

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

**Modifikation eines
minimal-invasiven, metabolischen Tests – mittels Einsatz
standardisierter Mikrodialysesonden mit integriertem
Zuspritzkatheter - zur Diagnostik
einer Malignen Hyperthermie-Disposition**

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

Vorgelegt von

Cosima Roth
aus Bad Windsheim

Würzburg, März 2012

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. F. Schuster

Koreferent: Prof. Dr. med. T. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 2012

Die Promovendin ist Ärztin.

Abkürzungsverzeichnis

ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BMI	Body Mass Index
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
°C	Grad Celsius
CCD	Central Core Disease
CK	Kreatinkinase
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
HF	Herzfrequenz
H ⁺	Wasserstoffion
IVCT	In-Vitro-Kontrakturtest
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MH	Maligne Hyperthermie
MHE	Maligne Hyperthermie-equivocal
MHN	Maligne Hyperthermie-non-susceptible
MHS	Maligne Hyperthermie-susceptible
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mN	Millinewton
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Versuchszahl
NAD ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH/H ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)

nm	Nanometer
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
pH	Potentia hydrogenii
P _i	anorganisches Phosphat
RYR	Ryanodinrezeptor
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
U	Unit
VAS	Visuelle Analogskala

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Maligne Hyperthermie	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Historie und Epidemiologie.....	1
1.1.3	Physiologie der Skelettmuskelzelle	2
1.1.4	Pathophysiologie.....	3
1.1.5	Klinisches Erscheinungsbild.....	4
1.1.6	Therapie	5
1.1.7	Myopathie und Maligne Hyperthermie.....	5
1.1.8	Diagnostik.....	6
1.1.9	Wirkungsmechanismus von Halothan und Koffein.....	8
1.2	Mikrodialyse	8
1.2.1	Prinzip der Mikrodialyse	8
1.2.2	Aufbau einer Mikrodialysesonde.....	10
1.2.3	Definition und Bestimmung der Recovery	12
1.2.4	Beeinflussende Faktoren.....	14
1.3	Fragestellung.....	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien.....	16
2.1.1	Mikrodialysesonden.....	16
2.1.2	Injektionslösungen und Substanzen.....	17
2.1.3	Geräte.....	17
2.2	Versuchsprotokoll.....	18
2.2.1	Probanden	18
2.2.2	Vorbereitung der Probanden.....	19
2.2.3	Platzierung der Kanülen	19
2.2.4	Messung und Stimulation	21
2.2.5	Fragebogen	22
2.3	Analyse	22
2.3.1	Standardkurve Laktat.....	22
2.3.2	Probenanalyse	23
2.3.3	Statistik	24
2.4	Ermittlung der relativen Recovery.....	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Bestimmung der relativen Recovery in-vitro.....	25
3.2	Probandenstudie.....	26
3.2.1	Biometrische Daten	26
3.2.2	Vitalparameter	27
3.2.3	Peripher-venöse Blutgasanalyse	28
3.2.4	Muskelenzyme.....	30
3.2.5	Laktatmessung	32
3.2.6	Visuelle Analogskala.....	38
3.2.7	Fragebögen	39

4	Diskussion.....	41
4.1	Systemische Nebenwirkungen.....	41
4.2	Lokale Nebenwirkungen.....	42
4.3	Individuelle Ergebnisse	43
4.4	Spezifität und Sensitivität.....	47
4.5	Akzeptanz	47
4.6	Bewertung der MAB 7 Mikrodialysesonde	48
4.7	Bewertung des Verfahrens.....	50
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Anhang.....	
8	Danksagung.....	
9	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Maligne Hyperthermie

1.1.1 Definition

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine metabolische, genetisch autosomal-dominant determinierte und häufig subklinische Myopathie. Nach Exposition mit volatilen Anästhetika (z.B. Halothan, Enfluran, Desfluran, Sevofluran- und Isofluran) und/oder depolarisierenden Muskelrelaxantien (z.B. Succinylcholin) kann es bei genetisch prädisponierten Personen zu einem potentiell lebensbedrohlichen, hypermetabolen Syndrom der Skelettmuskulatur kommen. Dieser Zustand (sog. MH-Krise) basiert auf einer unkontrollierten sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzung über funktionell veränderte Ryanodinrezeptoren (RYR 1) und ist gekennzeichnet durch das klinische Bild von Muskelkontrakturen (Rigor), Laktatazidose und Erhöhung der Körperkern-temperatur (Hyperthermie) [1]. Im alltäglichen Leben zeigen sich bei den betroffenen Patienten häufig keine Anhaltspunkte für eine Disposition. Frühzeitige Diagnose und Einleitung einer adäquaten Therapie sind entscheidend für den Therapieerfolg einer MH-Krise.

1.1.2 Historie und Epidemiologie

Die Hyperthermie als anästhesiologischer Zwischenfall ist seit dem Beginn des Einsatzes von Narkosetechniken Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt. A.F. Guedel postulierte 1937 in seinem Lehrbuch über Inhalationsanästhesie einen Zusammenhang zwischen den beobachteten Hyperthermien und dem verwendeten Anästhetikum Diethylether [2]. Erst im Jahre 1960 wurde die MH als eigenes „pharmakogenetisches“ Krankheitsbild [3] benannt. Denborough und Lovell untersuchten 10 Todesfälle innerhalb einer australischen Familie während Allgemeinanästhesien und die Analyse des Familienstammbaums ließ einen autosomal-dominanten Erbgang mit incompletter Penetranz vermuten. Seit der Identifikation des Ryanodinrezeptorgens (RYR 1) als primärer Lokus der MH-Empfindlichkeit Anfang der 90er Jahre [4] konnten bis heute über 180 MH-assoziierte Mutationen auf dem Gen des sarkoplasmatischen Kalzium-

kanals gefunden werden, von denen aktuell 30 zur diagnostischen Testung genutzt werden. Goldstandard zur sicheren Diagnostik einer MH-Disposition ist der In-Vitro-Kontrakturtest (IVCT), der 1983 durch die neu gegründete Europäische MH-Gruppe als standardisierter Test etabliert wurde. Er basiert auf dem Nachweis, dass in-vitro exziierte Muskelbündel von MH-veranlagten Patienten nach Koffein- und Halothangabe Kontrakturen entwickeln [5]. Es gilt als gesichert, dass die MH in allen ethnischen Gruppen vorkommt, beide Geschlechter betroffen sind, wobei eine Prädominanz des männlichen Geschlechts und bei Kindern bzw. Jugendlichen vermutet wird [6]. Für Deutschland wird die Inzidenz von fulminanten MH-Verläufen bei Allgemeinanästhesien mit 1:60.000 angegeben, bei einer geschätzten Prävalenz der genetischen Veranlagung von 1:10.000 [7].

1.1.3 Physiologie der Skelettmuskelzelle

Elektromechanische Kopplung

Die Skelettmuskelkontraktion beginnt mit der Übertragung des Aktionspotentials von motorischen Nerven über den Neurotransmitter Acetylcholin auf die Muskelzelle. Die Erregung breitet sich entlang des Sarkolemms über die ganze Muskelfaser aus und dringt entlang des tubulären Systems in die Tiefe der Faser ein. An den Membranen des transversalen tubulären Systems befinden sich spannungsabhängige, aus fünf Untereinheiten bestehende Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ (Dihydropyridinrezeptoren, DHPR), die mit der α -1s-Untereinheit in direktem Kontakt zu dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal (Ryanodinrezeptor, RYR 1) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) stehen. Erreicht das Aktionspotential den Dihydropyridinrezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung der fünf Untereinheiten und somit zu einer Stimulation der Ryanodinrezeptoren, die am sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Kalzium strömt entlang des Konzentrationsgefälles aus den Speichern des SR in das Zytosol. Die Kalziumionen diffundieren zu den kontraktilelementen der Muskelzelle. Die Bindung an Troponin-C führt zu einer Interaktion zwischen Aktin und Myosin und es wird unter ATP-Verbrauch eine Muskelkontraktion ausgelöst. Anschließend werden die Kalziumionen über ATP-abhängige Kaliumpumpen ins SR zurückgepumpt und so eine Relaxation des Muskels herbeigeführt [8].

Energiegewinnung der Zelle

Für den Ablauf der Stoffwechselfvorgänge benötigt die Muskelzelle chemische Energie in Form von ATP. Um diese energiereichen Phosphatverbindungen bereitzustellen, findet im Zytosol jeder Muskelzelle eine Energiegewinnung in Form der Glykolyse statt:



Wichtig für die Aufrechterhaltung dieses Vorgangs ist die anschließende Reduktion des NADH zu NAD^+ . Hierfür stehen der Zelle je nach Stoffwechsellage zwei Wege zur Verfügung. Unter aeroben Bedingungen werden mit Hilfe der Atmungskette diese Redoxäquivalente regeneriert, d.h. die beiden Wasserstoffatome werden auf Sauerstoffmoleküle übertragen. Dabei entsteht wiederum Energie in Form von ATP. Unter anaeroben Bedingungen können aufgrund des Sauerstoffmangels diese Reaktionen nicht ablaufen. Um die bei der Glykolyse entstandenen NADH^+ zu regenerieren, wird Pyruvat mittels der Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert [9].

1.1.4 Pathophysiologie

Es ist bekannt, dass alle volatilen Anästhetika eine Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum induzieren und somit die Ca^{2+} -Homöostase in Muskelzellen beeinflussen können [10]. Hierbei kann sich der Prozess bei MH-prädisponierten Patienten verselbstständigen. Es kommt zu einer unkontrollierten Ca^{2+} -Freisetzung und kompletten Entgleisung der Ca^{2+} -Homöostase [10]. Die pathophysiologischen Vorgänge finden sich ursächlich in der elektromechanischen Kopplung. Mutationen im Gen des Ryanodinrezeptors sind in bis zu 50% der MH-Disponierten als kausale Ursache nachzuweisen [11]. Elektrophysiologischen Untersuchungen zufolge besitzen diese veränderten Ryanodinrezeptoren eine längere Öffnungswahrscheinlichkeit [12] bzw. es kommt zu Ca^{2+} -Leckströmen aufgrund dysfunktionaler Rezeptorkonformationen [13]. Es werden auch Mutationen in Genen anderer, an der elektromechanischen Kopplung beteiligten, Strukturen vermutet. Eine Mutation in der α -1s-Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors konnte identifiziert werden und die α -2- bzw. δ -Untereinheit werden ebenfalls in Zusammenhang mit MH gebracht [14], [15].

Eine solche Veranlagung kann zusammen mit weiteren Faktoren (Fieber, Stress) unter Anwendung von Triggersubstanzen wie halogenierter Inhalationsanästhetika oder depolarisierender Muskelrelaxantien zur Auslösung einer MH-Krise führen. Die Triggersubstanzen interagieren mit den genetisch veränderten Ryanodinrezeptoren und induzieren einen massiven Ausstrom von Kalziumionen aus dem SR ins Zellplasma. Die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol ist so anhaltend erhöht, dass es zu einer dauerhaften Aktivierung der Aktin-Myosinfilamente kommt. Die Muskelzellen steigern massiv den aeroben und anaeroben Stoffwechsel, um die benötigten energiereichen Phosphate bereitzustellen. Nach kurzer Zeit kommt es aufgrund des exzessiven Sauerstoffbedarfs zu einer intramuskulären Hypoxie. Die Zellen versuchen mit anaerober Glykolyse den Stoffwechsel weiter aufrecht zu erhalten. Eine zunehmende Hyperkapnie und Laktatazidose sind die Folge. Aufgrund der anhaltenden metabolischen Entgleisung entwickelt sich im weiteren Verlauf die Hyperthermie.

1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild der MH ist sehr variabel und kann zu jedem Zeitpunkt einer Allgemeinanästhesie auftreten. Die Hyperthermie mit einem Temperaturanstieg $> 1^\circ\text{C}/15\text{min}$ entwickelt sich in der Regel erst langsam und ist damit ein Spätsymptom der Erkrankung. Initial kommt es aufgrund des erhöhten Sauerstoffbedarfs der Skelettmuskelzellen zu einer Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems, was sich in Form einer Sinustachykardie und Blutdruckerhöhung manifestiert. Der exzessiv gesteigerte muskuläre Stoffwechsel führt zu einer Hypoxämie, Hyperkapnie, metabolisch-respiratorischen Azidose und im weiteren Verlauf zu einer zunehmenden Kreislaufdepression mit Hypotonie und Tachyarrhythmien. Ein generalisierter Rigor tritt bei 50-80% der Patienten auf. Es kommt zur Schädigung der Muskelzellen im Sinne einer Rhabdomyolyse mit Freisetzung von Kalium, Kreatinkinase (CK) und Myoglobin. Als sekundäre Organkomplikationen können ein akutes Nierenversagen, ein Hirnödem oder eine disseminierte Koagulopathie folgen.

Man unterscheidet klinisch zwei Verlaufsformen der MH: die fulminante MH-Krise und die häufigere abortive Verlaufsform. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen fulminanten MH-Krise sind die abortiven Verläufe oftmals schwieriger zu

diagnostizieren, da diese häufig schleichend beginnen und ein sehr variables klinisches Bild aufweisen. Es treten nur vereinzelte Symptome wie Tachykardie, mäßige metabolische Azidose oder geringe Hyperkapnie auf, so dass oft nur die Verdachtsdiagnose einer MH gestellt werden kann [16],[6].

1.1.6 Therapie

Bereits bei der Verdachtsdiagnose einer MH muss eine sofortige Therapie eingeleitet werden. Als erste Maßnahme wird die Zufuhr aller Triggersubstanzen beendet, die Beatmungsschläuche und der Atemkalk gewechselt. Der Patient muss mit reinem Sauerstoff und einem Frischgasfluss von mindestens 10 l/min ventiliert werden. Das kausale Therapeutikum Dantrolen ist umgehend als Bolus in einer Dosierung von zunächst 2,5mg/kg i.v. zu verabreichen. Die Gabe muss eventuell, je nach Wirkung, mehrmals in 5-minütigen Abständen bzw. steigender Dosierung wiederholt werden bis sich die hypermetabole Stoffwechsellaage normalisiert hat. Bei ausbleibender Besserung der Symptome unter Gabe von Dantrolen >20mg/kg, muss die Diagnose MH überdacht werden. Anschließend wird die Dantrolentherapie je nach initial notwendiger Dosierung (5mg/kg/24h nach Applikation von 2,5-5mg/kg Dantrolen bzw. 10mg/kg/24h nach Applikation von 7,5-10mg/kg) fortgeführt um ein erneutes Auftreten von MH-Symptomen zu verhindern. Eine Kreislaufstabilisierung durch Volumensubstitution oder Vasopressoren sowie der Ausgleich der metabolischen Azidose mit Natriumkarbonat erfolgt je nach Bedarf. Ab einer Temperatur >38°C wird eine aktive Kühlung erforderlich. Nach Stabilisierung des Patienten ist eine intensivmedizinische Überwachung für mindestens 24 Stunden zur Therapie bzw. Prophylaxe möglicher Sekundärkomplikationen anzuschließen [17].

1.1.7 Myopathie und Maligne Hyperthermie

Etwa 40% aller MH-Patienten weisen Zeichen einer subklinischen Myopathie auf [18]. Persistierende CK-Erhöhung, Muskelschwäche, Krämpfe und Schmerzen nach Belastung sind häufige Symptome. Im histopathologischen Präparat zeigen sich in diesen Fällen häufig unspezifische myopathologische Veränderungen wie

Faserhypertrophien, -atrophien oder zentrale Kerne. Ausgeprägte funktionelle Veränderungen der Muskelfasern lassen sich zumeist nicht nachweisen [19].

Bei etwa 5% aller Genträger besteht eine MH im Rahmen definierter Muskelkrankheiten [18]. Eine enge Assoziation besteht neben dem Central Core Disease (CCD) zum King-Denborough-Syndrom [20],[21],[22]. Im Fall der CCD wurden Mutationen im Ryanodinrezeptor identifiziert, die allelisch mit denen der MH vergleichbar sind [23], [24]. Berichte über MH-Episoden im Rahmen von Inhalationsnarkosen existieren darüber hinaus bei Patienten mit Myotonia fluctuans [25], Myotonia congenita [26] und Multicore-Myopathie [27].

Andere neuromuskuläre Erkrankungen können zu MH-ähnlichen Narkosekomplikationen führen, ohne dass es sich um eine MH-Krise handelt. Dazu gehören z.B. die sehr häufigen Muskeldystrophien Duchenne und Becker. Succinylcholin bewirkt bei diesen Patienten eine massive Ausschüttung von Kalium, was zu einem Hyperkaliämie-induzierten Herzstillstand während oder kurz nach der Narkoseeinleitung führen kann. Volatile Anästhetika können zu einer Rhabdomyolyse mit Erhöhung der CK und des Myoglobins führen. Klassische Zeichen einer hypermetabolen Reaktion wie bei der MH fehlen allerdings [28]. Demnach sind gemäß aktueller Richtlinien MH-auslösende Triggersubstanzen bei Patienten mit bekannter oder vermuteter Myopathie zu vermeiden. Bei Verdacht auf eine MH sollte neben dem IVCT eine myohistologische Untersuchung durchgeführt werden, um die Frage einer eventuell vorhandenen Myopathie zu klären.

