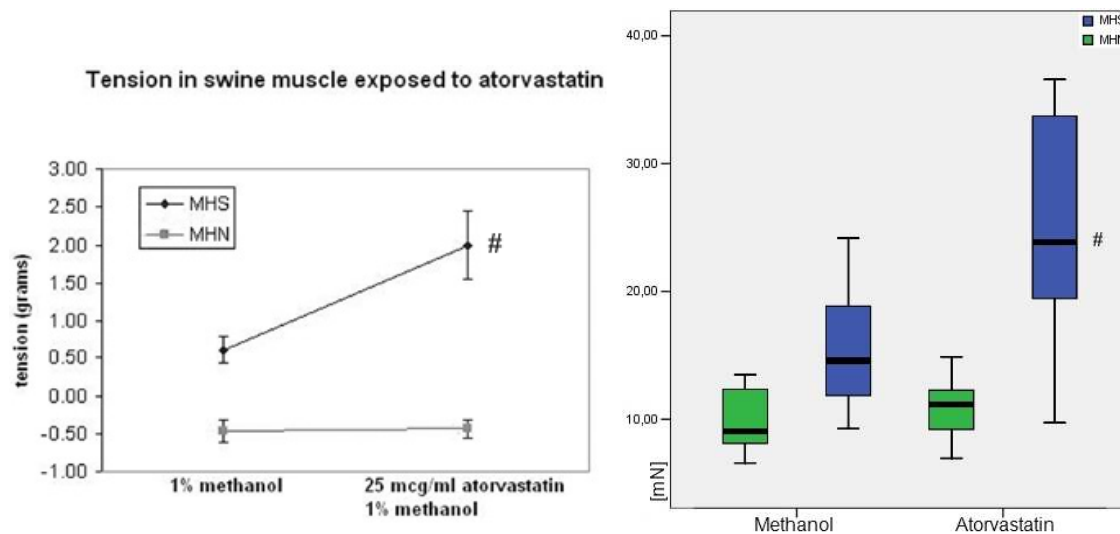


Abb. 17: Vergleich der vorangehenden Studie [49] (links) mit den Ergebnissen unserer Experimente (rechts).

Die grafische Überlagerung der Ergebnisse ist klar erkennbar.

links: MHN: n=4; MHS: n=3; #: p<0,05 Methanol vs Atorvastatin;

rechts: Methanol: MHN: n=7; MHS: n=10; Atorvastatin: MHN: n=9; MHS: n=9; #: p<0,05 Methanol vs Atorvastatin.

Die Ruhespannung fiel bei allen mit Atorvastatin getesteten MHN-Muskeln ab, wohingegen sie mit nur einer Ausnahme bei allen MHS-Muskeln anstieg.

Im Folgenden werden die Mechanismen einer durch Statine hervorgerufenen Muskelschädigung im Allgemeinen sowie im Bezug auf die MH diskutiert.

Die aktuell am häufigsten beschriebene Begründung für Statin-assoziierte Rhabdomyolyse ist die Blockade des CYP450 3A4 Systems, dem wichtigsten Abbauweg der Statine[53-55]. Dabei werden, durch verlangsamte Verstoffwechslung verursachte, erhöhte Plasmaspiegel der Statine für eine Muskelschädigung verantwortlich gemacht. So erklärt man sich beispielsweise die Aggravierung einer unter Cerivastatin aufgetretenen Muskelschädigung durch eine Kombinationstherapie mit Gemfibrozil, welches über den gleichen Stoffwechselweg abgebaut wird[56].

Der genaue Mechanismus der Muskelschädigung durch Statine ist bislang nicht bekannt. Man geht derzeit von einer multifaktoriellen Genese aus. Diskutiert werden dabei vor allem durch den erwünschten Wirkmechanismus der Statine begründete Nebeneffekte, an erster Stelle stehen dabei (1)Defekte der Membranstruktur und (2)mitochondriale Dysfunktion:

(1)Die erwünschte Wirkung der Statine ist eine Reduktion des Cholesterinspiegels. Da Cholesterin ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembran ist, werden im Zusammenhang mit Statinen eine Veränderung der elektrischen Eigenschaften sowie ein Verlust der Barrierefunktion erwogen[57, 58].

(2)Das Endprodukt der HMG-CoA Reduktase ist Mevalonat, eine Vorstufe von Ubichinon. Ubichinon wird in der Atmungskette als Elektronenakzeptor benötigt. Ein Mangel kann deshalb zum Erliegen der Atmungskette und zur Entleerung der zellulären ATP-Speicher führen. Die Folgen wären der Zusammenbruch des Membranpotentials und Nekrose.

Es konnte zwar bereits mehrfach gezeigt werden, dass die intrazellulär benötigte Konzentration von Ubichinon durch Statine nicht gesenkt wird[59-61], dennoch bleibt der Mangel an metabolischen Zwischenprodukten ein Ansatzpunkt für die Ursache von Statin-assoziierten Rhabdomyolysen. Neben Mevalonat und Ubichinon werden hier noch weitere Stoffwechselprodukte der HMG-CoA Reduktase diskutiert, beispielsweise Farnesylpyrophosphat und Geranylgeraniol[62].

Die Theorie der multifaktoriellen Genese wird von einer Reihe weiterer Beobachtungen unterstützt:

So konnten Thompson et al. zeigen, dass der durch schwere Muskelarbeit verursachte muskuläre Schaden unter einer Statintherapie verschlimmert wird[63].

Zudem wurde beobachtet, dass Faktoren wie ein hohes Alter, eine gebrechliche Konstitution oder eine Multisystemerkrankung die Entstehung von Rhabdomyolysen unter einer Statintherapie begünstigen[55].

Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten von Rhabdomyolysen unter Statintherapie mit der Höhe der Dosis[55].

Vor dem Hintergrund einer multifaktoriellen Genese für Statin-assoziierte Rhabdomyolysen muss also auch folgende Frage erörtert werden: Stellt eine MH Veranlagung einen zusätzlichen begünstigenden Faktor für eine Rhabdomyolyse unter Statintherapie dar?

Im Brennpunkt des Interesses der MH-Forschung steht der RYR1. Es konnte gezeigt werden, dass in MHS Muskelzellen eine Dysfunktion dieses Rezeptors vorliegt. Sie äußert sich durch eine erhöhte Durchlässigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$  im Ruhezustand sowie durch einen erniedrigten Schwellenwert für die  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR[18].

Deshalb ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der MHS Muskelzelle labiler als die des gesunden Muskels. Eine zusätzliche, von einer gesunden Zelle kompensierbare Beeinträchtigung kann so in Verbindung mit dem erniedrigten Schwellenwert zu einer Entgleisung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsels führen. Die Folge ist die dauerhafte Kontraktion und im IVCT ein Anstieg der Ruhespannung.

Aufgrund unserer Ergebnisse ist es folglich denkbar, dass die Mechanismen, welche die Nebenwirkung der Muskelschädigung bei Statinen auslösen, eine solche Beeinträchtigung darstellen. Somit wären Patienten mit Veranlagung zur MH unter einer Therapie mit Statinen einem höheren Risiko für Rhabdomyolysen ausgesetzt.

## 4.2. Fluorchinolone

Durch Behandlung mit Fluorchinolonen verursachte Rhabdomyolysen wurden in den vergangenen Jahren mehrfach publiziert[64, 65], auch ein Zusammenhang zur MH ist dokumentiert. So wurde bei einem 33-jährigen Patienten die Veranlagung zur MH mittels IVCT diagnostiziert, nachdem er durch Myalgien und Rhabdomyolyse unter der Behandlung mit Norfloxacin aufgefallen war[66].

Unsere Versuche unterstützen die Vermutung, dass ein MHS-Muskel auf die zusätzliche Belastung durch ein Fluorchinolon nicht adäquat reagieren kann.

Ein signifikanter Unterschied der relativen Veränderung der Ruhespannung nach 90 Minuten konnte zwischen MHS und MHN-Muskeln nachgewiesen werden und lag im Kontrollversuch mit dem Lösungsmittel (Krebs-Ringer) nicht vor.

Der Mechanismus der Muskelschädigung durch Fluorchinolone ist nicht geklärt, es fehlen klare Dokumentationen dieser unerwünschten Arzneimittelwirkung[66]. Es besteht jedoch eine theoretische Erklärung für die ansteigende Muskelkontraktur in der Tatsache, dass Fluor einen Hemmstoff der SERCA darstellt[50, 51].

### 4.3. Fluor als Hemmstoff der SERCA

Eine Theorie für den Anstieg der Ruhespannung des Muskels liefern die Beobachtungen von Murphy und Coll[50, 51], die Fluor als einen Hemmstoff der SERCA identifizierten. Dieses Enzym kann als Gegenspieler des RYR1 betrachtet werden: Es pumpt Kalzium aus der Zelle zurück in das SR.

Tong et al. zeigten eine Steigerung der Expression von SERCA im Muskel mit geschädigtem  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel[67]. Durch die auf diese Weise gesteigerte Rückresorption von  $\text{Ca}^{2+}$  ins SR kann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase aufrechterhalten werden. Die erhöhte Durchlässigkeit der RYR1 bei der MH ist so kompensierbar.

Eine Blockade der SERCA könnte im MHS-Muskel also zu einem vollständigen Entgleisen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase führen.

Zusätzlich ist die Schwelle der  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch den RYR1 bei vorliegender MH-Prädisposition herabgesetzt[19, 20]. Ein durch Blockade der SERCA erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel kann deshalb wesentlich schneller zu einem überschießenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führen als beim gesunden Muskel.

Wie die Gruppe der volatilen Anästhetika, welche als Auslöser für eine MH-Krise gesichert sind, sind auch Atorvastatin, Levofloxacin und Ciprofloxacin fluoridierte Verbindungen.

Der gegenüber MHN-Muskeln signifikante Anstieg der Grundspannung von MHS-Muskeln könnte seine Ursache also in einer Blockade der SERCA durch das enthaltene Fluor haben.

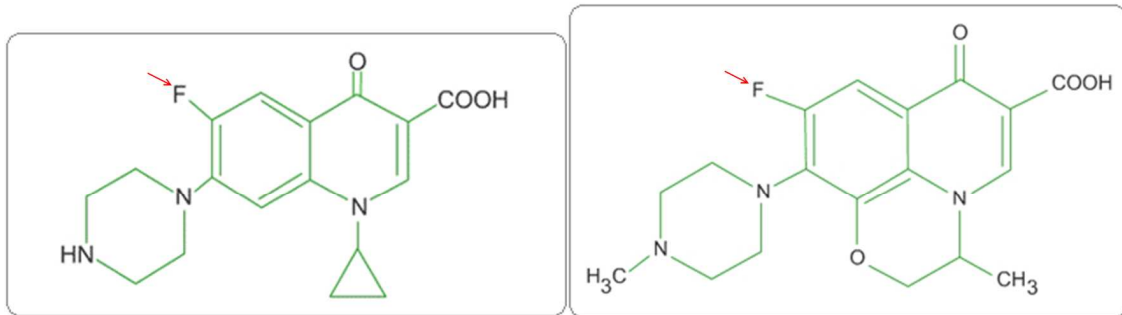


Abb. 18: Chemische Struktur der Fluorchinolone, links Ciprofloxacin, rechts Levofloxacin.

Wir konnten allerdings zeigen, dass diese Theorie keine abschließende Erklärung für den Anstieg der Ruhespannung im MH-Muskel liefert, denn dieser Anstieg wurde in unseren Versuchen auch durch Simvastatin ausgelöst. Simvastatin ist nicht fluoriert.

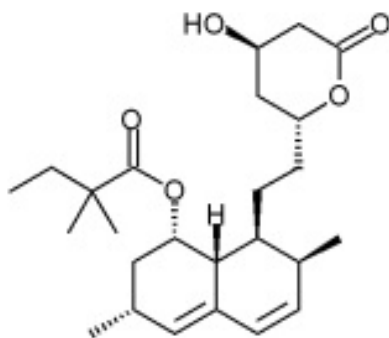


Abb. 19: Chemische Struktur von Simvastatin. Es ist kein Fluor enthalten.