1.1.8 Diagnostik

Die Indikation zur MH-Diagnostik besteht bei jedem Narkosezwischenfall mit MH-Verdacht, positiver Familienanamnese oder ungeklärten myopathischen Symptomen. Der In-Vitro-Kontrakturtest (IVCT) ist derzeit Goldstandard der MH-Diagnostik. Dieser wird gemäß dem von der Europäischen MH-Gruppe 1983 veröffentlichten Testprotokoll bzw. dem 1987 publizierten Nordamerikanischen Testprotokoll in allen MH-Zentren standardisiert durchgeführt [29], [30]. Über eine offene Biopsie wird ein Muskelstück aus dem Musculus vastus lateralis entnommen und in einer speziellen Messvorrichtung unter Zugabe der Triggersubstanzen Halothan und Koffein auf seine

Kontraktorentwicklung hin untersucht. Die Kontraktionen werden über isometrische Kraftaufnehmer registriert und graphisch über die Zeit aufgetragen. Eine Kontraktur von ≥ 2 mN ist als pathologisch definiert und der Patient wird als MH-empfindlich (MHS) eingestuft. Das europäische Protokoll erreicht bezüglich der MH-Disposition eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 94%. Bei ca. 7 bis 15 % der Patienten löst entweder nur Halothan oder nur Koffein eine pathologische Muskelkontraktion aus. Diese Patienten werden als MHE (MH equivocal) eingestuft und je nach reaktionsauslösender Substanz als MHEh (alleinige pathologische Reaktion auf Halothan) oder MHEc (nur Koffein) klassifiziert. Aus Sicherheitsgründen werden sie klinisch wie MH-Patienten behandelt. Der Einsatz anderer Substanzen im IVCT zur genaueren Einstufung dieses Patientenkollektivs, z.B. mit Ryanodin oder Chlorokresol, erbrachte keine diagnostisch weiterführenden Erkenntnisse [31].

Das molekulargenetische Testverfahren konzentriert sich auf den Nachweis von Mutationen des Ryanodinrezeptors (RYR 1). Von den über 180 MH-assozierten Mutationen werden zurzeit 30 als kausale Mutationen für eine MH angesehen und zur genetischen Diagnosestellung genutzt. Da nur in ca. 50% der Fälle eine kausative Mutation in MH-Patienten nachgewiesen werden kann, eignet sich der molekulargenetische Test nicht als breit einsetzbares Screeningverfahren. Es kann dann ausschließlich eine molekulargenetische Untersuchung durchgeführt werden, wenn in der Familie der zu untersuchenden Person bereits eine kausale Mutation bekannt ist [32]. Weiterhin besteht die Möglichkeit nach einer fulminanten MH-Krise primär eine Mutationsanalyse durchzuführen. Wird keine Mutation gefunden, schließt sich der IVCT zur sicheren Diagnosestellung an. Aufgrund der genetischen Heterogenität ist ein alleiniges molekulargenetisches Screeningverfahren in absehbarer Zeit nicht zu erwarten.

Wegen der Invasivität des IVCT, dem zeitlichen Aufwand und der hohen Kosten wird zunehmend nach alternativen Untersuchungsmethoden gesucht. Histologische Untersuchungen zeigen nur bei 30-50% der Patienten myopathologische Veränderungen, die zudem sehr unspezifisch sind. Die bei MH-Veranlagten oft leicht erhöhte Kreatinkinase weist lediglich eine Sensitivität von 70% und Spezifität von 50% auf

[33]. Einen weiteren Ansatz stellt die Quantifizierung verschiedener Metabolite des Muskelstoffwechsels wie Laktat und $p\text{CO}_2$ nach lokaler Triggeregabe dar [34].

1.1.9 Wirkungsmechanismus von Halothan und Koffein

Koffein ist ein Methylxanthin, welches den Zellstoffwechsel auf mehreren Wegen beeinflusst. Es blockiert schon in relativ geringen Dosen die neuronalen Adenosinrezeptoren (A₁) im Gehirn. Die Adenosinrezeptoren erhöhen die Öffnungswahrscheinlichkeit neuronaler Kaliumkanäle durch Bindung an das inhibitorische G-Protein. Diese Wirkung wird durch den Antagonismus aufgehoben. Weiterhin inhibiert Koffein das Enzym Phosphodiesterase, das zu einer Erhöhung der intrazellulären Adenosinmonophosphat-Konzentration (cAMP) führt. cAMP als „second messenger“ reguliert den Glykogenmetabolismus. Koffein besitzt darüberhinaus eine hohe Affinität zum Ryanodinrezeptor. Es erniedrigt die Schwelle für die sarkoplasmatische Kalziumfreisetzung und führt bei höherer Dosis zur Kontraktion der Muskulatur [35].

Halothan zählt wie Sevofluran- oder Isofluran zu den volatilen Inhalationsanästhetika. Als halogeniertes Alkanderivat ist es bei Raumtemperatur flüssig und wird zur Applikation in einem Vapor verdampft. Der genaue Wirkungsmechanismus im Rahmen der Narkose ist noch nicht aufgeklärt. Es ist bekannt, dass alle volatilen Anästhetika eine Kalziumfreisetzung aus dem SR induzieren können [36]. Auch eine direkte Wirkung auf die Aktin-Myosin-Wechselwirkung wird diskutiert [37], ebenso wie die Beeinflussung der Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) [38]. Alle Anästhetika aus dieser Gruppe sind in der Lage eine MH-Krise auszulösen, wobei Halothan als potentester Trigger anzusehen ist.

1.2 Mikrodialyse

1.2.1 Prinzip der Mikrodialyse

Seit den siebziger Jahren stellt die Mikrodialysetechnik eines der aussagekräftigsten in-vivo Verfahren dar, um metabolische Prozesse in gesundem und erkranktem Gewebe zu untersuchen. Anhand dieses Verfahrens können Proben direkt aus dem Extrazellulärraum gewonnen und so die Konzentrationen von interstitiellen Substanzen gemessen

werden. Im Vergleich zu in-vitro-Studien wird hierbei die Homöostase des Stoffwechsels durch Präparation nicht beeinflusst. Auch die Untersuchung von Körperflüssigkeiten (z.B. Blut) hat nicht die gleiche Aussagekraft. Aufgrund von kapillären Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke oder Bindung der Substanzen an Proteine, können sich die Plasmakonzentrationen von den Konzentrationen des Extrazellulärraumes unterscheiden.

Das Prinzip der Mikrodialyse (Abbildung 1) basiert auf der Diffusion von Molekülen entlang eines Konzentrationsgradienten zwischen zwei Kompartimenten, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind. Das Interstitium mit all seinen Stoffwechselprodukten stellt das eine, die Mikrodialysesonde mit der darin enthaltenen Perfusionsflüssigkeit das andere Kompartiment dar. Entlang des Konzentrationsgradienten findet in beide Richtungen ein Stoffaustausch an der Dialysemembran der Sonde statt. Das abfließende Dialysat kann gesammelt und analysiert werden.

Entscheidend für die Diffusion sind die Eigenschaften der Mikrodialysemembran wie Porengröße und Ladung. Ist die Mikrodialysemembran lipophil, wird die Diffusion hydrophiler Moleküle erschwert und umgekehrt bei einer negativ geladenen Mikrodialysemembran das Diffundieren lipophiler Stoffe. Daraus abzuleiten ist, dass auch die Ladung des Moleküls und die Molekülgröße Einfluss auf den Diffusionsvorgang haben. Der Konzentrationsgradient zwischen den Kompartimenten sowie die Perfusionsgeschwindigkeit beeinflussen außerdem die Zusammensetzung des Dialysats.

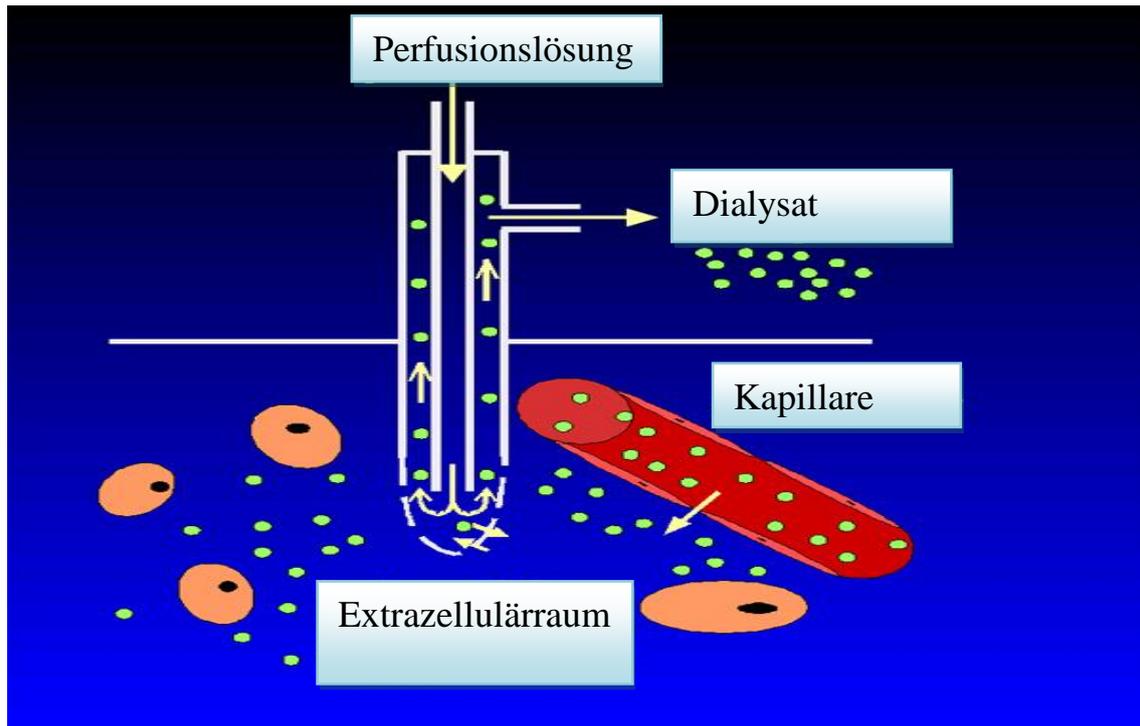


Abbildung 1: Prinzip der Mikro dialyse

(modifiziert nach www.antibiotikamonitor.at/05_45/05_45_06.htm, Heft 4/5/2005;

Mikro dialyse- eine Revolution auf dem Gebiet der Pharmakologie).

1.2.2 Aufbau einer Mikro dialysesonde

Die Mikro dialysesonde (Abbildung 2) besteht aus mehreren funktionellen Komponenten. Der zuführende Schenkel (1) enthält die Perfusionsflüssigkeit und endet innerhalb der frei im Gewebe liegenden röhrenförmigen Mikro dialysemembran (2). So entstehen die Kompartimente für den Stoffaustausch. Je nach Sondentyp unterscheiden sich die Porengröße, das Material und die Länge der Membran. In der Regel besitzen die Membranen eine Porengröße von 3.000 bis 20.000 Dalton, um die Substanzen Glukose, Aminosäuren, Laktat oder bestimmte Pharmaka wie Methylxanthine nachweisen zu können. Die Länge der Membran reicht je nach Modell von 1 bis 10 mm. Häufig verwendete Membranmaterialien sind Polyethersulfone oder Cuprophane. Ist in der Mikro dialysesonde ein Zuspritzkatheter (3) integriert, ist dieser so angebracht, dass er genau in der Mitte neben der Dialysemembran endet. Der abführende Schenkel (4) beginnt am Ende der Dialysemembran und fördert je nach Perfusionsgeschwindigkeit die entsprechende Dialysatmenge nach außen.

In dieser Studie wurde erstmalig eine standardisierte Mikro dialysesonde (Mikro dialysesonde MAB 7) mit integriertem Zuspritzkatheter verwendet. Diese wurden speziell von der Firma Microbiotech (Stockholm, Schweden) angefertigt. Die Innovation besteht in einem an der Mikro dialysemembran fixierten Zuspritzkatheter. In früheren Studien musste neben die Mikro dialysemembran zusätzlich ein 27 G Zuspritzkatheter in die Kanüle eingeführt werden. Die Verwendung der Mikro dialysesonde MAB 7 gewährleistet die sichere korrekte Ausrichtung des Zuspritzkatheters zur Mikro dialysemembran. Dadurch kann eine früher möglicherweise entstandene Fehllage des Zuspritzkatheters ausgeschlossen und damit verbundene potentielle Messartefakte reduziert werden. Des Weiteren stellt die Mikro dialysesonde MAB 7 einen Schritt hin zur Standardisierung des Verfahrens dar.

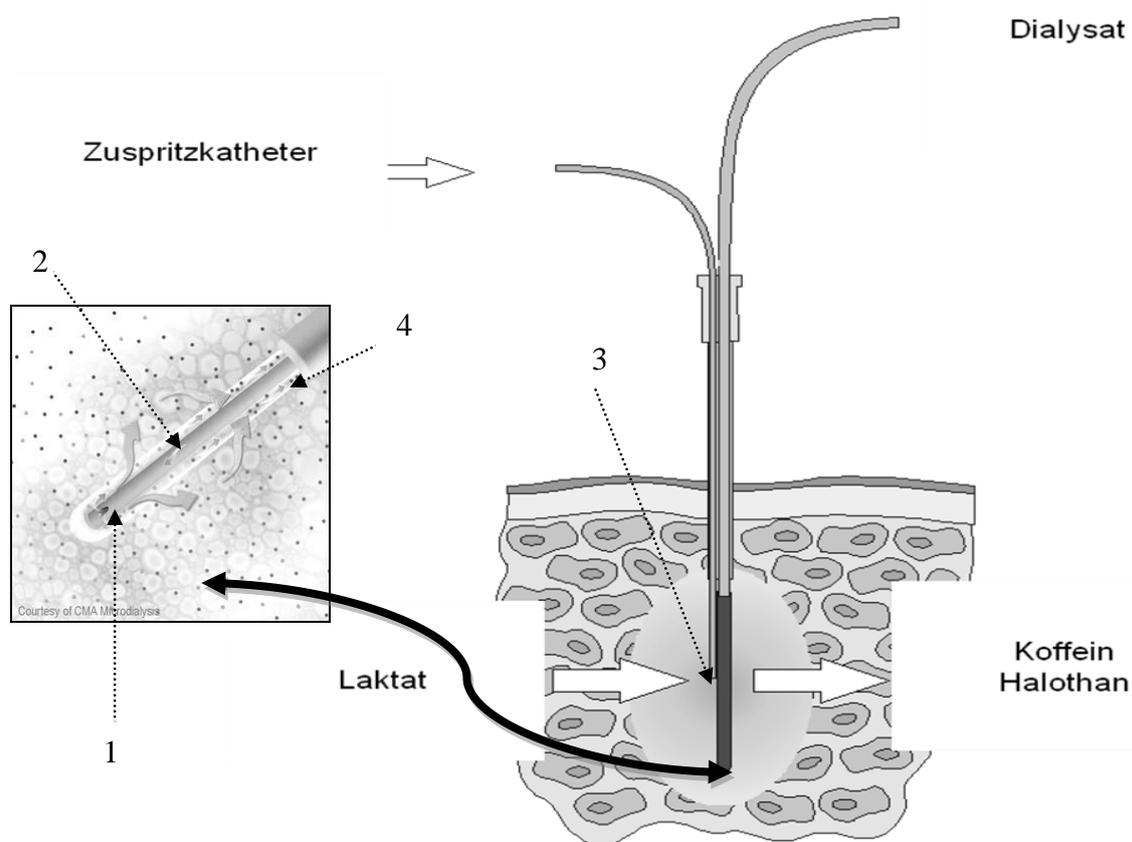


Abbildung 2: Mikro dialysesonde mit integriertem Zuspritzkatheter (1: zuführender Schenkel, 2: Mikro dialysemembran, 3: Zuspritzkatheter, 4: abführender Schenkel. (modifiziert nach M. Sachs: Pilotstudie zur Evaluation eines minimal-invasiven Diagnoseverfahrens der Malignen Hyperthermie, 2007).

1.2.3 Definition und Bestimmung der Recovery

Definition

Es stellt sich bei konstanter Perfusionsgeschwindigkeit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den Stoffkonzentrationen der beiden Kompartimente ein. Die Konzentrationen der Metabolite im Dialysat entsprechen nicht unbedingt den absoluten Konzentrationen im Extrazellulärraum, da während der Perfusion nur ein teilweiser Ausgleich der Konzentrationen stattfindet. Die *Recovery* beschreibt den Anteil eines Stoffes aus dem Extrazellulärraum, der sich im Mikrodialysat befindet. Es werden eine *relative* und eine *absolute Recovery* unterschieden.

Die *relative Recovery* stellt den prozentualen Substanzanteil im Dialysat im Vergleich zum Extrazellulärraum dar. Diese korreliert negativ mit der Perfusionsgeschwindigkeit.

Die *absolute Recovery* ist als die Stoffmenge einer Substanz definiert, die sich nach einer vorgegebenen Zeit im Dialysat befindet und nimmt bei steigendem Perfusionsfluss zu.