#### 4.4. Gemfibrozil

In den USA wurden 31 Fälle fataler Rhabdomyolysen unter Cerivastatin registriert. Zwölf der Patienten hatten eine Kombinationstherapie mit Gemfibrozil erhalten[68]. In der Folge wurde dieser Zusammenhang intensiv untersucht. Als eine Ursache fand man den gemeinsamen Abbauweg beider Medikamente. Wird das CYP 450 3A4 System durch Gemfibrozil blockiert, kann es zur Kumulation von Cerivastatin im Organismus kommen[56].

Ein geringes Risiko (<1%) für Myopathien wird jedoch auch den Fibraten selbst zugeschrieben, denn eine häufiger beobachtete unerwünschte Arzneimittelwirkung



dieser Substanzgruppe ist die Erhöhung der Kreatininkinase im Serum – ein Zeichen von Muskelzelluntergang[69].

Eine Alternative zu Gemfibrozil bietet das Fenofibrat, welches nicht über das CYP450 3A4 System abgebaut wird[69]. Dennoch wird aktuell eher zur Verwendung von Gemfibrozil geraten, denn insgesamt bietet dieses Medikament das günstigere Nebenwirkungsprofil[70].

Bei den Versuchen mit 0,4 mg/ml beobachteten wir einen rapiden Abfall der Kontraktionsamplitude, der auf einen toxischen Effekt des Gemfibrozils schließen läßt. Eine stabile Kontraktionsamplitude, das heißt mindestens 50% des Ausgangswertes über die gesamte Versuchsdauer, lag bei einer Dosis von 0,05 mg/ml vor. Diese Dosis verwendeten wir für die Analyse der Ruhespannung.

Unsere Fragestellung war, ob Gemfibrozil im IVCT einen dem Halothan ähnlichen Effekt auf MHS-Muskeln hat. Das konnten wir nicht bestätigen, die Ruhespannungen von MHS und MHN-Muskeln zeigten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Gemfibrozil scheint den  $Ca^{2+}$ -Stoffwechsel der Zelle somit nicht zu beeinflussen.

#### 4.5. Kontraktilitätszeiten

Neben Ruhespannung und Kontraktionsamplitude werden im IVCT auch die Kontraktilitätszeiten aufgezeichnet. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, handelt es sich dabei um die Zeit von 10% bzw. 50% Anspannung bis zur maximalen Kontraktion des Muskels (=time to peak tension, TPT) und wiederum von maximaler Kontraktion bis 50% bzw. 10% der Restspannung (=relaxation time, RT).

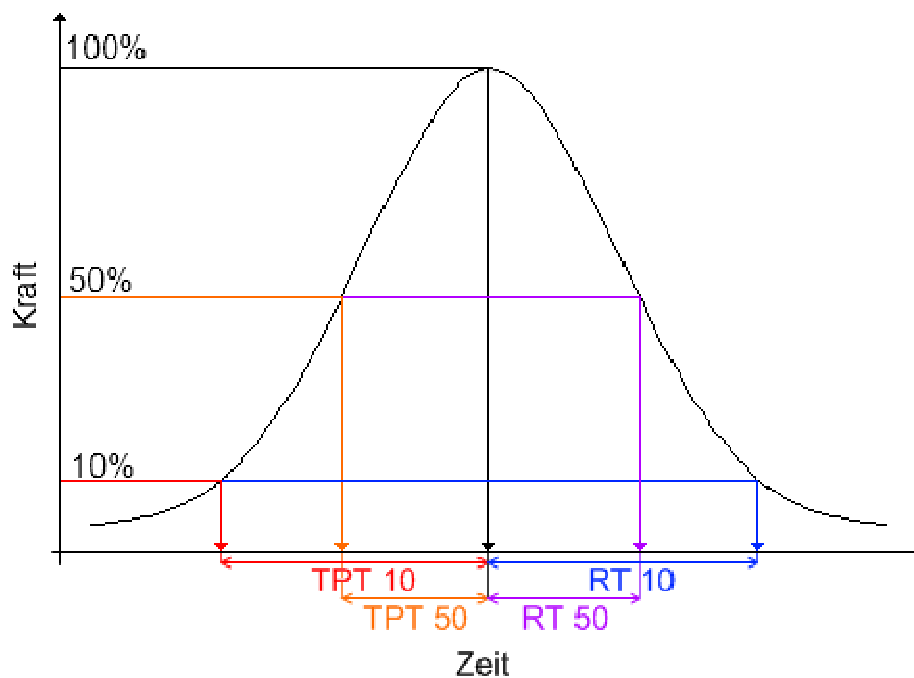


Abb. 2: Kontraktilitätszeiten einer einzelnen Muskelkontraktion.

Die Datenlage bezüglich der im IVCT durch Halothan hervorgerufenen Veränderungen der Kontraktilitätszeiten ist nicht eindeutig.

Ältere Studien beschreiben im Verlauf des IVCT über 90 Minuten eine Verkürzung von TPT und RT beim gesunden Muskel, sowie eine Verlängerung von RT beim MHS-Muskel[71-73].

Jüngere Ergebnisse zeigen jedoch einen leichten Anstieg aller Zeiten, der aber nur für die RT signifikant ist[74]. Das erbrachte auch eine Studie von Anetseder und Hartung von 1996, in der Koffein als Testsubstanz verwendet wurde[75].

Im Vergleich zwischen MHS und MHN-Muskeln nach Inkubation mit Halothan sind die aktuellen Daten deckungsgleich: Der einzige signifikante Unterschied bezüglich der Kontraktilitätszeiten besteht in einem höheren Anstieg der RT von MHS-Muskeln gegenüber MHN[71-75].

Für eine diagnostische Unterscheidung ist dieses Kriterium jedoch unzureichend[74], es kann lediglich als zusätzliches Unterscheidungsmerkmal betrachtet werden.