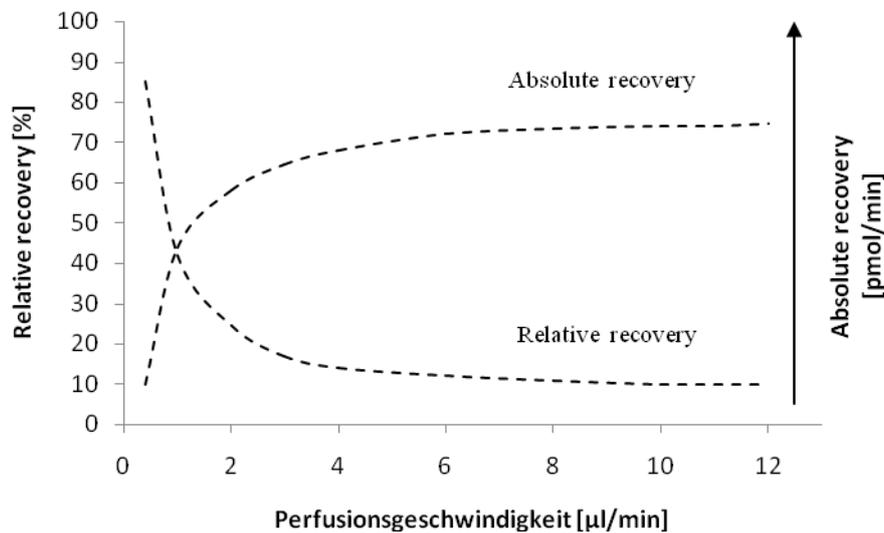


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Perfusionsgeschwindigkeit und absoluter beziehungsweise relativer Recovery (modifiziert nach Agneta Eliason: Principle of Recovery CMA/Mikrodialysis AB, Stockholm, Schweden, 1991).

Bestimmung der relativen Recovery, in-vitro und in-vivo

Mit der Bestimmung der *in-vitro-Recovery* können die Diffusionseigenschaften der Metabolite über die Membran ermittelt werden. Rückschlüsse auf die *in-vivo* Substanzkonzentrationen lassen sich bei der Bestimmung der *relativen in-vitro-Recovery* nur bedingt ziehen, da Metabolite in wässriger Lösung effektiver in das Dialysat übergehen während *in-vivo* das Gewebe und die Zellmembranen eine zusätzliche Barriere darstellen [39]. Die *relative in-vitro-Recovery* wird ermittelt, indem die Mikrodialysesonde in eine Lösung bekannter Metabolitenkonzentration platziert und mit Ringerlösung perfundiert wird. Man erhält die *relative in-vitro-Recovery* gemäß der Formel:

$$\text{Recovery}_{\text{in vitro}} = C_{\text{Dialysat}} / C_{\text{Medium}} * 100$$

Die *in-vivo-Recovery* wird zur Quantifizierung extrazellulärer Konzentrationen verwendet. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die *in-vivo-Recovery* zu bestimmen [39]. Ein Verfahren stellt die „zero-flow“-Methode dar. Die Perfusionsgeschwindigkeit wird schrittweise reduziert und die Konzentration im Dialysat gemessen. Unter der Annahme, dass die *Recovery* bei einer Flussrate null 100% entspricht, wird über eine nicht-lineare Extrapolation die interstitielle Konzentration berechnet. Ein weiteres Verfahren ist die „Non net flux“-Methode. Hierbei wird der Perfusionslösung der zu untersuchende Metabolit in unterschiedlicher Dosierung zugefügt. Die gemessenen Dialysatkonzentrationen werden graphisch gegen die bekannten Konzentrationen der Perfusionslösung aufgetragen. Mit Hilfe einer Regressionsgeraden wird der Punkt bestimmt, an dem es zu keiner Zu- bzw. Abnahme der Metabolitenkonzentration im Dialysat kommt, also kein Transport mehr durch die Membran stattfindet. Diese Konzentration entspricht dem extrazellulären Gehalt des zu untersuchenden Metaboliten. Dieses Verfahren ist vor allem für die Bestimmung der extrazellulären Konzentrationen endogener Substanzen geeignet [39].

1.2.4 Beeinflussende Faktoren

Das Material und die Porengröße der Mikrodialysemembran sind vor allem entscheidend für das Diffusionsverhalten der Metabolite. Eine lipophile Membran erschwert das Passieren hydrophiler Moleküle, sowie umgekehrt eine geladene Membranaußenseite die Diffusion lipophiler Stoffe verhindert. Die Porengröße bestimmt die Durchlässigkeit der Moleküle. Ein weiterer Faktor ist die Länge der Membran. Je länger die Austauschfläche der Sonde ist, um so höher wird die *Recovery* [39].

Die Platzierung der Mikrodialysesonde im Gewebe führt zu einem lokalen Trauma. Je nach Gewebe unterscheidet sich das Ausmaß des Traumas und die Zeit bis zur Wiedereinstellung der Homöostase. Im Gehirn dauert es ca. 24 Stunden bis sich die metabolischen Veränderungen wieder reguliert haben. Bei Untersuchungen am *Musculus quadriceps* zeigten sich bereits ca. 15 Minuten nach Implantation wieder konstante Werte für Glukose und Laktat [40].

Die Flussgeschwindigkeit der Perfusionslösung hat Einfluss auf die *relative Recovery* sowie auf das umliegende Gewebe. Die *relative Recovery* und die Stoffkonzentration nehmen mit steigender Flussrate ab. Bei hohen Flussraten kommt es zu einem Verlust von Perfusionsflüssigkeit in das umliegende Gewebe und zu einer Drainage der Metabolite im Umfeld der Sonde [39]. Beides verändert die Homöostase in dem zu untersuchenden Gewebe.

Die Zusammensetzung der Perfusionslösung (Osmolarität, ionale Zusammensetzung, pH-Wert) sollte möglichst der des Extrazellulärraumes entsprechen. So können minimale Veränderungen im Extrazellulärraum gut untersucht und mögliche Auswirkungen der Perfusionslösung auf den Gewebestoffwechsel vermieden werden. Die Temperatur der Perfusatlösung hat keinen relevanten Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse gezeigt [41].

1.3 Fragestellung

Der In-Vitro-Kontrakturtest (IVCT) ist die Standardmethode zur Diagnostik einer MH-Veranlagung. Es handelt sich um ein sehr invasives Verfahren und beinhaltet alle

Risiken eines operativen Eingriffs wie Infektion, Blutung, Nervenverletzung und Wundheilungsstörung. Der IVCT ist zudem sehr aufwendig, in finanzieller wie auch zeitlicher Hinsicht. Die Entwicklung eines minimal-invasiven und flexibel einsetzbaren Testverfahrens würde nicht nur die Risiken eines solchen Eingriffs massiv verringern, sondern könnte auch die MH-Diagnostik um ein vielfaches zugänglicher für den klinischen Alltag werden lassen.

In vorhergehenden Studien wurde basierend auf der Mikrodialysetechnik ein minimal-invasiver Test entwickelt. Die Triggersubstanzen Koffein und Halothan wurden lokal in den Oberschenkelmuskel der Probanden appliziert. Anhand der Messung der Laktatkonzentration wurde der lokale intramuskuläre Metabolismus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Applikation der MH-Triggersubstanzen zu einem messbaren und nachvollziehbaren Anstieg der intramuskulären Laktatkonzentration kommt und eine Unterscheidung zwischen MHN- und MHS-Individuen möglich ist [42]. In der vorliegenden Studie werden zur Weiterentwicklung dieses minimal-invasiven Verfahrens folgende Fragestellungen untersucht:

1. Stellt die Verwendung der standardisierten Mikrodialysesonde MAB 7 mit integriertem Zuspritzkatheter einen weiteren Schritt hin zur Vereinfachung der Methodik dar?
2. Führt die intramuskuläre Injektion von Halothan 4 Vol% und Koffein 80 mM, unter Einsatz der Mikrodialysesonde MAB 7 mit integriertem Zuspritzkatheter, bei MH-veranlagten Probanden zu einem deutlicheren intramuskulären Anstieg der Laktatkonzentration als bei nicht MH-veranlagten Individuen?
3. Zeigen MHN-Probanden mit chronisch erhöhter Kreatinkinase und unspezifischen myopathischen Symptomen (MHN-Neuro) im metabolischen Test möglicherweise unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zu MHN-Individuen ohne neurologische Anamnese?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Mikrodialysesonden

Für die Messungen wurden speziell gefertigte, sterile Mikrodialysesonden (MAB 7 Injection Microdialysis probes, Microbiotech, Stockholm, Schweden) mit einem integrierten Zuspritzkatheter verwendet. Die Mikrodialysemembran hat eine Länge von 10 mm, einen Außendurchmesser von 0,6 mm und besteht aus Polyethersulfon. Die Porengröße beträgt 15.000 Dalton, das Totraumvolumen des Katheterschenkels und des abführenden Schenkels je 12,6 μl .

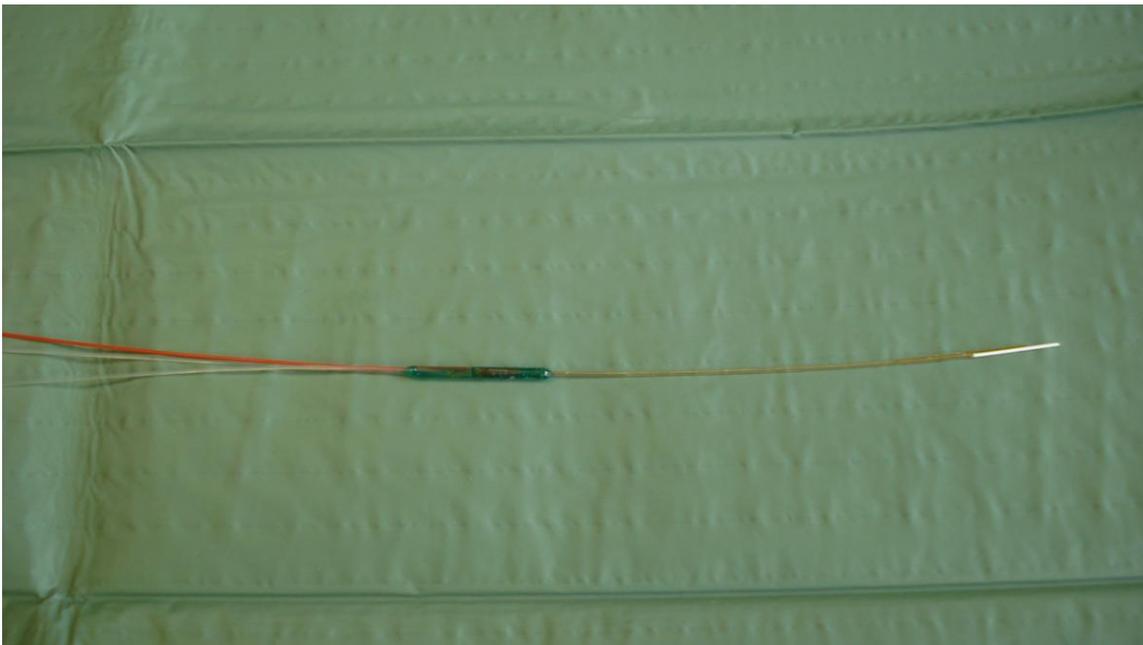


Abbildung 4: speziell angefertigte Mikrodialyseprobe MAB 7 mit integriertem Zuspritzkatheter.

2.1.2 Injektionslösungen und Substanzen

Die zur Triggerapplikation benötigte Koffeinlösung 80 mM wurde von der Klinikapotheke der Universität Würzburg hergestellt und in 10 ml große, braune Glasflaschen abgefüllt.

Die zweite Triggerlösung bestand aus einem Halothan-Sojabohnenöl-Gemisch (Halothan: Sigma-Aldrich, München, Deutschland; Lipofundin 20%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Diese wurde ca. 10 Minuten vor der Applikation unter sterilen Bedingungen in einem sterilen, gasdichten 50 ml Glaskolben angesetzt (Tabelle 1). Der Glaskolben wurde mit einem Glaspfropf verschlossen und der Inhalt durch kontinuierliches Schütteln in Lösung gehalten.

Halothan	Sojabohnenöl
0,5 ml	12 ml

Tabelle 1: Zusammensetzung der Halothan-Sojabohnenöl-Lösung 4 Vol%.

Für die Bestimmung der Laktatkonzentration im Dialysat wurde Laktatreagenz (Trinity Biotech, Wicklow, Irland) benutzt. Um dieses aufzulösen wurde aqua ad injectabilia (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet. Als Laktatstandard zur Erstellung der Standardkurve und zur Kontrolle der Laktatmessung (Trinity Biotech, Wicklow, Irland) dienten Lösungen der Konzentrationen 20 mM, 80 mM und 120 mM. Die Sonden wurden mit Ringer-Lösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) perfundiert.

2.1.3 Geräte

Die Laktatkonzentration im Dialysat wurde mit dem HP 8453-UV-Visible Spektrophotometer (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) zusammen mit einem Vectra XA-Computer (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) und dem Software Programm Visible-Chem-Station (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) bestimmt.

Zur Mischung des Laktatreagens mit der Dialysatflüssigkeit diente ein Schüttelgerät (Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA).

Während der gesamten Studie kamen stets die gleichen Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit einem Volumen von 1000 µl bzw. 0-200 µl und den zugehörigen Pipettenspitzen (Hartmann, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz.

Die Labordiagnostik der Blutproben führte das Zentrallabor der Universität Würzburg durch. Die Auswertung der Blutgasanalysen erfolgte im Blutgasanalysator (Radiometer ABL 615, Willich, Deutschland) der chirurgischen Intensivstation des Zentrums für operative Medizin der Universität Würzburg.

Es wurde eine Präzisions-spritzenpumpe (PHD 2000-Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) mit vier dazu kompatiblen 1 ml Spritzen (Luer-LokTM Tip, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) zur Perfusion der Sonden mit Ringer-Lösung eingesetzt. Zur Applikation der Triggersubstanzen wurde eine weitere Spritzenpumpe (PHD 2000-Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) mit vier kompatiblen 1 ml Spritzen (Luer-LokTM Tip, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

2.2 Versuchsprotokoll

2.2.1 Probanden

Es wurden 18 männliche und 12 weibliche Probanden (ASA I und II) im Alter von 20 bis 54 in die Studie aufgenommen. Die MHS- und MHN-Probanden wiesen eine persönliche bzw. familiäre MH-Anamnese auf oder zeigten eine unspezifische neurologische Symptomatik, die die Differentialdiagnose einer MH miteinschloss. Alle Probanden waren zuvor mittels IVCT eindeutig diagnostiziert worden. Sieben Studienteilnehmer waren MH-suszeptibel und sechzehn MH-nicht-suszeptibel. Von den sechzehn MHN-Probanden wiesen sieben eine neurologische Anamnese mit Muskelschwäche, intermittierenden Muskelkrämpfen und einer CK-Erhöhung > 300 U/l auf. Sie wurden als MHN-Neuro-Gruppe definiert. Als Kontrollgruppe wurden sieben gesunde Probanden ohne Verdacht auf persönliche und familiäre MH-Veranlagung untersucht. Probanden mit einem BMI größer als 35 kg/m², sowie Probanden mit einem

Laktatwert > 2 mmol/l im peripher-venösen Blut unmittelbar vor der Untersuchung wurden von der Studie ausgeschlossen.

2.2.2 Vorbereitung der Probanden

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Würzburg wurden alle Untersuchungen auf der perianästhesiologischen Station (PAS) der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Zentrums für operative Medizin der Universität Würzburg durchgeführt. Eine kontinuierliche ärztliche Betreuung und der Zugriff auf Notfallmedikamente waren zu jeder Zeit gewährleistet. Die Probanden wurden durch den Versuchsleiter in einem telefonischen Vorgespräch sowie unmittelbar vor Beginn der Untersuchung über die freiwillige Teilnahme an der Studie aufgeklärt. Der Patient gab schriftlich sein Einverständnis auf einem Aufklärungsbogen.

Der Proband lag während der gesamten Untersuchung in einem Patientenbett und wurde zu Beginn gebeten, sich bequem zu positionieren, um sich während des Versuchs möglichst wenig zu bewegen. Das zu untersuchende Bein wurde zur Stabilisierung in einer Beinschiene aus Schaumstoff gelagert. Die Vitalparameter (Herzfrequenz, Blutdruck, periphere Sauerstoffsättigung) wurden während des gesamten Tests überwacht. Der Blutdruck wurde alle 15 Minuten gemessen. Weiterhin wurde ein venöser Zugang gelegt und eine Blutentnahme sowie eine Blutgasanalyse durchgeführt. Die Ausgangswerte für CK und Myoglobin im Serum sowie der pH-Wert, Kohlendioxidpartialdruck, Basenüberschuss und die Laktatkonzentration konnten so ermittelt werden.

2.2.3 Platzierung der Kanülen

Durch Anspannen der Oberschenkelmuskulatur wurde die Lokalisation des Musculus vastus lateralis bestimmt. Es folgte die Desinfektion und gegebenenfalls Rasur der Haut über dem Muskel. Das Untersuchungsgebiet wurde steril mit einem Lochtuch abgedeckt und ein Lokalanästhetikum (10 ml Scandicain 1%: AstraZeneca, Wedel, Deutschland) subkutan injiziert. Nach erneuter Desinfektion wurden vier 16 G Katheter (Insyte, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) nebeneinander (zwei lateral, zwei medial)

im Abstand von mindestens 2.5 Zentimetern in einem Winkel von 30° in kranialer Richtung in den Musculus vastus lateralis platziert. Die Eindringtiefe betrug ca. 6 cm. Der Totraum der Mikrodialysesonden wurde durch Spülung mit Ringerlösung gefüllt. Die Mikrodialysesonden wurden bis zum vorderen Ende in die 16 G Kanülen eingeführt und anschließend die Kanülen ein kleines Stück zurückgezogen. Dies gewährleistete die vollständige Lage der Membran und des Zuspritzkatheters im Muskel. Mit Hilfe eines Ultraschallgerätes wurde die korrekte Lage der Kanülen überprüft (Abbildung 6). Entscheidend dabei war, dass die Enden der Kanülen sicher im Muskel lagen. Bei unsicherer intramuskulärer Lage wurde die Sonde replaziert.