Der beschriebene Anstieg der RT war auch in unseren Versuchen erkennbar. Die nötigen statistischen Beweise konnten allerdings nur teilweise erbracht werden. Mögliche Gründe dafür werden im folgenden Kapitel diskutiert.

MHS	N	RT10 bei Versuchsstart	RT10 nach 90 Minuten
Atorvastatin	9	70 (60;89)	84 (71;131)
Simvastatin	11	65 (54;89)	73 (59;140)
Ciprofloxacin	12	64 (53;96)	96 (72;196)
Levofloxacin	9	49 (48;84)	74 (53;122)
Methanol	10	55 (48;63)	47 (34;55)
Krebs-Ringer	10	50 (44;71)	58 (44;113)
Gemfibrozil 0,05 mg/ml	8	67 (54;68)	50 (44;65)

Tabelle 4: M + Q25, Q75 der RT10. Eine Tendenz ist erkennbar, statistische Beweise fehlen jedoch.

#### 4.6. Methodenkritik

Der hier verwendete Versuchsaufbau stellt den wissenschaftlichen Goldstandard zur MH-Diagnostik dar. Dennoch existieren in Verbindung mit der vorliegenden Fragestellung potentielle Fehlerquellen:

##### *Langzeitwirkung, Wirkspiegel*

Die Fragestellung richtet vor allem im Hinblick auf die Statine ihren Fokus auf Substanzen, die vom Patienten längerfristig, meist über Jahrzehnte, eingenommen werden müssen.

Ein Versuchsaufbau über 90 Minuten kann über die Gefahren eines langfristigen Einflusses von Substanzen auf einen MHS-Muskel naturgemäß nur eine bedingte Aussage treffen.

Um dennoch bereits nach dieser kurzen Zeit eine Tendenz erkennen zu können, wurden die Versuchskonzentrationen deutlich höher gewählt als die Wirkspiegel, welche die Medikamente unter fachgerechter Anwendung erreichen.

So werden für Atorvastatin bei einer klinischen Tagesdosis von 10-80 mg Plasmaspiegel zwischen 0,36 und 16 ng/ml erreicht[76]. Dem gegenüber steht die im IVCT verwendete Konzentration von 25 µg/ml.

Eine Einzeldosis von 40 mg Simvastatin führt zu einer maximalen Plasmakonzentration von etwa 4 ng/ml [56], im IVCT lag die Konzentration bei 10 µg/ml.

Ähnliches gilt für die anderen Versuchsgruppen: Die „in vivo“-Plasmakonzentration von Ciprofloxacin liegt bei 2 µg/ml[77], im Versuch verwendeten wir 200 µg/ml.

Levofloxacin erreicht im „steady state“ Plasmakonzentrationen von 11 µg/ml[78], im Versuch sind es 500 µg/ml. Auch die Plasmakonzentration von Fibraten liegt mit 25 µg/ml[79] noch deutlich unter der minimalen Versuchskonzentration 50 µg/ml.

Aufgrund dieser hohen Dosen sind toxische Effekte, die über die bei einer vorschriftsmäßigen Gabe möglichen hinausgehen, denkbar. Vor diesem Hintergrund interpretieren wir die deutliche Reduktion der Kontraktionsamplitude in den Versuchen mit Gemfibrozil und Levofloxacin als ein Zeichen von Muskelzelluntergang. Diese Effekte könnten zudem über zellulären ATP-Mangel zu einer mangelnden  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückresorption ins SR und damit zum Anstieg der Ruhespannung und zur Verfälschung unserer Ergebnisse führen.

Über Fehler, die möglicherweise durch die erhöhten Konzentrationen entstanden sind, könnte eine Langzeitstudie Aufschluss geben.

### *Signifikanz-Unterschiede zwischen den absoluten und relativen Messwerten*

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase eines MHS-Muskels ist auch ohne exogene Noxen labiler als die eines gesunden Muskels, da die Öffnungswahrscheinlichkeit des RYR1 erhöht ist[18]. Hierdurch erklären wir uns, dass in einigen Versuchsreihen bereits zu Versuchsbeginn ein Unterschied der Ruhespannung zwischen MHS- und MHN-Muskeln bestand.

Die statistischen Berechnungen wurden daher nicht nur mit den absoluten Messwerten, sondern auch mit der prozentualen Änderung der absoluten Werte bezogen auf den Versuchsbeginn (Zeitpunkt der Medikamentenzugabe) durchgeführt. So kann die Aussagekraft der Berechnungen stärker auf die durch die Testsubstanzen selbst verursachten Veränderungen fokussiert werden.

### *Verschiedene Messplätze*

Die Ethikkommission genehmigte für die Versuche die Verwendung von 30 Schweinen. Um eine möglichst hohe Anzahl von Einzelversuchen zu erreichen, wurden vier identisch aufgebaute Messplätze verwendet.

Sie wurden mit einem Normgewicht geeicht, so dass die Ergebnisse, vor allem die Ruhespannung und Kontraktilitätsamplitude betreffend, miteinander vergleichbar sind.

Schon eine geringe Diskrepanz der Zeitmessung zwischen den einzelnen Plätzen würde einen Vergleich der Kontraktilitätszeiten jedoch deutlich erschweren oder unmöglich machen.

Da die Zeit bis zur Stabilisierung der Ruhespannung variierte, war es logistisch nicht möglich, jedes Medikament immer am gleichen Messplatz zu testen.

Der Levofloxacin-Versuch wurde jeweils zuerst durchgeführt und lief deshalb immer an Messplatz 1 ab. Da sich bei diesem Versuch, anders als bei den anderen Medikamenten, signifikante Unterschiede zwischen den Kontraktilitätszeiten von MHS-

und MHN-Muskeln zeigen ließen, gehen wir davon aus, dass zwischen den Messplätzen geringfügige Unterschiede in der Zeitmessung bestanden. Dies stellt möglicherweise einen wesentlichen Grund für die fehlenden statistischen Beweise bezüglich der Kontraktilitätszeiten dar.