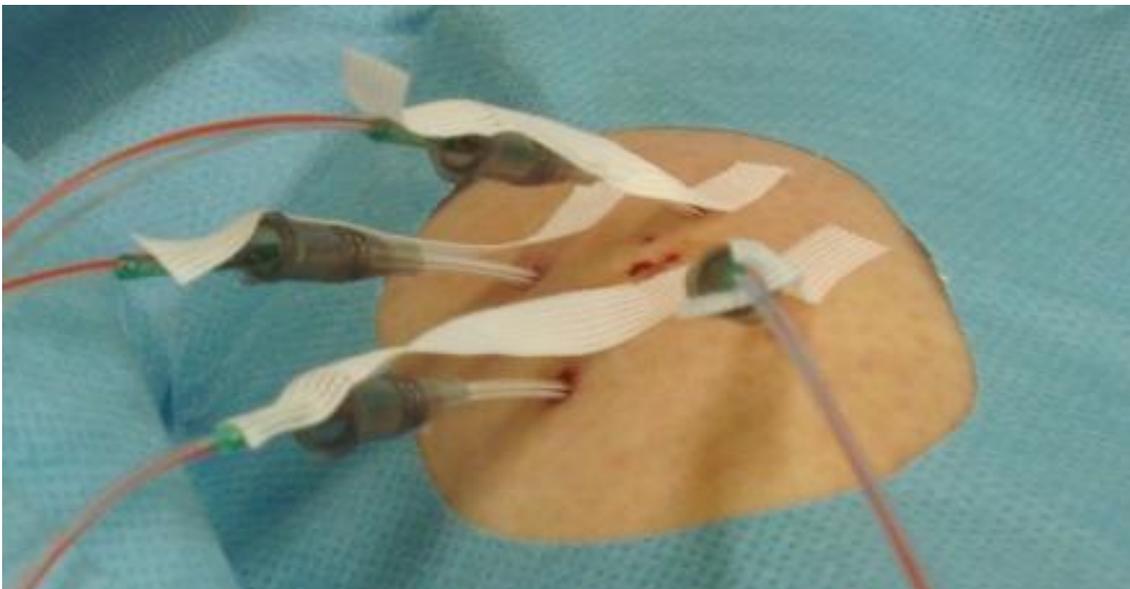


Abbildung 5: Versuchsaufbau; Intramuskuläre Lage der 4 Kanülen mit je einer Mikrodialysesonde.

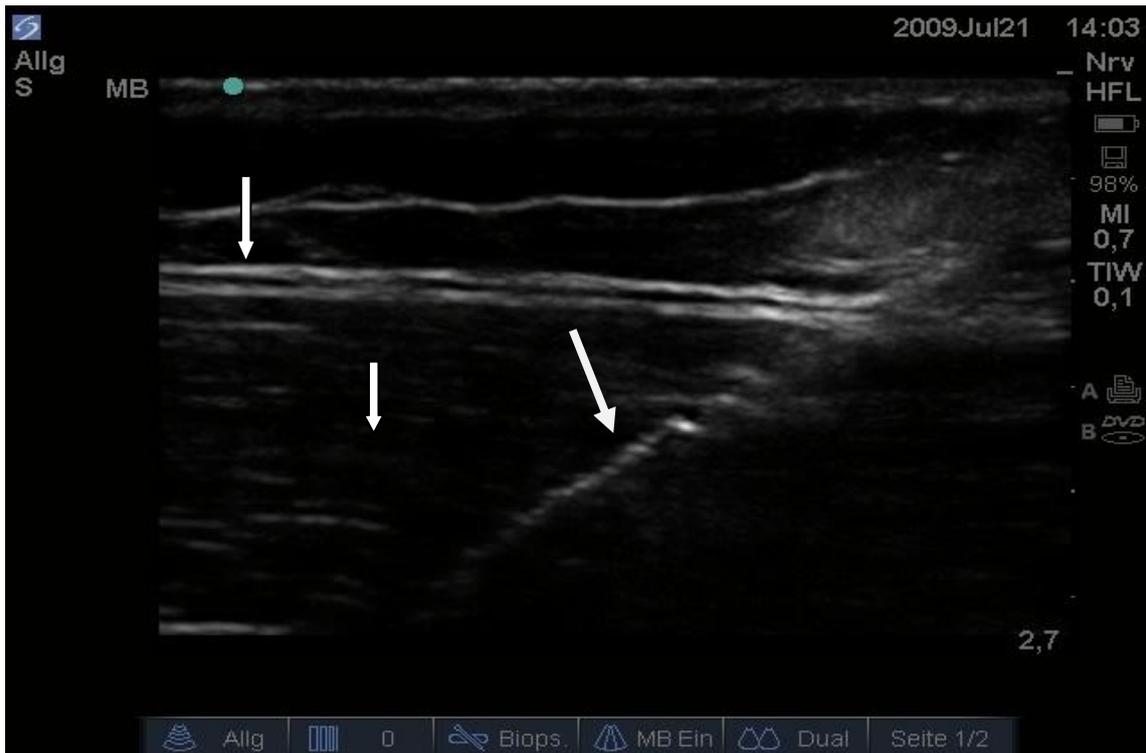


Abbildung 6: Ultraschallbild (→ von links nach rechts): Muskelfaszie, Muskelgewebe, intramuskuläre Lage der Kanüle.

2.2.4 Messung und Stimulation

Die Sonden wurden zu Beginn für zehn Minuten mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert, um Luftblasen im System zu eliminieren. Anschließend wurde die Perfusion mit 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ weitergeführt. Es folgte eine 20-minütige Äquilibrationsphase zur Einstellung eines stabilen physiologischen Milieus im Muskel. Im Anschluss begann die Messung. Ein Messwert war definiert als die Menge an Dialysatflüssigkeit, die in 15 Minuten mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ von jeder Messsonde gefördert wurde und entsprach einer Menge von 15 μl . Nach Abnahme des ersten und zweiten Messwerts, zur Bestimmung der Ausgangskonzentration vor Stimulation, wurden über die beiden medialen Sonden je 200 μl Halothan 4 Vol% und über die beiden lateralen Sonden je 200 μl Koffein 80 mM mit einer Geschwindigkeit von 70 $\mu\text{l}/\text{min}$ über den Perfusor in den Muskel appliziert.

Anschließend wurden vier weitere Proben gesammelt. Insgesamt wurden sechs Messungen über einen Zeitraum von 90 min durchgeführt. Die Dialysatproben wurden bis zur spektrometrischen Messung bei 4°C gelagert.

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Sonden entfernt, die Wunden mit LeukoStrip (Smith&Nephew, Hull, England) steril abgedeckt und ein Kompressionsverband (Hartmann, Heidenheim, Deutschland) am Oberschenkel angelegt. Um die Ausgangswerte zu vergleichen, wurde eine zweite Blutentnahme und Blutgasanalyse durchgeführt.

Direkt nach der Platzierung der Kanülen, Applikation der Triggersubstanzen und Entfernung der Sonden wurde je ein Schmerzwert anhand der Visuellen Analogskala (VAS) erhoben.

Die Probanden konnten wenige Zeit später schmerzfrei und kreislaufstabil entlassen werden. Eine erneute Kontrolle der CK- und Myoglobinwerte erfolgte am Tag nach der Untersuchung.

2.2.5 Fragebogen

Die Patienten erhielten am Ende des Versuchs einen Fragebogen, den sie ausfüllen und zurückschicken sollten. Darin wurden Fragen zur Wundheilung, Dauer der Beeinträchtigung bzw. Akzeptanz des Verfahrens gestellt sowie um eine erneute Schmerzbewertung mittels VAS gebeten (siehe Anhang, Tabelle 13).

2.3 Analyse

2.3.1 Standardkurve Laktat

Um die Laktatkonzentrationen im Dialysat messen zu können, muss initial eine Eichkurve für Laktat erstellt werden. Dazu werden spektrometrisch Laktatstandardlösungen verschiedener Konzentrationen (2,2 mM, 4,4 mM und 6,6 mM) gemessen. 10 µl Laktatstandard werden zusammen mit 1000 µl Laktatreagenz für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wird die Lösung in eine Glasküvette pipettiert und die Absorption bei 540 nm im Spektrophotometer gemessen.

Bei der beschriebenen enzymatischen Methode wird Laktat durch die Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgewandelt. In Gegenwart von H_2O_2 katalysiert die Peroxidase die oxidative Kondensierung chromogener Vorstufen, die einen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 540 nm bilden. Gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz ist die gemessene Absorption direkt proportional zu der Laktatkonzentration in der Probe. Aus den gemessenen Werten wird eine lineare Laktatstandardkurve (Abbildung 7) erstellt. Anhand dieser Eichkurve kann später durch die gemessene Absorption einer Dialysatprobe die Laktatkonzentration bestimmt werden.

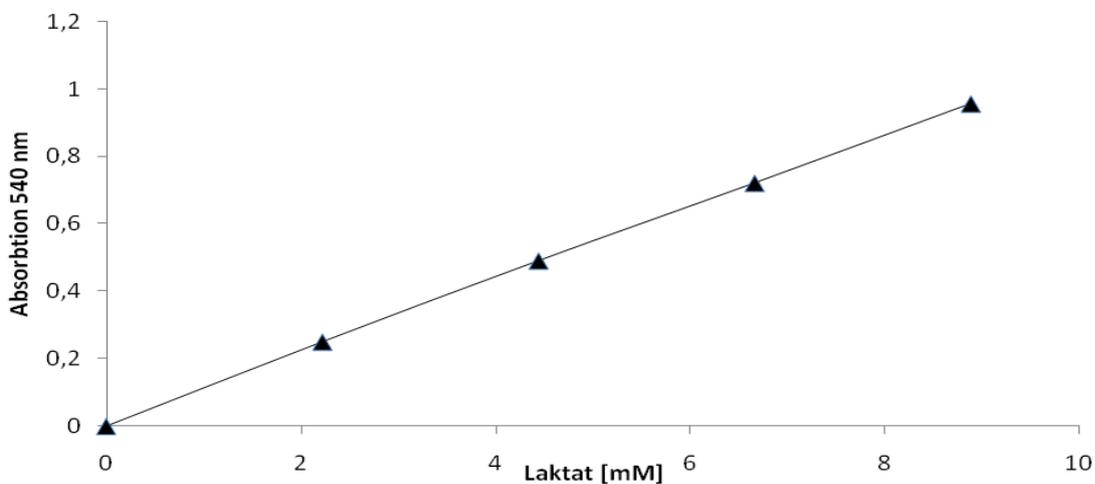


Abbildung 7: Laktatstandardkurve.

2.3.2 Probenanalyse

Die Bestimmung der Laktatkonzentration in der Dialysatflüssigkeit erfolgte direkt im Anschluss an die Untersuchung der Probanden. 10 μl des Dialysats wurden mit 1000 μl Laktatreagenz in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, vermischt und für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. 1000 μl dieser Lösung wurden in einer Glasküvette bei 540 nm spektrometrisch gemessen. Um eine Verunreinigung des Laktatreagenz auszuschließen, wurde zu Beginn der Messung das Laktatreagenz gegen aqua ad injectabilia als Referenz gemessen. Die Absorption durfte einen Wert von 0,08 nm nicht übersteigen. In solch einem Fall hätte das angesetzte Laktatreagenz verworfen werden müssen. Zur Überprüfung der Messgenauigkeit des Verfahrens wurden die Konzentrationen der

Laktatstandards gemessen. Eine Abweichung von bis zu 10% wurde toleriert. Alle Proben wurden mit derselben Glasküvette vermessen, die nach jeder Benutzung mit destilliertem Wasser gesäubert wurde.

2.3.3 Statistik

Eine Randomisierung war aufgrund der unterschiedlichen Verfügbarkeit der MH-positiven, MH-negativen und der Kontrollprobanden gegeben.

Die Daten sind als Median und Quartilenspanne (25% und 75%) angegeben. Um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu untersuchen, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurden Unterschiede zwischen jeweils 2 Gruppen (MHS vs. MHN, MHS vs. Kontrollgruppe, MHS vs. MHN-Neuro, MHN-Neuro vs. MHN, MHN-Neuro vs. Kontrollgruppe und MHN- vs. Kontrollgruppe) untersucht. Veränderungen der Kreatinkinase- und Myoglobinwerte wurden mittels Wilcoxon-Tests überprüft. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

2.4 Ermittlung der relativen Recovery

Es wurde die relative Recovery in-vitro zur Messung der Diffusionseigenschaften der Membran bzw. zur Qualitätskontrolle der Sonde bestimmt.

Die Mikrodialysemembranen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit einer Laktatkonzentration von 1,1 mM plaziert und mit Ringerlösung in unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten (0,5; 1; 2; 5; 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) perfundiert. Es wurden jeweils 2 Proben mit einer Volumenmenge von 15 μl gesammelt und die erste Probe zu Beginn jeder Flussgeschwindigkeitsänderung verworfen.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der relativen Recovery in-vitro

Die relative Recovery wurde bei einer bekannten Laktat-Stammlösung für verschiedene Perfusionsgeschwindigkeiten bestimmt (Abbildung 8). Sie korrelierte negativ mit den Flussraten von 0,5; 1; 2; 5 und 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, wobei sie bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 94 [93-96] % erreichte und bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf 0% abfiel. Bei der in unserer Untersuchung eingesetzten Perfusionsgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ lag die relative Recovery bei 78 [74-79] %.

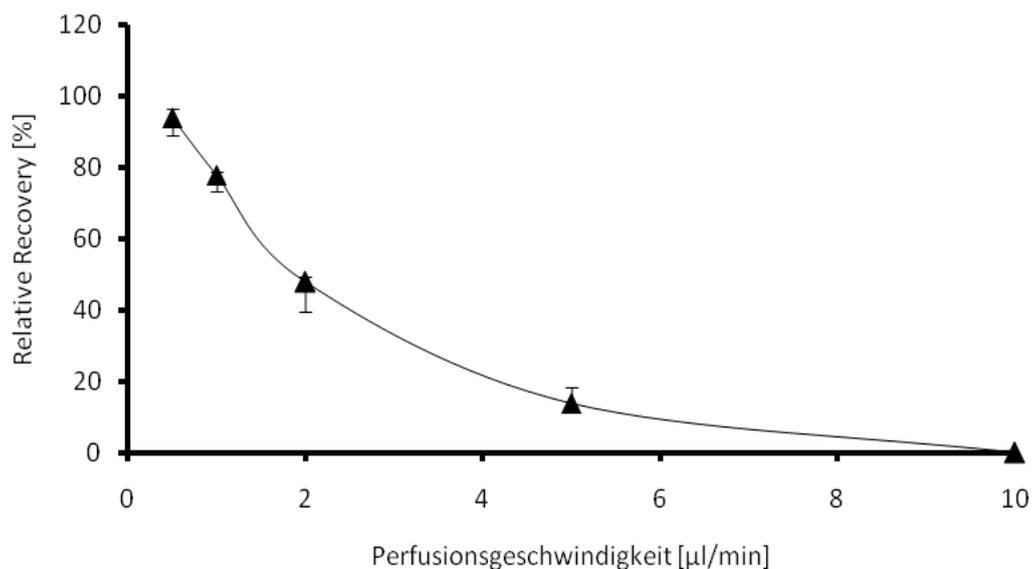


Abbildung 8: Relative Recovery, MAB 7 Mikrodialysesonden bei verschiedenen Perfusionsgeschwindigkeiten, n (Anzahl der Sonden) =7, Median und Quartilenspanne.

3.2 Probandenstudie

3.2.1 Biometrische Daten

Die vier untersuchten Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der biometrischen Daten (Tabelle 2). Es bestand eine verwandtschaftliche Beziehung ersten Grades zwischen 2 Probanden innerhalb der Kontrollgruppe. Drei der sieben MHS-Studienteilnehmer wiesen eine kausale MH-Mutation auf. Ein MHS-Proband wurde ausschließlich mittels genetischen Screening diagnostiziert.

Drei Probanden mit der Diagnose MHEh wurden von der Studie ausgeschlossen.

	Probanden- anzahl	Geschlecht[m/w]	Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]
MHS	7	5/2	35[29-41]	24 [23-26]
MHN	9	6/3	40[40-44]	25 [22-26]
MHN-Neuro	7	4/3	48[41-49]	32 [24-33]
Kontrolle	7	3/4	23[23-25]	21 [21-22]

Tabelle 2: Biometrische Daten, Median und Quartilenspanne, BMI (Body Mass Index), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible), MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible), MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese), Kontrolle (Kontrollgruppe).

3.2.2 Vitalparameter

Während des gesamten Versuchs unterschieden sich MHS-, MHN-, MHN-Neuro- und Kontrollprobanden im Bezug auf mittleren arteriellen Blutdruck und Herzfrequenz nicht (Abbildung 9 und 10). Alle untersuchten Personen hatten konstant eine periphere Sauerstoffsättigung von über 96%.

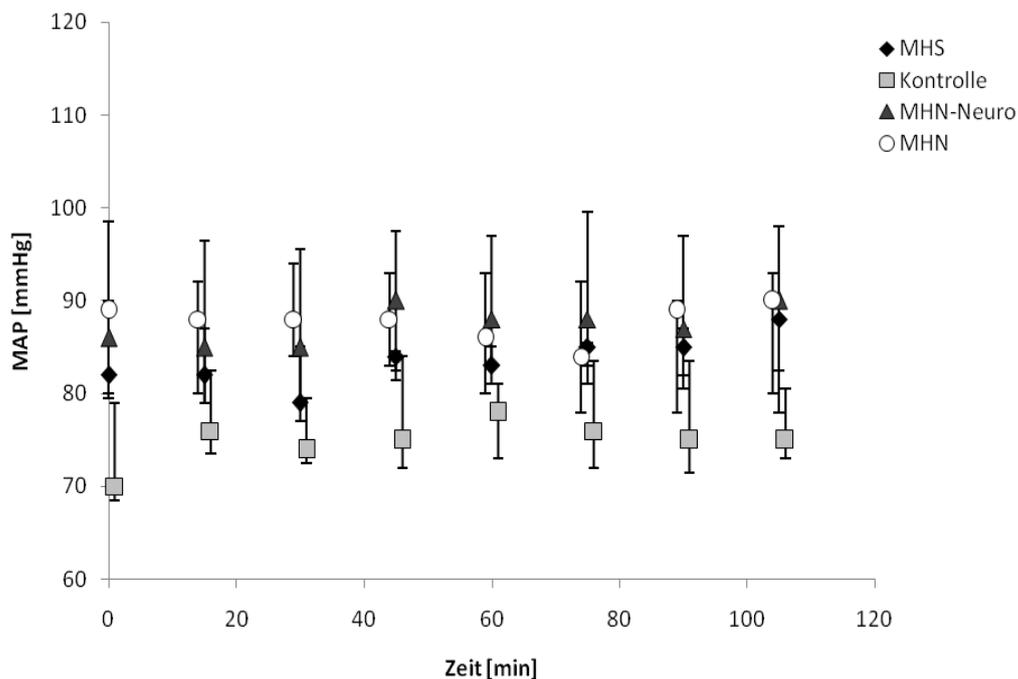


Abbildung 9: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) während der Untersuchung im zeitlichen Verlauf, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7.

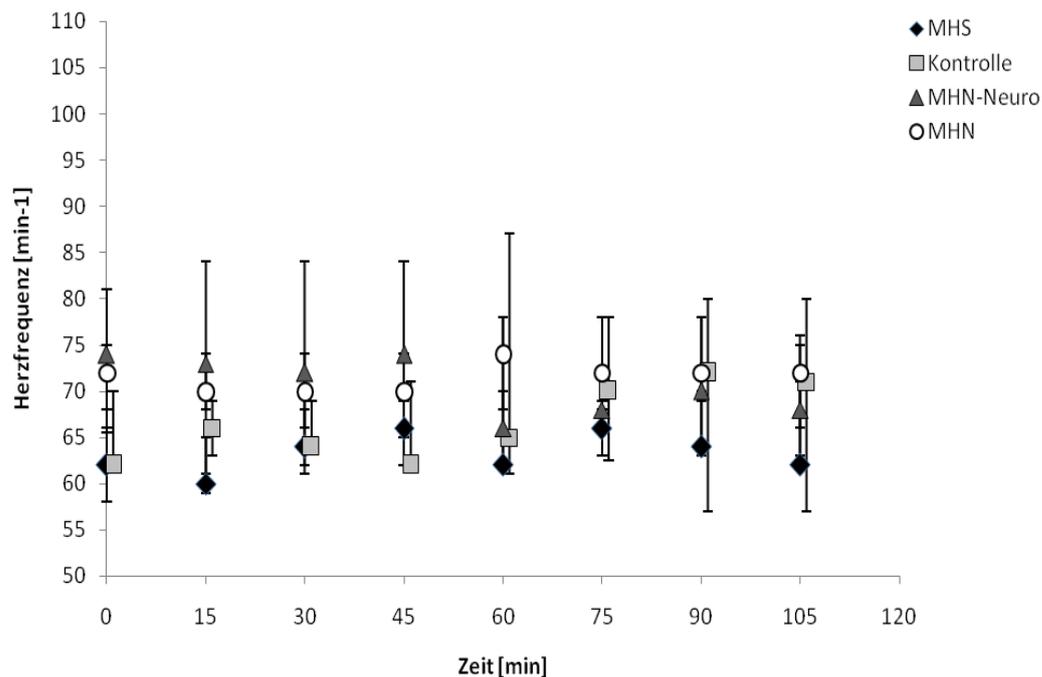


Abbildung 10: Herzfrequenz während der Untersuchung im zeitlichen Verlauf, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7.

3.2.3 Peripher-venöse Blutgasanalyse

Zu Beginn der Untersuchung lag der pH-Wert, Kohlendioxidpartialdruck, Basenüberschuss und die Laktatkonzentration bei allen Probanden im physiologischen Bereich und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 3).

Versuchsbeginn	pH	pCO ₂ [mmHg]	BE [mmol/l]	Laktat[mmol/l]
MHS	7,4 [7,4-7,4]	40 [37-44]	0,6[-1,1-1,7]	0,8 [0,7-1,1]
MHN	7,4 [7,3-7,4]	45 [42-47]	1,0[0,2-1,9]	1,0 [0,8-1,1]
MHN-Neuro	7,4 [7,4-7,4]	42 [40-44]	1,3[0,6-1,9]	1,2 [1,2-1,5]
Kontrolle	7,4 [7,4-7,4]	48 [42-52]	2,3[1,4-4,2]	1,3 [1,3-1,4]

Tabelle 3: Metabolische Parameter zu Versuchsbeginn (peripher-venöse Abnahme), Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), pH (Potentia hydrogenii), pCO₂ (Kohlendioxidpartialdruck), BE (Basenüberschuss), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7.

60 Minuten nach Triggerapplikation wurde eine weitere Blutgasanalyse durchgeführt. Die gemessenen Parameter waren ebenfalls im physiologischen Bereich und unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Tabelle 4).

Versuchsende	pH	pCO ₂ [mmHg]	BE [mmol/l]	Laktat [mmol/l]
MHS	7,4 [7,4-7,4]	40 [38-49]	0,6[0,6-1,4]	0,9 [0,6-1,4]
MHN	7,4 [7,4-7,4]	42 [41-43]	0,7[-1,0-0,9]	0,8 [0,7-0,9]
MHN-Neuro	7,4 [7,4-7,4]	40 [34-43]	1,3[-1,5-2,9]	1,1 [1,1-1,3]
Kontrolle	7,4 [7,4-7,4]	43 [42-45]	1,4 [0,8-3,5]	1,3 [0,8-1,4]

Tabelle 4: Metabolische Parameter 60 min nach Triggerapplikation (peripher-venöse Abnahme), Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), pH (Potentia hydrogenii), pCO₂ (Kohlendioxidpartialdruck), BE (Basenüberschuss), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7.

3.2.4 Muskelenzyme

Kreatinkinase

In der MHN-Neuro-Gruppe waren die Medianwerte der Kreatinkinase konstant am höchsten (Abbildung 11). Der größte Anstieg war in der MHS-Gruppe zu verzeichnen. Dort stieg der Wert von 195 U/l auf 513 U/l innerhalb 24 Stunden nach der Untersuchung. Der höchste individuelle Wert wurde bei einem MHS-Probanden gemessen. Er betrug 1869 U/l nach der Untersuchung, bei einem Ausgangswert von 1805 U/l. Die Medianwerte der MHS- als auch der MHN-Neuro-Gruppe waren zu jedem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich im Vergleich zur MHN- und Kontrollgruppe.

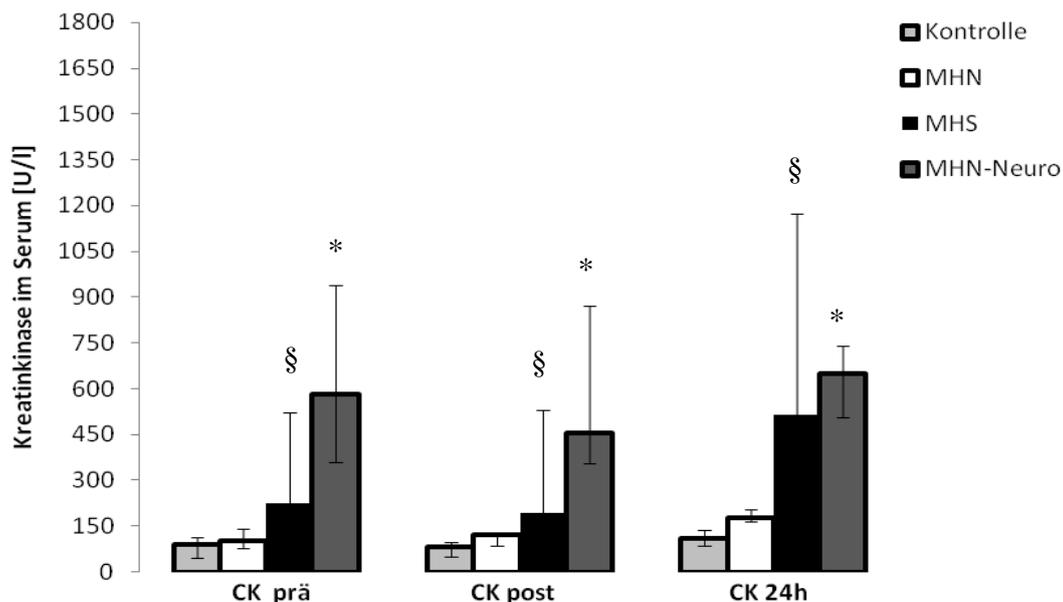


Abbildung 11: Kreatinkinase (CK) im Serum zu Versuchsbeginn (CK prä) sowie 60 min nach Triggerapplikation (CK post) und 24h nach der Untersuchung, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7, *: $p < 0,05$ MHN-Neuro vs. MHN/Kontrollgruppe, §: $p < 0,05$ MHS vs. MHN/Kontrollgruppe.

Myoglobin

Die Myoglobin-Medianwerte der MHN-Neuro-Gruppe im Serum waren bei allen drei Messungen am höchsten (Abbildung 12). In der Kontrollgruppe wurden die Werte konstant niedrig zwischen 25 und 27 $\mu\text{g/l}$ gemessen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den drei anderen untersuchten Gruppen, sowie zwischen der MHN- und MHN-Neuro-Gruppe. Die MHS- und MHN-Teilnehmer unterschieden sich in dem 24 Stundenwert.

Der höchste Myoglobinwert von 219 $\mu\text{g/l}$ wurde bei einem MH-positiven Probanden direkt nach der Untersuchung gemessen.

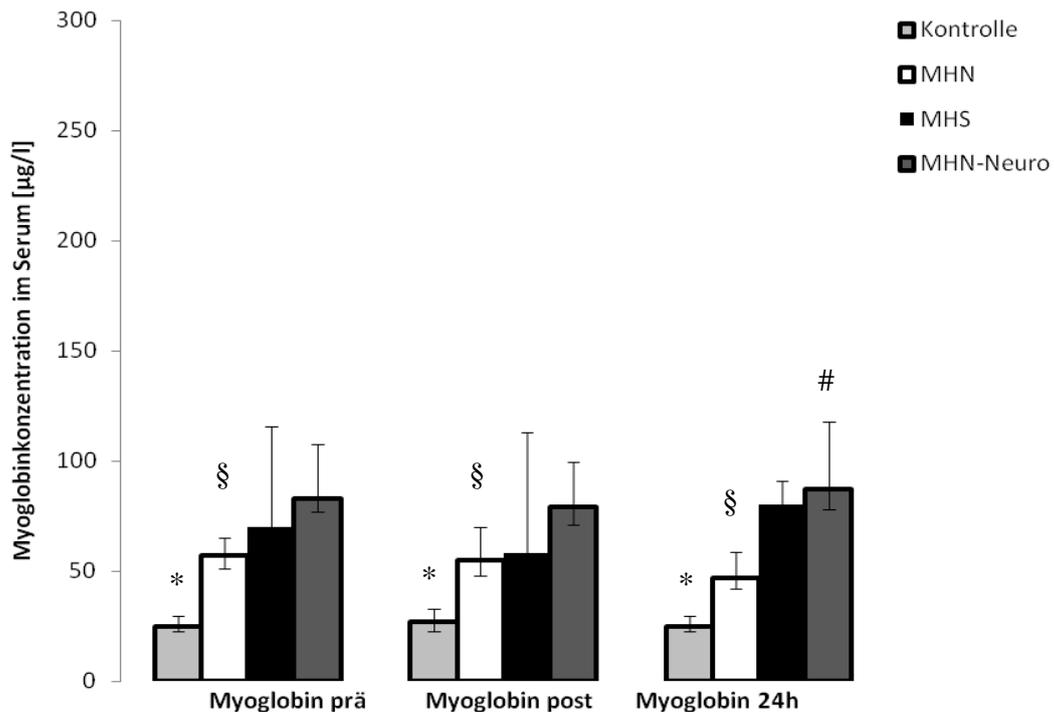


Abbildung 12: Myoglobin im Serum zu Versuchsbeginn (Myoglobin prä) sowie 60 min nach Triggerapplikation (Myoglobin post) und 24h nach der Untersuchung, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7, *: $p < 0,05$ Kontrollgruppe vs. MHS-/MHN-/MHN-Neuro, §: MHN vs. MHN-Neuro, #: MHN vs. MHS.

3.2.5 Laktatmessung

Zeitlicher Verlauf der Laktatkonzentration nach Halothan 4 Vol%-Stimulation

Der erste und zweite Ausgangswert lag bei beiden Sonden für alle vier untersuchten Gruppen zwischen 0,44 mM bis 0,87 mM. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht (Abbildung 13).

30 Minuten nach Stimulation stiegen die Konzentrationen in der MHS-Gruppe von einem Ausgangswert von 0,55 [0,47-0,73] mM auf 4,73 [2,40-6,66] mM. In der MHN-Neuro-Gruppe kam es zu einem Anstieg von 0,49 [0,34-0,74] mM auf 0,96 [0,75-3,16] mM. Die Werte der MHN- und Kontrollgruppe verhielten sich ähnlich. In der MHN-Gruppe stieg die Laktatkonzentration von 0,48 [0,39-0,74] mM auf 0,82 [0,67-1,28] mM und in der Kontrollgruppe von 0,54 [0,39-0,87] mM auf 0,98 [0,45-1,44] mM. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Anstieg 30 min nach der Stimulation zwischen der MHS-Gruppe und den drei anderen Gruppen. Die Messung wurde nicht bis zum Erreichen der Ausgangswerte weitergeführt. Zwei Sonden in der MHN- und eine Sonde in der MHS-Gruppe förderten kein Dialysat.

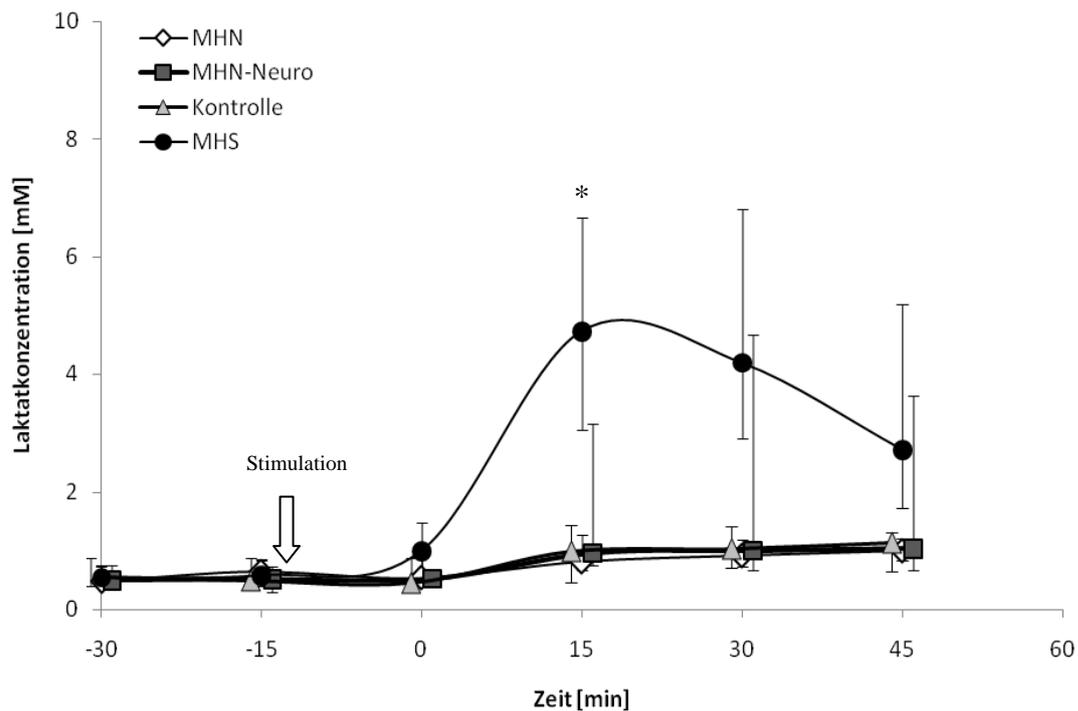


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der intramuskulären Laktatkonzentration beider Halothansonden nach Stimulation mit 200 µl Halothan 4 Vol%, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7, *: p<0,05 für MHS vs. MHN/MHN-Neuro/Kontrollgruppe.