#### *Geringe Versuchsanzahl*

Zusätzlich bleibt festzustellen, dass die geringe Anzahl der verfügbaren Versuchstiere einen limitierenden Faktor bezüglich der Aussagekraft unserer Ergebnisse darstellt. Um die erkennbare Tendenz zu untermauern, sind weitere, größer angelegte Studien nötig.

#### 4.7. Resümee

Wir konnten mit unseren Versuchen zeigen, dass Atorvastatin, Simvastatin, Ciprofloxacin und Levofloxacin die Ruhespannung eines MHS-Muskels gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhen. Das lässt sich durch eine zusätzliche Störung der ohnehin labilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase erklären. Über die genauen Mechanismen kann derzeit nur spekuliert werden.

Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Wahrscheinlichkeit von Rhabdomyolysen als Nebenwirkung der genannten Medikamente durch eine Veranlagung zur MH erhöht wird.

Sicherlich stellt dieses Ergebnis keine absolute Kontraindikation für die Anwendung von Fluorchinolonen oder Statinen dar, denn der erwiesene Nutzen dieser Medikamente für große Patientengruppen steht einer geringen Prävalenz der MH gegenüber.

Es sollte jedoch beim Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Myalgien oder Rhabdomyolysen unter einer Therapie mit diesen Medikamenten auch an eine mögliche MH-Veranlagung gedacht werden.

Im Umkehrschluss sollten Medikamente dieser Gruppe bei Patienten mit bekannter MH-Veranlagung nur mit Vorsicht verwendet oder wenn möglich gegen adäquate Ersatzpräparate ausgetauscht werden.

Für Gemfibrozil alleine war kein Anstieg der Ruhespannung nachweisbar. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Aggravierung von Rhabdomyolysen unter einer Kombinationstherapie von Statin und Gemfibrozil durch die Überlastung des gemeinsamen Abbauweges erfolgt. Ist eine Kombinationstherapie notwendig, sollten deshalb wenn möglich Medikamente mit unterschiedlichem Abbaumechanismus verwendet werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine metabolische Myopathie. Sie veranlagt zu einer potentiell lebensgefährlichen Stoffwechsellage, die durch Exposition mit bestimmten Triggersubstanzen, insbesondere volatilen Anästhetika und depolarisierenden Muskelrelaxantien, ausgelöst wird. Dabei führt ein Defekt in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums der Skelettmuskulatur zur unkontrollierten Stoffwechselsteigerung.

Zahlreiche Medikamente weisen in ihrem Nebenwirkungsprofil das Risiko von Rhabdomyolysen oder Myalgien auf. Unter Therapie von Cerivastatin kam es in 52 Fällen zu tödlichen Verläufen, so dass das Medikament 2001 vom Markt genommen wurde.

Wir untersuchten Maligne Hyperthermie susceptible Schweinemuskeln im In-vitro-Kontrakturtest (IVCT) unter Inkubation mit Atorvastatin, Simvastatin, Levofloxacin, Ciprofloxacin und Gemfibrozil. Für diese Medikamente sind derartige unerwünschte Arzneimittelwirkungen beschrieben.

Wir konnten dabei zeigen, dass der Maligne Hyperthermie susceptible (MHS) Muskel anscheinend empfindlicher auf Atorvastatin, Simvastatin, Levofloxacin und Ciprofloxacin reagiert als der Maligne Hyperthermie negative (MHN). Das zeigte sich anhand der gegenüber den nicht suszeptiblen Muskeln signifikant höher ansteigenden Ruhespannung der MHS-Muskelpräparate im IVCT. Wir erklären dieses Ergebnis durch die beim MHS-Muskel labilere  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase.

Gemfibrozil scheint hingegen auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase keinen Einfluss zu haben, jedoch in hohen Konzentrationen myotoxisch zu wirken. Eine Kombination mit anderen Medikamenten, die durch die gleichen Enzymsysteme abgebaut werden, sollte daher nur mit Vorsicht erfolgen, um eine Kumulation im Organismus zu vermeiden.



Für die Versuche standen uns mit Genehmigung der örtlichen Ethikkommission Skelettmuskelpräparate von 30 Schweinen zur Verfügung. Um unsere Ergebnisse weiter zu sichern, wären größer angelegte Studien notwendig.

Dennoch sollte bei gesicherter Disposition zur MH der Einsatz potentiell muskelschädigender Medikamente nur unter erhöhter Vorsicht erfolgen. Umgekehrt können unter Therapie mit den genannten Medikamenten wiederholt auftretende Rhabdomyolysen den Verdacht auf eine MH-Disposition lenken und gegebenenfalls eine weitere Abklärung per IVCT indizieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Anetseder, M. and C.R. Müller, *Maligne Hyperthermie*. Intensivmed, 2003. **40**: p. 324-335.
2. Hartung, E., et al., [*Regional distribution of predisposition to malignant hyperthermia in Germany: data in 1997*]. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 1998. **33**(4): p. 238-43.
3. Guedel, A., *Inhalation Anaesthesia: A Fundamental Guide*. 1937, New York, USA: The MacMillan Company.
4. Lee, J.A., *A Synopsis of Anaesthesia, 3rd ed.* 1953, Bristol, England: J. Wright & Sons.
5. Denborough, M.A. and R.R.H. Lovell, *Anaesthetic deaths in a family*. Lancet, 1960. **2**: p. 45.
6. Denborough, M.A., et al., *Anaesthetic deaths in a family*. Br J Anaesth, 1962. **34**: p. 395-6.
7. Gordon, R.A., *Malignant Hyperpyrexia during general anaesthesia*. Can Anaesth Soc J, 1966. **13**: p. 415-416.
8. Britt, B.A., W.G. Locher, and W. Kalow, *Hereditary aspects of malignant hyperthermia*. Can Anaesth Soc J, 1969. **16**(2): p. 89-98.
9. Kalow, W., et al., *Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia*. Lancet, 1970. **2**(7679): p. 895-8.
10. *A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. The European Malignant Hyperpyrexia Group*. Br J Anaesth, 1984. **56**(11): p. 1267-9.
11. Larach, M.G., *Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. North American Malignant Hyperthermia Group*. Anesth Analg, 1989. **69**(4): p. 511-5.
12. Harrison, G.G., *Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium*. Br J Anaesth, 1975. **47**(1): p. 62-5.