Zeitlicher Verlauf der Laktatkonzentration nach Koffein 80 mM-Stimulation

Der erste und zweite Messwert lag bei beiden Sonden für alle vier untersuchten Gruppen zwischen 0,36 mM und 0,81 mM. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 14).

30 min nach Applikation stieg in der MHS-Gruppe die Konzentration von 0,66 [0,56-0,85] mM auf 2,35 [1,42-4,01] mM. Die Laktatwerte der MHN-Neuro-Gruppe stiegen von 0,69 [0,38-0,79] mM auf 1,08 [0,9-1,46] mM. Der Anstieg in der MHN- und Kontrollgruppe war gering ausgeprägt. Von 0,75 [0,37-0,83] mM als Ausgangswert in der Kontrollgruppe bzw. von 0,71 [0,48-0,91] mM in der MHN-Gruppe stiegen die Werte auf 1,23 [0,86-1,6] mM bzw. 0,9 [0,77-1,22] mM. Der Unterschied zwischen der MHS- und den anderen Gruppen 30 min nach Stimulation erwies sich als signifikant.

Drei Koffeinsonden in der MHN-Neuro-Gruppe, zwei in der MHN- und eine in der Kontrollgruppe förderten keine zur Messung ausreichende Menge an Dialysat.

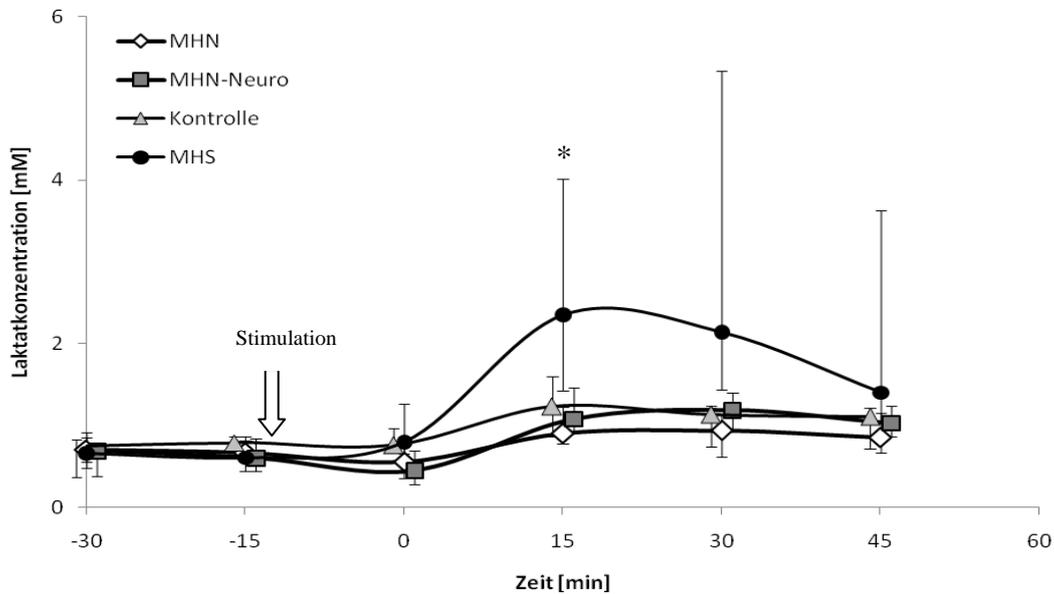


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der intramuskulären Laktatkonzentration beider Koffeinsonden nach Stimulation mit 200 µl Koffein 80 mM, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7, *: p<0,05 für MHS vs. MHN/MHN-Neuro/Kontrollgruppe.

Maximale Laktatwerte nach Stimulation mit Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol%

Die maximalen Laktatwerte sind definiert als die jeweils höchsten gemessenen Laktatwerte nach Halothan- bzw. Koffeininjektion der einzelnen Probanden.

Unter Stimulation mit Halothan 4 Vol% erreichte die MHS-Gruppe ein Maximum von 5,23 [2,4-6,8] mM (Abbildung 15). Für die MHN-Neuro-Gruppe ergab sich ein Wert von 1,25 [0,91-4,67] mM. In der MHN- und Kontrollgruppe waren die Maxima geringer ausgeprägt. Der Maximalwert der MH-negativen betrug 1,02 [0,93-1,5] mM, für die

Kontrollgruppe 1,22 [0,53-1,45] mM. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der MHS-Gruppe und jeder der drei anderen untersuchten Gruppen.

Unter Stimulation mit Koffein 80 mM waren die Maxima weniger stark ausgeprägt. Der Maximalwert in der MHS-Gruppe lag bei 2,56 [1,81-5,33] mM, der der MHN-Neuro-Gruppe bei 1,3 [1,12-1,53] mM. Die Maximalwerte der MHN- und Kontrollgruppe betragen 1,15 [0,82-1,33] mM und 1,38 [0,95-1,6] mM. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen der MHS-Gruppe und jeder der drei anderen untersuchten Gruppen.

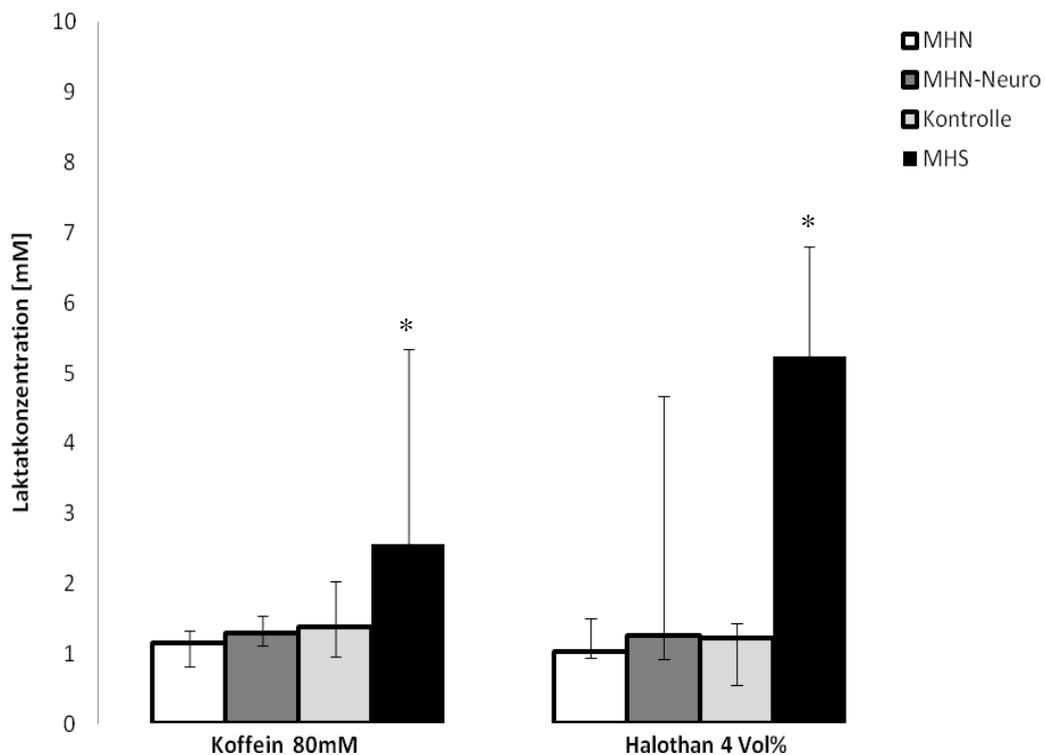


Abbildung 15: Maximale Laktatwerte nach Stimulation mit Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol%, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7, *: p<0,05 MHS vs. MHN/MHN-Neuro/Kontrollgruppe.

Individuelle maximale Laktatwerte

Koffein

In der MHS-Gruppe stieg bei jedem Probanden mindestens ein Maximalwert über 1,8 mM (Tabelle 5). Die höchsten Laktatwerte erreichte ein Proband mit 11,49 mM bzw. 5,79 mM. Sowohl in der MHN- als auch in der MHN-Neuro-Gruppen blieben bis auf drei Ausnahmen die Werte unter 1,8 mM. In der Kontrollgruppe kam es bei einem Probanden zu einem Anstieg auf 3,32 mM und 2,36 mM.

Halothan

In der MHS-Gruppe stieg bei allen Probanden mindestens ein Maximalwert über 3,7 mM (Tabelle 5). Der höchste Wert betrug 12,1 mM. In der MHN-Neuro-Gruppe stiegen bei drei Probanden die Werte auf über 4,3 mM an. Bis auf einen Teilnehmer waren in der MHN-Gruppe alle Maxima unter 2,0 mM. Bei zwei Probanden in der Kontrollgruppe stieg ein Maximalwert auf 4,55 mM bzw. 2,9 mM.

Diagnose (Proband)	Halothan- Sonde 1 [mM]	Halothan- Sonde 2 [mM]	Koffein- Sonde 1 [mM]	Koffein- Sonde 2 [mM]
MHS (229)	2,40	12,10	6,39	4,09
MHS (230)	3,76	*	1,84	1,35
MHS (231)	6,13	4,73	0,85	1,81
MHS (232)	6,66	1,53	2,44	1,87
MHS (233)	1,73	5,23	1,41	2,69
MHS (236)	10,06	1,20	5,75	3,81
MHS (238)	7,08	6,80	5,79	11,49
MHN-Neuro (218)	0,90	1,77	2,48	1,73
MHN-Neuro (222)	4,27	0,33	*	1,19
MHN-Neuro (226)	0,61	1,15	1,44	*
MHN-Neuro (239)	1,20	0,98	0,93	0,99
MHN-Neuro (243)	13,16	7,96	1,62	1,39
MHN-Neuro (227)	0,63	0,70	1,05	*
MHN-Neuro (246)	4,81	5,24	1,14	1,30
MHN (221)	*	1,74	1,55	1,40
MHN (223)	1,10	*	*	*
MHN (241)	1,96	1	2,47	1,87
MHN (228)	0,81	0,99	0,80	0,70
MHN (234)	1,06	1,05	1,21	0,87
MHN (237)	0,72	0,70	1,25	0,67
MHN (244)	1,20	0,68	1,01	1,13
MHN (248)	7,46	8,96	0,76	0,67
MHN (240)	0,96	0,90	0,94	1,13
Kontrolle (216)	0,23	0,28	0,34	*
Kontrolle (217)	0,25	0,61	0,36	0,32
Kontrolle (219)	0,91	1,38	1,54	1,23
Kontrolle (220)	1,43	1,07	0,95	0,98
Kontrolle (235)	0,51	1,41	3,32	2,36
Kontrolle (245)	4,55	1,46	2,08	1,34
Kontrolle (247)	2,90	2,16	1,60	1,11

Tabelle 5: Individuelle maximale Laktatwerte nach Stimulation mit 200 µl Halothan 4 Vol% und 200 µl Koffein 80 mM, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7, *: Dialysatmenge zur Messung nicht ausreichend.

3.2.6 Visuelle Analogskala

Die Intensität des verspürten Schmerzes während der Untersuchung wurde mit Hilfe einer Visuellen Analogskala von 0 (kein Schmerz) bis 10 (maximaler Schmerz) gemessen. Der VAS-Wert wurde beim Einstechen der Kanülen, dem Spritzen der Triggersubstanzen und direkt nach Entfernen der Kanülen erfragt (Abbildung 16). Bei der Triggerapplikation ergaben sich Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Mit einem Wert von 5 [5-3,5] in der MHS-Gruppe unterschied diese sich signifikant von den drei anderen Gruppen, deren Medianwerte zwischen 0,5 bis 1 lagen. Beim Einstechen der Kanülen bzw. direkt nach Entfernung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

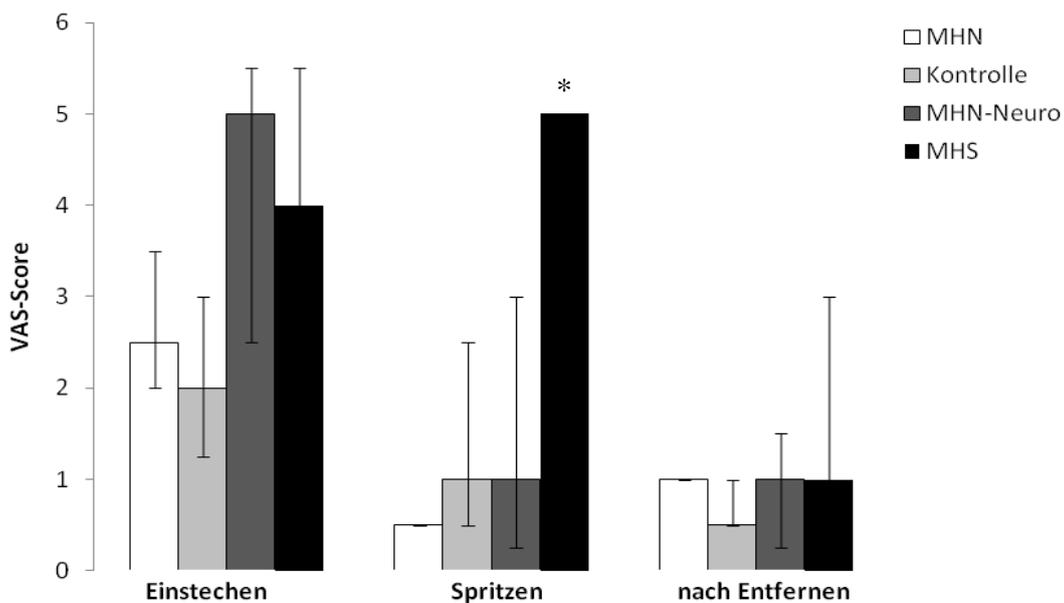


Abbildung 16: VAS-Score (Visuelle Analogskala) beim Einbringen der Messkatheter, nach Triggerapplikation und direkt nach Entfernung der Kanülen, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7, *: $p < 0,05$ MHS vs. MHN/MHN-Neuro/Kontrolle.

3.2.7 Fragebögen

Die Probanden schickten den ausgefüllten Fragebogen ca. drei bis vier Wochen nach der Untersuchung zurück. Zwei Fragebögen aus der MHS- und drei aus der MHN-Gruppe wurden nicht zurückgesandt. Die Patienten konnten anhand einer Skala von 1 (wenig; zufrieden) bis 10 (stark; unzufrieden) verschiedene Aspekte der Untersuchung bewerten (Tabelle 6). Keiner der Probanden fühlte sich am Tag der Untersuchung stark beeinträchtigt. Eine Rötung oder ein Hämatom an der Einstichstelle wurde von allen Gruppen als sehr gering ausgeprägt beschrieben. Der Schmerzcharakter während der Untersuchung wurde in der MHS-Gruppe am häufigsten als krampfartig, in der MHN-Neuro- und Kontroll-Gruppe als stumpf angegeben. Die MHN-Gruppe gab sehr wenig bis keine Schmerzen an. Die Schmerzen nach Triggerapplikation hielten in der MHS-Gruppe am längsten an. Die Einstichstelle war in allen Gruppen nach 3 bis 8 Tagen verheilt. Sowohl die Probanden der MHS- als auch der MHN- und MHN-Neuro-Gruppe würden das Messkatheterverfahren dem IVCT vorziehen.

Fragebogen	MHS	MHN- Neuro	MHN	Kontrolle
Gesamtverlauf	1 [1-1]	1 [1-1]	1 [1-2]	1 [1-3]
Information im Vorfeld	1,5 [1-2]	2 [1-2]	1 [1-1]	1 [1-2]
Betreuung	1 [1-1]	1 [1-1]	1 [1-1]	1 [1-2]
S. Kanüle legen	1,5 [1-2]	2 [2-5]	1 [1-2]	2 [1-2]
S. Lokalanästhesie	3,5 [3-4]	2 [1-3]	1 [1-2]	4 [3-4]
S. Einstechen Messkatheter	3,5 [2-5]	5 [3-5]	1 [1-2]	4 [4-5]
S. Triggerapplikation	3,5 [3-5]	3 [2-4]	1 [1-2]	3 [2-4]
S. Entfernung Messkatheter	2 [1-4]	3 [2-3]	1 [1-2]	2 [2-2]
S. Tag der Untersuchung	2 [2-3]	2 [2-3]	2 [2-3]	3 [2-3]
S. Tag nach Untersuchung	1 [1-1]	2 [2-3]	1 [1-3]	1 [1-2]
Beeinträchtigt.Tag nach Versuch	2 [2-2]	3 [3-5]	2 [1-4]	2 [2-3]
Rötung Einstichstelle	1,5 [1-2]	2 [2-3]	1 [1-2]	2 [2-2]
Bluterguss Einstichstelle	3 [3-4]	4 [3-5]	2 [1-3]	3 [2-3]
Tage durch S. beeinträchtigt	2 [1-3]	4 [2-7]	2 [0-4]	2 [1-3]
Schmerzcharakter	krampfartig	stumpf	kein	stumpf
Dauer S. durch Triggerapplikat.	18 [3-34] min	3 [3-4] min	0 [0-9] min	5 [2-10] min
Einstichstelle verheilt (Tage)	8 [5-10]	3 [3-5]	3 [3-4]	6[4-9]
IVCT/Messkatheter	Messkath.	Messkath.	Messkath.	-

Tabelle 6: Auswertung der Fragebögen, S.: Schmerz, Median und Quartilenspanne, n (Probandenanzahl), MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass [a] die lokale Injektion von Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol% zu einem messbaren Anstieg der intramuskulären Laktatkonzentration führt, [b] eine Unterscheidung zwischen MH-positiven und MH-negativen Probanden möglich ist und [c] keine klinisch relevanten systemischen oder lokalen Nebenwirkungen bei diesem Verfahren auftreten.