13. Kolb, M.E., M.L. Horne, and R. Martz, *Dantrolene in human malignant hyperthermia*. *Anesthesiology*, 1982. **56**(4): p. 254-62.
14. Wagenknecht, T., et al., *Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum*. *Nature*, 1989. **338**(6211): p. 167-70.
15. Tanabe, T., et al., *Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling*. *Nature*, 1990. **346**(6284): p. 567-9.
16. Leong, P. and D.H. MacLennan, *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**(14): p. 7791-4.
17. Nelson, T.E., *Malignant hyperthermia: a pharmacogenetic disease of Ca<sup>++</sup> regulating proteins*. *Curr Mol Med*, 2002. **2**(4): p. 347-69.
18. Brini, M., *Ryanodine receptor defects in muscle genetic diseases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(4): p. 1245-55.
19. Nelson, T.E., *Abnormality in calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia*. *J Clin Invest*, 1983. **72**(3): p. 862-70.
20. Ohnishi, S.T., S. Taylor, and G.A. Gronert, *Calcium-induced Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia. The effects of halothane and dantrolene*. *FEBS Lett*, 1983. **161**(1): p. 103-7.
21. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease*. *Muscle Nerve*, 2007.
22. Blanck, T.J., et al., *Halothane, enflurane, and isoflurane stimulate calcium leakage from rabbit sarcoplasmic reticulum*. *Anesthesiology*, 1992. **76**(5): p. 813-21.
23. Kunst, G., et al., *Differential effects of sevoflurane, isoflurane, and halothane on Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle*. *Anesthesiology*, 1999. **91**(1): p. 179-86.

24. Wappler, F., *Malignant hyperthermia*. Eur J Anaesthesiol, 2001. **18**(10): p. 632-52.
25. Roewer, N., et al., *Cardiovascular and metabolic responses to anesthetic-induced malignant hyperthermia in swine*. Anesthesiology, 1995. **83**(1): p. 141-59.
26. Hopkins, P.M., *Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis*. Br J Anaesth, 2000. **85**(1): p. 118-28.
27. Reber, A., P. Schumacher, and A. Urwyler, *Effects of three different types of management on the elimination kinetics of volatile anaesthetics. Implications for malignant hyperthermia treatment*. Anaesthesia, 1993. **48**(10): p. 862-5.
28. Parness, J. and S.S. Palnitkar, *Identification of dantrolene binding sites in porcine skeletal muscle sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1995. **270**(31): p. 18465-72.
29. Nelson, T.E., et al., *Dantrolene sodium can increase or attenuate activity of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel. Clinical implications*. Anesthesiology, 1996. **84**(6): p. 1368-79.
30. Zhao, F., et al., *Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13810-6.
31. Harrison, G.G., I.G. Wright, and D.F. Morrell, *The effects of calcium channel blocking drugs on halothane initiation of malignant hyperthermia in MHS swine and on the established syndrome*. Anaesth Intensive Care, 1988. **16**(2): p. 197-201.
32. Rubin, A.S. and A.D. Zablocki, *Hyperkalemia, verapamil, and dantrolene*. Anesthesiology, 1987. **66**(2): p. 246-9.
33. Saltzman, L.S., et al., *Hyperkalemia and cardiovascular collapse after verapamil and dantrolene administration in swine*. Anesth Analg, 1984. **63**(5): p. 473-8.
34. Gronert, G.A., et al., *Effect of CO<sub>2</sub>, calcium, digoxin, and potassium on cardiac and skeletal muscle metabolism in malignant hyperthermia susceptible swine*. Anesthesiology, 1986. **64**(1): p. 24-8.

35. McCarthy, T.V., K.A. Quane, and P.J. Lynch, *Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease*. Hum Mutat, 2000. **15**(5): p. 410-7.
36. Nelson, T.E., H. Rosenberg, and S.M. Muldoon, *Genetic testing for malignant hyperthermia in North America*. Anesthesiology, 2004. **100**(2): p. 212-4.
37. Urwyler, A., et al., *Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia*. Br J Anaesth, 2001. **86**(2): p. 283-7.
38. Anetseder, M., et al., *Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test*. Lancet, 2002. **359**(9317): p. 1579-80.
39. Hall, L.W., et al., *Unusual reaction to suxamethonium chloride*. Br Med J, 1966. **2**(5525): p. 1305.
40. Jones, E.W., et al., *Malignant hyperthermia of swine*. Anesthesiology, 1972. **36**(1): p. 42-51.
41. Fujii, J., et al., *Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia*. Science, 1991. **253**(5018): p. 448-51.
42. Alberts, A.W., et al., *Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(7): p. 3957-61.
43. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
44. *Major outcomes in moderately hypercholesterolemic, hypertensive patients randomized to pravastatin vs usual care: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT-LLT)*. Jama, 2002. **288**(23): p. 2998-3007.
45. Sever, P.S., et al., *Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2003. **361**(9364): p. 1149-58.

46. Farmer, J.A. and G. Torre-Amione, *Comparative tolerability of the HMG-CoA reductase inhibitors*. Drug Saf, 2000. **23**(3): p. 197-213.
47. Farmer, J.A., *Learning from the cerivastatin experience*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1383-5.
48. Guis, S., et al., *Rhabdomyolysis and myalgia associated with anticholesterolemic treatment as potential signs of malignant hyperthermia susceptibility*. Arthritis Rheum, 2003. **49**(2): p. 237-8.
49. Capacchione, J.F., et al., *Statin-Induced Muscle Contracture in MH Susceptible Swine*. 2005.
50. Coll, R.J. and A.J. Murphy, *Fluoride-inhibited calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. Magnesium and fluoride stoichiometry*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21584-7.
51. Murphy, A.J. and R.J. Coll, *Fluoride is a slow, tight-binding inhibitor of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1992. **267**(8): p. 5229-35.
52. Roca, B., B. Calvo, and R. Monferrer, *Severe rhabdomyolysis and cerivastatin-gemfibrozil combination therapy*. Ann Pharmacother, 2002. **36**(4): p. 730-1.
53. Kantola, T., K.T. Kivisto, and P.J. Neuvonen, *Erythromycin and verapamil considerably increase serum simvastatin and simvastatin acid concentrations*. Clin Pharmacol Ther, 1998. **64**(2): p. 177-82.
54. Arora, R., M. Liebo, and F. Maldonado, *Statin-induced myopathy: the two faces of Janus*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2006. **11**(2): p. 105-12.
55. Pasternak, R.C., et al., *ACC/AHA/NHLBI Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins*. Stroke, 2002. **33**(9): p. 2337-41.
56. Backman, J.T., et al., *Plasma concentrations of active simvastatin acid are increased by gemfibrozil*. Clin Pharmacol Ther, 2000. **68**(2): p. 122-9.
57. Evans, M. and A. Rees, *The myotoxicity of statins*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(4): p. 415-20.
58. Lijnen, P., et al., *Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport systems*. J Hypertens, 1994. **12**(1): p. 59-64.

59. Laaksonen, R., et al., *Decreases in serum ubiquinone concentrations do not result in reduced levels in muscle tissue during short-term simvastatin treatment in humans*. Clin Pharmacol Ther, 1995. **57**(1): p. 62-6.
60. Laaksonen, R., et al., *The effect of simvastatin treatment on natural antioxidants in low-density lipoproteins and high-energy phosphates and ubiquinone in skeletal muscle*. Am J Cardiol, 1996. **77**(10): p. 851-4.
61. Bleske, B.E., et al., *The effect of pravastatin and atorvastatin on coenzyme Q10*. Am Heart J, 2001. **142**(2): p. E2.
62. Flint, O.P., et al., *HMG CoA reductase inhibitor-induced myotoxicity: pravastatin and lovastatin inhibit the geranylgeranylation of low-molecular-weight proteins in neonatal rat muscle cell culture*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **145**(1): p. 99-110.
63. Thompson, P.D., et al., *Lovastatin increases exercise-induced skeletal muscle injury*. Metabolism, 1997. **46**(10): p. 1206-10.
64. Petitjeans, F., et al., *A case of rhabdomyolysis with fatal outcome after a treatment with levofloxacin*. Eur J Clin Pharmacol, 2003. **59**(10): p. 779-80.
65. Hsiao, S.H., et al., *Acute rhabdomyolysis associated with ofloxacin/levofloxacin therapy*. Ann Pharmacother, 2005. **39**(1): p. 146-9.
66. Guis, S., et al., *Malignant hyperthermia susceptibility revealed by myalgia and rhabdomyolysis during fluoroquinolone treatment*. J Rheumatol, 2001. **28**(6): p. 1405-6.
67. Tong, J., T.V. McCarthy, and D.H. MacLennan, *Measurement of resting cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentrations and Ca<sup>2+</sup> store size in HEK-293 cells transfected with malignant hyperthermia or central core disease mutant Ca<sup>2+</sup> release channels*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 693-702.
68. Rosenson, R.S., *Current overview of statin-induced myopathy*. Am J Med, 2004. **116**(6): p. 408-16.
69. Davidson, M.H., et al., *Safety considerations with fibrate therapy*. Am J Cardiol, 2007. **99**(6A): p. 3C-18C.

70. Holoshitz, N., A.A. Alsheikh-Ali, and R.H. Karas, *Relative safety of gemfibrozil and fenofibrate in the absence of concomitant cerivastatin use*. Am J Cardiol, 2008. **101**(1): p. 95-7.
71. Etchrivi, T.S., et al., *Effects of halothane on mechanical response of skeletal muscle from malignant hyperthermia susceptible patients*. Arch Physiol Biochem, 1998. **106**(4): p. 318-24.
72. Etchrivi, T.S., et al., *Shortening velocity of skeletal muscle from humans with malignant hyperthermia susceptibility: effects of halothane*. Eur J Pharmacol, 2000. **388**(1): p. 107-13.
73. Etchrivi, T.S., et al., *[Contraction-relaxation coupling of skeletal muscle in patients susceptible to malignant hyperthermia]*. Ann Fr Anesth Reanim, 2002. **21**(6): p. 471-7.
74. Gerbershagen, M.U., et al., *Influence of Halothane on Isometric Contraction Kinetics in Skeletal Muscle Preparations of Malignant Hyperthermia Susceptible and Normal Patients*. Annual Meeting Abstracts, San Francisco, 2004.
75. Anetseder, M. and E. Hartung, *Mechanical twitch parameters in normal and malignant hyperthermia human skeletal muscle and the effect of caffeine*. ANESTHESIOLOGY, 1996. **85**(3A): p. A807.
76. Shum, Y.Y., et al., *Development, validation, and interlaboratory comparison of an HMG-CoA reductase inhibition assay for quantitation of atorvastatin in plasma matrices*. Ther Drug Monit, 1998. **20**(1): p. 41-9.
77. Navarro, D.S., et al., *Pharmacokinetics of Ciprofloxacin as a Tool to Optimise Dosage Schedules in Community Patients*. Clinical Pharmacokinetics, 2002. **41**(14): p. 1213-1220.
78. Sanchez Navarro, A., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin in intensive care patients*. Clin Pharmacokinet, 2005. **44**(6): p. 627-35.
79. Miller, D.B. and J.D. Spence, *Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (fibrates)*. Clin Pharmacokinet, 1998. **34**(2): p. 155-62.