[d] Der Einsatz der Mikrodialysesonden MAB 7 mit integriertem Zuspritzkatheter zeigt einen weiteren Schritt hin zur Vereinfachung der Methodik des vorgestellten minimal-invasiven metabolischen Tests. [e] MHN-Probanden mit chronisch erhöhter CK reagieren auf eine Stimulation mit Halothan 4 Vol% teilweise mit einem höheren Anstieg der intramuskulären Laktatkonzentration als MHN-Studienteilnehmer ohne neurologische Anamnese.

4.1 Systemische Nebenwirkungen

Vorangegangene Studien an MH-veranlagten Menschen und Schweinen zeigten keine klinisch relevanten systemischen Nebenwirkungen nach lokaler intramuskulärer Applikation von Halothan und Koffein [43], [44]. Die Vitalparameter wurden während des Versuchs kontinuierlich überwacht. Keiner der Probanden wies Zeichen einer MH-ähnlichen generalisierten Reaktion wie Tachykardie, Blutdruckschwankungen oder Abfall der Sauerstoffsättigung auf. Die zu Beginn und am Ende der Untersuchung durchgeführte BGA war in jeder Gruppe zu beiden Zeitpunkten bezüglich pH-Wert, Kohlenstoffpartialdruck, Basenüberschuss und Laktatwert im physiologischen Bereich. Anhand der Ergebnisse belegt die Studie, dass dieses minimal-invasive Testverfahren keine erhöhte Gefahr darstellt, eine MH-Krise auszulösen. Es handelt sich bei der Applikation der Triggersubstanzen um eine lokale Reaktion, da zum einen nur eine kleine Menge verabreicht wird und zum anderen nach kurzer Zeit ein Verdünnungseffekt durch die interstitielle Flüssigkeit im Gewebe eintritt.

4.2 Lokale Nebenwirkungen

In der vorgestellten Untersuchungsmethode kommt es durch zwei Maßnahmen zu einer lokalen Beeinflussung des Gewebes und damit potentiellen Schädigung der Muskelzellen.

Die Einführung der Kanülen in das Muskelgewebe stellt ein mechanisches Trauma dar. Es konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass bereits 15 Minuten nach Implantation von Mikrodialysesonden im Musculus quadriceps femoris wieder „Steady state“-Bedingungen für die Metabolite Glukose und Laktat erreicht werden [40]. In unserer Studie wurde eine Äquilibrierungsphase von 20 Minuten gewählt. In allen vier Gruppen war der Unterschied zwischen dem ersten und zweiten Messwert vor Stimulation gering, so dass von einer stabilen Ausgangslage für die Messung ausgegangen werden kann.

Die zweite lokale Gewebereaktion entsteht durch die Applikation von Halothan und Koffein. Die Triggersubstanzen interagieren mit den Ryanodinrezeptoren und induzieren eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Dies induziert eine unkontrollierte Aktivierung des Zellstoffwechsels mit der Folge eines Mangels an energiereichen Phosphatverbindungen. Das Membranpotential kann nicht mehr aufrechterhalten werden. Natrium und Wasser strömen in die Zelle. Es kommt schließlich zur Lyse der Zellmembran und damit zur Ausschüttung der intrazellulären Bestandteile. Die Quantifizierung intrazellulärer Bestandteile wie der Muskelenzyme Kreatinin und Myoglobin im Serum ist somit ein objektiver Marker zur Einschätzung der entstandenen Muskelschädigung.

Der Normbereich von Myoglobin im Serum liegt bei Männern zwischen 28-72 $\mu\text{g/l}$, bei Frauen zwischen 25-50 $\mu\text{g/l}$. Das Maximum nach einer Skelettmuskelschädigung wird typischerweise innerhalb 4-8 Stunden erreicht. Der Normbereich der Kreatinkinase befindet sich $< 80 \text{ U/l}$ und erreicht das Maximum erst nach 18-36 Stunden. Aufgrund der längeren Halbwertszeit von 18 Stunden besitzt die Kreatinkinase die größere Aussagekraft über das Gesamtausmaß des Muskelschadens. In der MHS-Gruppe stieg der CK-Wert unmittelbar nach der Untersuchung von 195 U/l auf 513 U/l innerhalb von 24 Stunden. Bei einem Ausgangswert von 1805 U/l betrug der höchste individuelle, direkt nach der Untersuchung gemessene Wert 1869 U/l in der MHS-Gruppe. Bei dieser

Probandin bestanden schon seit frühester Kindheit Zeichen einer Myopathie mit zeitweise mehrmals täglich auftretenden intermittierenden Muskelkrämpfen. Der Anstieg der CK-Werte in der MHS-Gruppe weist auf einen lokal begrenzten Muskelschaden hin. Erst bei einer mehr als fünffachen Erhöhung der Werte kann von einer für den Organismus relevanten Schädigung der quergestreiften Muskulatur ausgegangen werden [45]. Der Grund für den höheren Anstieg der CK in der MHS-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen ist vermutlich die höhere Empfindlichkeit der Muskelzellen gegenüber den Triggersubstanzen. Konzentrationen, die beim MH-gesunden Individuum noch keine Entgleisung der Zellstoffwechsellage hervorrufen, führen beim MH-veranlagten bereits zu einer Steigerung des Metabolismus. Auch die Myoglobinmessung ergab in der MHS-Gruppe einen Anstieg von 58 µg/l nach der Untersuchung auf 80 µg/l innerhalb von 24 Stunden.

Die Schmerzen wurden nur im unmittelbaren Gebiet um die Einstichstellen angegeben. Der Muskel war zu jeder Zeit palpatorisch unauffällig. Diese Aussagen stützen die Ergebnisse früherer Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die hypermetabolische Reaktion lokal auf ein Areal <10 mm um die Messsonden begrenzt ist [46].

Für eine zeitlich kurz andauernde hypermetabole Reaktion im Muskelgewebe spricht das Abfallen der Laktatwerte, nachdem es durch die Applikation der Triggersubstanzen zu einem initialen Anstieg gekommen war. Dieser zeitliche Verlauf spiegelt den Abbau und die systemische Verteilung der Triggersubstanzen wieder.

4.3 Individuelle Ergebnisse

Sowohl die Applikation von Halothan 4 Vol% als auch Koffein 80 mM induzierte in allen vier Gruppen einen Anstieg der intramuskulären Laktatkonzentration. Dabei waren in der MHS-Gruppe die Laktatwerte 30 min nach Stimulation ebenso wie die maximalen Laktatwerte signifikant höher im Vergleich zu den drei anderen Gruppen. Für die Entwicklung eines diagnostischen Testverfahrens müssen jedoch die individuellen Laktatwerte der Probanden betrachtet werden. Um eine sichere diagnostische Differenzierung zwischen MH-positiven und MH-negativen vornehmen zu können, müssen Schwellenkonzentrationen festgelegt werden.

In dieser Studie wurde für die Halothanstimulation ein Laktatschwellenwert von 2,4 mM und für die Koffeinstimulation ein Laktatschwellenwert von 1,8 mM empirisch festgelegt (Abbildung 17 und 18). Ein Patient wurde als MH-positiv eingestuft, wenn einer der vier gemessenen Maximalwerte den Laktatschwellenwert für Koffein oder Halothan überschritt. Dieses Verfahren ist analog zu dem des IVCT. Ein positives Ergebnis von vier durchgeführten Tests (je zwei für Halothan und Koffein) führt im IVCT zur Diagnose einer MH-Suszeptibilität.

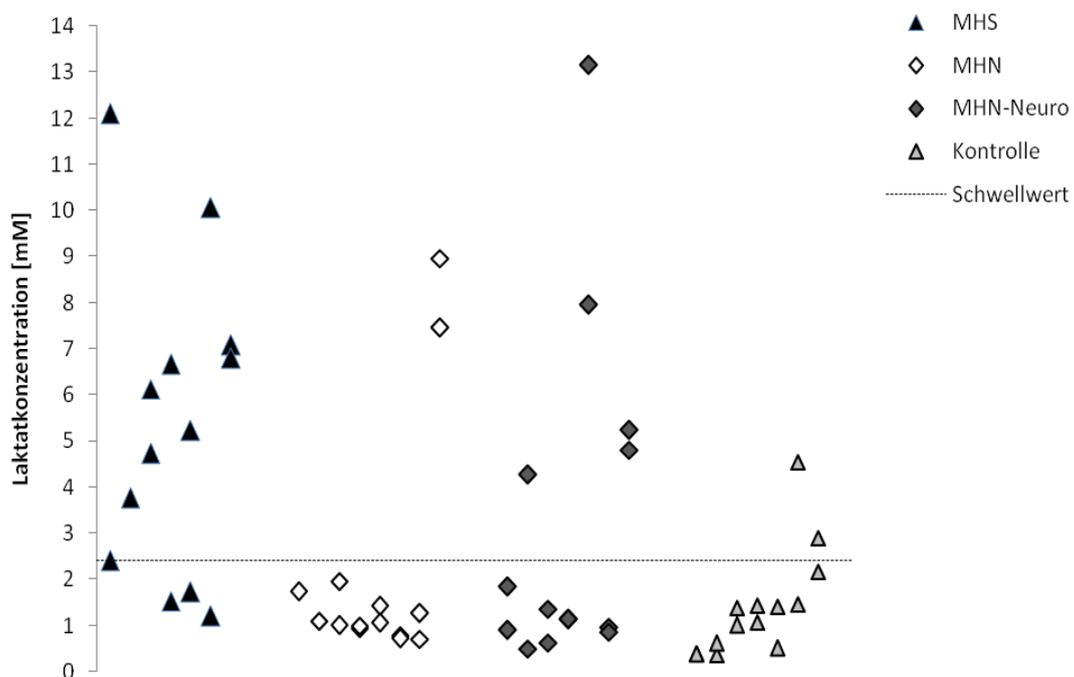


Abbildung 17: Individuelle Laktatwerte nach Stimulation mit Halothan 4 Vol%; empirischer Schwellenwert Halothan: 2,4 mM; MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7.

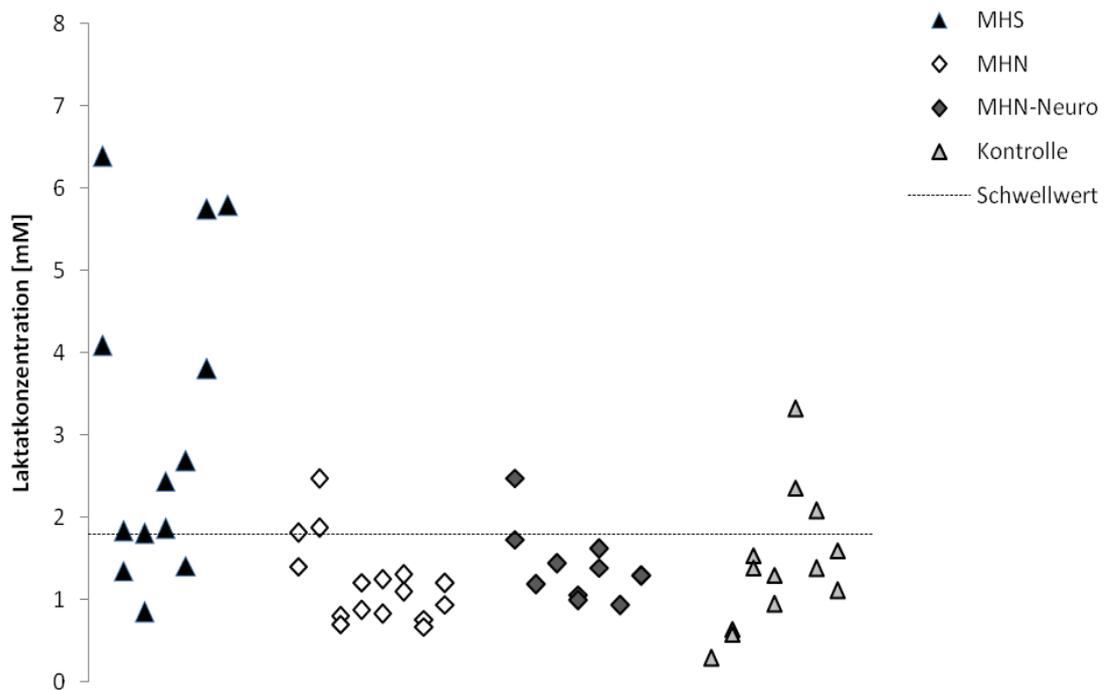


Abbildung 18: Individuelle Laktatwerte nach Stimulation mit Koffein 80 mM; empirischer Schwellenwert Koffein: 1,8 mM; MHS (Maligne Hyperthermie-susceptible): n=7, MHN (Maligne Hyperthermie-non-susceptible): n=9, MHN-Neuro (Maligne Hyperthermie-non-susceptible und neurologische Anamnese): n=7, Kontrolle (Kontrollgruppe): n=7.

In der MHS-Gruppe stieg mindestens ein Laktatwert nach Halothan- bzw. Koffein-stimulation über die empirisch festgelegten diagnostischen Schwellenwerte. In drei Fällen stieg allerdings nur ein Laktatwert sowohl nach Halothan- als auch nach Koffeininjektion über den Schwellenwert (Abbildung 17 und 18). Für diese Ergebnisse gibt es mehrere mögliche Erklärungen. (1) Zum einen induzieren die lokal applizierten Triggersubstanzen nicht bei jedem MH-veranlagten Individuum regelmäßig eine hypermetabole Reaktion, so wie bei manchen veranlagten Patienten auch erst nach wiederholter Exposition mit volatilen Anästhetika eine MH-Krise ausgelöst werden kann [47]. (2) Des Weiteren spielen wahrscheinlich intraindividuelle Unterschiede des Gewebes eine relevante Rolle. Unterschiedliche interstitielle Wasser- und Fettanteile im Muskelgewebe könnten die Konzentration der Triggersubstanzen am Applikationsort beeinflussen. Eine genaue Aussage über die Konzentrationen von Halothan und Koffein am Applikationsort kann nicht getroffen werden. (3) Die Lage der Kanüle direkt an

einer Muskelfaszie wäre denkbar, so dass sich die Triggersubstanzen nicht adäquat im Muskelgewebe verteilen konnten.

Sowohl in der MHN- als auch Kontrollgruppe kam es bei jeweils drei Probanden zu einer Überschreitung der Schwellenwerte und damit zu einer falsch-positiven Klassifizierung (Abbildung 17 und 18). Da die genetische Prävalenz einer MH-Veranlagung bei 1:10.000 liegt, ist die Annahme einer noch nicht diagnostizierten MH-Veranlagung in der Kontrollgruppe eher unwahrscheinlich. Vielmehr lässt sich der Anstieg in der MHN- als auch Kontrollgruppe durch natürlicherweise bestehende inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Reaktivität auf die Triggersubstanzen erklären. Eine klare diagnostische Grenze zwischen MHN- und MHS- Probanden zu ziehen, wird dadurch erschwert. Es ist durchaus nachvollziehbar, dass die gewählten Konzentrationen auch bei einigen MH-negativen zu einer lokalen hypermetabolen Reaktion führen. Vorangegangene Studien mit einer Bolusinjektion von Halothan 10 Vol% haben bei MHN-Individuen einen MH-ähnlichen Anstieg der Laktatkonzentrationen gezeigt [48]. In einer weiteren Studie wurden Untersuchungen mit den gleichen Konzentrationen (Halothan 4 Vol% und Koffein 80 mM) wie in der hier vorliegenden Studie durchgeführt. Auch dort kam es zu einem Anstieg der Laktatkonzentration in der MHN- und Kontrollgruppe, jedoch bei einer geringeren Anzahl von Probanden [49]. Der Unterschied zu dieser Studie bestand in dem Einsatz einer Mikrodialysesonde ohne Zuspritzkatheter. Der Zuspritzkatheter musste manuell in die Kanüle neben der Mikrodialysesonde platziert werden. In der vorliegenden Studie wurden integrierte Zuspritzkatheter verwendet, die unmittelbar an die Dialysemembran angrenzen. Es besteht so die Möglichkeit, dass sich die Mikrodialysemembran des hier verwendeten Sondentyps aufgrund des geringeren Abstands zum Zuspritzkatheter näher am Muskelgewebe befindet, in dem die hypermetabole Reaktion stattfindet. In diesem Fall wäre die Laktatkonzentration unmittelbar um die Membran höher und es würde mehr Laktat ins Dialysat diffundieren.