## 7. Abkürzungsverzeichnis

DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
IVCT	In-vitro-Kontrakturtest
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LDL	low density lipoprotein
MH	Maligne Hyperthermie
MHN	Maligne Hyperthermie negativ
MHS	Maligne Hyperthermie suszeptibel
RT	relaxation time
RYR1	Ryanodin-Rezeptor vom Skelettmuskeltyp
SERCA	sarcoendoplasmatic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TPT	time to peak tension

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

*Abb. 1:* Versuchsanordnung.

*Abb. 2:* Kontraktilitätszeiten einer einzelnen Muskelkontraktion.

*Abb. 3:* Verlauf der Ruhespannung unter 25 µg/ml Atorvastatin. M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #:  $p < 0,05$  für MHS vs MHN.

*Abb. 4:* Verlauf der Ruhespannung unter 10 µg/ml Simvastatin. M + Q25, Q75; MHN: n=10; MHS: n=11; #:  $p(\text{absolut}) < 0,05$  für MHS vs MHN; §:  $p(\text{relativ}) < 0,05$  für MHS vs MHN.

*Abb. 5:* Verlauf der Ruhespannung unter 0,2 mg/ml Ciprofloxacin. M + Q25, Q75; MHN: n=6; MHS: n=12; §:  $p(\text{relativ}) < 0,05$  für MHS vs MHN.

*Abb. 6:* Verlauf der Ruhespannung unter 0,5 mg/ml Levofloxacin. M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #:  $p(\text{absolut}) < 0,05$  für MHS vs MHN; §:  $p(\text{relativ}) < 0,05$  für MHS vs MHN.

*Abb. 7:* Verlauf der Ruhespannung unter 1% Methanol. M + Q25, Q75; MHN: n=7; MHS: n=10; ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN lag nicht vor.

*Abb. 8:* Verlauf der Ruhespannung unter Krebs-Ringer-Lösung. M + Q25, Q75; MHN: n=8; MHS: n=10; #:  $p(\text{absolut}) < 0,05$  für MHS vs MHN.

*Abb. 9:* Verlauf der Kontraktionsamplituden, M + Q25, Q75; n: s. jeweilige Abb. zur Ruhespannung; #:  $p < 0,05$  MHS vs MHN.

*Abb. 10:* Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Atorvastatin, M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #:  $p < 0,05$  MHS vs MHN; \*:  $p < 0,05$  vs 0min.

*Abb. 11:* Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Simvastatin, M + Q25, Q75; MHN: n=10; MHS: n=11; #:  $p < 0,05$  MHS vs MHN; \*:  $p < 0,05$  vs 0min.

*Abb. 12:* Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Ciprofloxacin, M + Q25, Q75; MHN: n=6; MHS: n=12; #:  $p < 0,05$  MHS vs MHN; \*:  $p < 0,05$  vs 0min.

*Abb. 13:* Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter Levofloxacin, M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=9; #:  $p < 0,05$  MHS vs MHN; \*:  $p < 0,05$  vs 0min.

*Abb. 14:* Verlauf der Ruhespannung unter 0,05mg/ml Gemfibrozil. M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=8; ein signifikanter Unterschied zwischen MHS und MHN lag nicht vor.

*Abb. 15:* Verlauf der Kontraktionsamplitude unter 0,05mg/ml Gemfibrozil. M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=8; #: p(absolut)<0,05 MHS vs MHN.

*Abb. 16:* Verlauf der Kontraktilitätszeiten unter 0,05mg/ml Gemfibrozil. M + Q25, Q75; MHN: n=9; MHS: n=8.

*Abb. 17:* Vergleich der vorangehenden Studie [49] (links) mit den Ergebnissen unserer Experimente (rechts). Die grafische Überlagerung der Ergebnisse ist klar erkennbar.

links: MHN: n=4; MHS: n=3; #: p<0,05 Methanol vs Atorvastatin; rechts: Methanol: MHN: n=7; MHS: n=10; Atorvastatin: MHN: n=9; MHS: n=9; #: p<0,05 Methanol vs Atorvastatin.

*Abb. 18:* Chemische Struktur der Fluorchinolone, links Ciprofloxacin, rechts Levofloxacin.

*Abb. 19:* Chemische Struktur von Simvastatin. Es ist kein Fluor enthalten.

*Tabelle 1:* Vergleich von Länge und Gewicht der untersuchten Muskelbündel von MHS- und MHN-Tieren.

*Tabelle 2:* Kontraktilitätsamplitude, M + Q25, Q75 bei Versuchsbeginn und Ende; \*: p<0,05 MHS vs MHN.

*Tabelle 3:* Zeit (Median) bis zum Absinken der Kontraktilitätsamplitude unter 50% des Anfangswertes.

*Tabelle 4:* M + Q25, Q75 der RT10. Eine Tendenz ist erkennbar, statistische Beweise fehlen jedoch.

## **Danksagung**

Ich möchte allen danken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. 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 MH-Labors für die große Hilfsbereitschaft sowie Herrn Dipl.-Inf. H. Hofmann für die Java-gestützte Verarbeitung der Messdaten.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Lukas Christopher Tadda  
Geburtsdatum und -ort: 19.09.1982 in Bamberg  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1988-1992 Grundschule Gundelsheim  
1992-2001 Dientzenhofer-Gymnasium Bamberg

### Studium der Humanmedizin:

2002-2008 Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
08/2004 Physikum  
10/2008 Staatsexamen

### Famulaturen:

09/2004 Chirurgie, Klinikum Scheßlitz  
09/2005 Anästhesie, Universitätsklinikum Göttingen  
08/2006 Psychiatrie, Bezirkskrankenhaus Bayreuth  
03/2007 Allgemeinmedizin, Praxis Dres. Mohorn, Pößneck

### Praktisches Jahr:

08/2007-12/2007 Innere Medizin, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt  
12/2007-02/2008 Chirurgie, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt  
02/2008-03/2008 Chirurgie, Kreisspital Männedorf, Schweiz  
03/2008-07/2008 HNO-Heilkunde, Uniklinik Würzburg

### Beruf:

seit 02/2009 Assistenzarzt, Medizinische Klinik IV, Pneumologie, Klinikum am Bruderwald, Sozialstiftung Bamberg

Gundelsheim, den 1. September 2009