Entgegen aller vorherigen Studien wurde in dieser Studie das Verhalten von MHN-Probanden mit chronisch erhöhten CK-Werten (>300 U/l) im metabolischen Test untersucht. Die Patienten litten an unspezifischen, nicht einzuordnenden Myopathien mit persistierenden CK-Erhöhungen und Myalgien. Auch in dieser Gruppe wurden drei

Teilnehmer gemäß den empirisch gesetzten Schwellenwerten positiv getestet (Abbildung 17 und 18). Die oben angestellten Überlegungen bezüglich des Laktatanstiegs in der MHN- und Kontroll-gruppe trotz negativer Testung im IVCT sind hier genauso anzuführen. Auffällig ist jedoch, dass der massive Anstieg der Laktatkonzentration nach Halothanstimulation dem der MHS-Probanden gleicht. Betrachtet man die variable klinische Reaktion von Patienten mit Myopathien unter Exposition mit volatilen Anästhetika ist dies nicht verwunderlich. Es wird von komplikationslosen Verläufen bis hin zu MH-ähnlichen Zustandsbildern berichtet [50], [51]. So könnte der sensitivere Muskel-stoffwechsel der MHN-Probanden mit bestehenden Myopathien den Anstieg der Laktatkonzentrationen im metabolischen Test möglicherweise erklären.

4.4 Spezifität und Sensitivität

Die Spezifität und Sensitivität spiegeln die Qualität eines Testverfahrens wider. Um eine Erkrankung sicher und verlässlich diagnostizieren zu können, ist die Sensitivität der Untersuchungsmethode entscheidend. Die Schwellenwerte wurden so gewählt, dass eine möglichst hohe Sensitivität erreicht wurde, auch wenn sich dabei die Spezifität verringerte. In die Berechnung wurden die im Vorfeld anhand des IVCT diagnostizierten 16 MHN- und 7 MHS-Probanden eingeschlossen. Es ergab sich eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 73% bezogen auf den IVCT. Positive und negative Vorhersagewerte konnten aufgrund der nicht genau bekannten Prävalenz der Erkrankung nicht bestimmt werden. Diese Werte sind angesichts der geringen Probandenzahl von 23 zurückhaltend zu interpretieren.

4.5 Akzeptanz

Ziel der Untersuchung ist es, für die Patienten ein weniger belastendes Verfahren zu entwickeln. Zur genauen Evaluierung dieser Aspekte hatten die Probanden einen Fragebogen (Tabelle 6) erhalten, den sie ca. vier Wochen nach der Untersuchung vollständig beantworten und zurückschicken sollten. Schmerzen, Beeinträchtigung

während des Tests und Wundheilung stellen aus Sicht der Patienten die wichtigsten Punkte dar.

Die vier Gruppen gaben für die empfundenen Schmerzen nach Triggerapplikation VAS-Werte zwischen 1 und 3,5 an. Mit einem VAS-Wert von 3,5 empfand die MHS-Gruppe die Schmerzen am stärksten. Sie wurden von den meisten MHS-Probanden als krampfartig beschrieben und hielten mit 18 Minuten am längsten an im Vergleich zu den anderen Gruppen. Insgesamt fühlte sich keiner der Probanden durch die Untersuchung stark beeinträchtigt. Die Wundheilung verlief bei allen Teilnehmern komplikationslos. Nach 3 bis 8 Tagen waren die Einstichstellen verheilt. Alle Teilnehmer würden den minimal-invasiven Test der Muskelbiopsie vorziehen. Es kann festgehalten werden, dass die neue Untersuchungsmethode von den Probanden als gut verträglich und insgesamt weniger belastend empfunden wird als der IVCT. Diese Ergebnisse werden bestätigt, wenn man eine Befragung von Patienten nach erfolgtem IVCT betrachtet. Die Patienten gaben nach der Muskelbiopsie einen anhaltenden Wundschmerz von 6,7 Tagen an, sowie eine motorische Beeinträchtigung von 10,3 Tagen. Die durchschnittliche Arbeitsunfähigkeit betrug 9,5 Tage [52]. Es ergeben sich somit erhebliche Unterschiede zwischen dem IVCT und dem minimal-invasiven Test sowohl in der subjektiven Empfindung der Patienten als auch aus ökonomischen Gesichtspunkten. Die während der Untersuchung entstehenden Kosten sind deutlich geringer ebenso wie die wirtschaftlichen Ausfälle durch die entstehende Arbeitsunfähigkeit.

4.6 Bewertung der MAB 7 Mikrodialyse sonde

Die Menge der im Dialysat enthaltenen Substanz ist abhängig von der interstitiellen Konzentration im Gewebe sowie der Größe und Ladung des zu sammelnden Moleküls. Die Perfusionsgeschwindigkeit sowie die Zusammensetzung der Perfusionslösung spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Entscheidend für die Diffusion sind die Fläche, Porengröße und das Material der gewählten Mikrodialysemembran. Dementsprechend ist je nach Eigenschaften der zu sammelnden Substanz die Wahl der passenden Mikrodialyse sonde ausschlaggebend für die Etablierung eines Mikrodialyseverfahrens ausschlaggebend. In vorherigen Studien wurden zur Messung der intramuskulären Laktatkonzentrationen Sonden mit einer 10 mm langen Mikrodialysemembran genutzt,

welche aus Polyamid oder Polyethersulfon bestand. Die Porengröße betrug 15 000 Dalton. Diese Membraneigenschaften zeigten sich sehr geeignet für die Messung von Laktatkonzentrationsveränderungen im Gewebe [53]. Analog zu den vorangegangenen Studien wurde in dieser Untersuchung eine Mikrodialysemembran aus Polyethersulfon verwendet mit einer Porengröße von 15 000 Dalton, einem Membranaussendurchmesser von 0,6 mm und einer Membranlänge von 10 mm.

Die Diffusionseigenschaften und damit die Qualität der Membran wurden durch Ermittlung der relativen Recovery in-vitro von Laktat für verschiedene Flussgeschwindigkeiten bestimmt. Für die Flussraten 0,5; 1 und 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ entsprachen die Ergebnisse den Recovery-Werten aus vorherigen Studien. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ betrug die relative Recovery 78 [74-79] %. In vorangegangenen Studien wurden unter Gebrauch der CMA/20 Mikrodialysetsonde Werte zwischen 70% und 80% angegeben [54]. Für die höheren Flussgeschwindigkeiten von 5 und 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ lagen die ermittelten Recovery-Werte vergleichsweise niedriger (Abbildung 19).

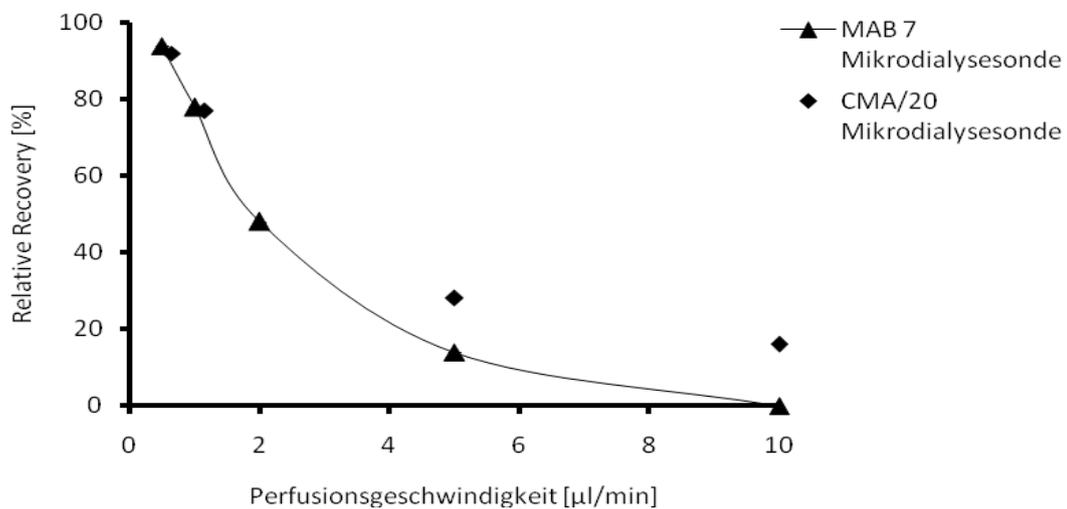


Abbildung 19: Relative Recovery in-vitro MAB 7 Mikrodialysetsonde n (Anzahl der Sonden) = 7, relative Recovery in-vitro CMA/20 Mikrodialysetsonde n=3 [54].

Entscheidend für die Beurteilung der Mikrodialysesonde ist, dass die gemessenen Recovery-Werte für die im Versuch verwendete Flussgeschwindigkeit von 1 µl/min den Angaben der gegenwärtigen Literatur entsprechen.

Erstmalig in dieser Studie war ein Zuspritzkatheter in der Mikrodialysesonde integriert. In früheren Studien musste neben die Mikrodialysesonde zusätzlich ein Zuspritzkatheter in die Kanüle eingeführt werden. Die Verwendung der MAB 7 Mikrodialysesonde stellt einen weiteren Schritt zur Standardisierung des Verfahrens dar und führt damit zu einer Reduktion potentieller Messartefakte. So schließt die sichere korrekte Ausrichtung des integrierten Zuspritzkatheters zur Mikrodialysemembran eine früher möglicherweise entstandene Fehllage der Dialysemembran zu dem mit Triggersubstanzen versetzten Muskelgewebe aus.

In Einzelfällen kam es in der MHN- und Kontrollgruppe zu einem Anstieg der Laktatkonzentration über die gesetzten Schwellwerte. Jede ausgelöste Stoffwechselsteigerung ist abhängig von der Art und Menge der Triggerapplikation sowie der Konzentration. Weiterführende Versuchsprotokolle mit variierenden Triggerkonzentrationen, Mengen und Applikationsintervallen könnten entscheidende Erkenntnisse zur besseren Differenzierung zwischen MH-positiven und MH-negativen Probanden bringen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter Anwendung der MAB 7 Mikrodialysesonde mit integriertem Zuspritzkatheter eine Unterscheidung zwischen MHS- und MHN- Probanden möglich ist und somit eine weitere Standardisierung der Methodik bzw. Reduktion potentieller Messfehler erreicht werden konnte.

4.7 Bewertung des Verfahrens

In der Studie wird ein Verfahren zur Diagnostik der MH vorgestellt, welches gegenüber dem IVCT entscheidende Vorteile aufweist. Diese liegen in seiner minimalen Invasivität, den geringeren Kosten sowie der flexibler einsetzbaren Methodik. Die vorliegende Studie hat wie vorangegangene Untersuchungen gezeigt, dass mit diesem Verfahren eine Unterscheidung zwischen MHN- und MHS-Probanden möglich ist. Um valide Aussagen über Sensitivität und Spezifität des Testverfahrens treffen zu können, müssen größere Fallzahlen im Rahmen einer Multizenterstudie untersucht werden. Weitere methodische Untersuchungen zur eindeutigen Unterscheidung zwischen MHS und

MHN wie auch zur weiteren Vereinfachung des Verfahrens sind nötig, bevor der metabolische Test zur klinischen MH-Diagnostik eingesetzt werden kann.

In dem vorgestellten Testverfahren kam es bei einigen Patienten in der MHN-Neuro-Gruppe zu einem Anstieg der Laktatkonzentration nach Halothanstimulation ähnlich dem der MHS-Gruppe trotz negativer Testung im IVCT. Der metabolische Test stellt als in-vivo Verfahren eine sensitive Methode dar, um Einblick in die Muskelzellreaktion pathologischer Muskelgewebe zu bekommen. Der massive Anstieg der Laktatkonzentration nach Halothanstimulation, trotz negativer Testung im IVCT, verdeutlicht die hohe Sensitivität des Muskelstoffwechsels in Patienten mit Myopathien und bestätigt die aktuellen Richtlinien, volatile Anästhetika bei bekannter oder vermuteter Myopathie zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Die Maligne Hyperthermie ist eine latente metabolische Myopathie, die durch Exposition mit volatilen Anästhetika oder depolarisierenden Muskelrelaxantien in disponierten Individuen zu einem potentiell lebensbedrohlichen hypermetabolen Syndrom der Skelettmuskulatur führen kann. Dieser Zustand basiert auf einer unkontrollierten sarkoplasmatischen Kalziumfreisetzung über funktionell veränderte Ryanodinrezeptoren. Die klinische Symptomatik umfasst einen Anstieg des Kohlendioxidpartialdrucks und der Körperkerntemperatur sowie eine Tachykardie, Laktatazidose und Muskelspasmen.

Zur Diagnostik einer MH-Veranlagung stellt der In-Vitro-Kontrakturtest bis heute das einzige verlässliche klinische Verfahren dar. Der in dieser Studie untersuchte metabolische Test bietet aufgrund seiner minimalen Invasivität und seinem geringeren zeitlichen bzw. kostenintensiven Aufwand relevante Vorteile gegenüber dem In-Vitro-Kontrakturtest.

In dieser Studie wurde untersucht, ob unter Einsatz der MAB 7 Mikrodialysetsonden mit integriertem Zuspritzkatheter der intramuskuläre Laktat Spiegel durch lokale Applikation von Halothan 4 Vol% und Koffein 80 mM gesteigert werden kann und somit eine Differenzierung zwischen MHS- und MHN-Individuen möglich ist.

Mit Genehmigung der örtlichen Ethikkommission wurden bei 7 MHS-, 9 MHN-, 7 MHN-Neuro- und 7 Kontrollprobanden je vier Mikrodialysetsonden im Musculus vastus lateralis platziert. Nach 20-minütiger Äquilibrationszeit wurden über je 2 Sonden 200 µl Koffein 80 mM bzw. 200 µl Halothan gelöst in Sojabohnenöl mit einer Flussgeschwindigkeit von 70 µl/min injiziert und die Laktatkonzentration im Dialysat spektrophotometrisch gemessen. Sowohl nach Stimulation mit Halothan 4 Vol% als auch Koffein 80 mM kam es in der MHS-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Laktatkonzentrationen im Vergleich zu allen drei anderen Probandengruppen. Ebenso waren die erreichten Maximalwerte der MHS-Probanden signifikant höher verglichen mit denen der MHN-, MHN-Neuro- und Kontrollgruppen. Als Zeichen der stärker abgelaufenen Stoffwechselreaktion waren die Kreatinkinase und die VAS-Werte nach Triggerapplikation in der MHS-Gruppe signifikant erhöht. Systemische hämo-

dynamische und metabolische Parameter blieben bei allen vier Probandengruppen im Normbereich.

Wie schon in vorangegangenen Studien gezeigt, belegt diese Studie, dass die intramuskuläre Stimulation mit MH-Triggersubstanzen zu einer Aktivierung der lokalen Stoffwechselfvorgänge führt mit einem signifikanten Laktatanstieg in MH-disponierten Individuen. Die gewählten Triggerkonzentrationen von Halothan 4 Vol% und Koffein 80 mM ermöglichten eine Unterscheidung zwischen MHS- und MHN-Probanden. Es kam jedoch bei drei nicht MH-veranlagten Probanden zu einem falsch-positiven Ergebnis.

Die erstmalig eingesetzten MAB 7 Mikrodialysesonden mit integriertem Zuspritzkatheter zeigten konstante relative Recovery-Werte unter den jeweiligen Flussgeschwindigkeiten. Die Einführung dieser Sonden stellt einen weiteren Schritt zur Vereinfachung und Standardisierung des Verfahrens dar.

Durch weitere methodische Untersuchungen mit variierenden Parametern wie Triggerkonzentration, Menge und Applikationsintervall scheint es möglich, noch eindeutigere Grenzen zur sicheren Unterscheidung zwischen MHS und MHN ziehen zu können.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des minimal-invasiven Testverfahrens eine für die Zukunft vielversprechende klinische Grundlage zur Diagnostik einer MH-Veranlagung darstellt.

6 Literaturverzeichnis

1. Gronert G.A., Antognini J.F., Pessah I.N.: *Malignant hyperthermia*. In: Miller RD (Ed) *Anesthesia* Philadelphia 2000: 1033-1052.
2. Guedel A.F.: *Inhalation Anesthesia. A fundamental guide*. New York: Mac Millan 1937; 7th edition: 133-134.
3. Denborough M.A., Lovell R.R.H.: *Anaesthetic deaths in a family*. *Lancet* 1960; 2: 45.
4. McCarthy T.V., Healy J.M., Heffron J.J.: *Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2*. *Nature* 1990; 343: 562-564.
5. Kalow W., Britt B.A., Terreau M.E., Haist C.: *Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia*. *Lancet* 1970; 2: 895-898.
6. Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin: *Empfehlung zur Therapie der malignen Hyperthermie*. *Anästh Intensivmed* 2008; 49: 483-488.
7. Hartung E., Anetseder M., Olthoff D., Deutrich C., Lehmann-Horn F., Baur C., Mortier W., Tzanova I., Doetsch S., Quasthoff S., Hoffmann M., Schwefler B., Jantzen J.P., Wappler F., Scholz J.: *Regional distribution of predisposition to malignant hyperthermia in Germany: data in 1997*. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1998; 33: 238-243.
8. Silbernagel S.: *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme. 2003; 6: 52-54.
9. Löffler G.: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag. 2003; 6: 267-273;102-108.
10. Uttenweiler D., Both M., Zink W., Sinner B., Martin E., Graf B.M., Fink R.H.: *Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit mathematischer Modellierung*. *Anaesthesist* 2003; 52: 162-168.
11. Robinson R., Carpenter D., Shaw M.A., Halsall J., Hopkins P.: *Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease*. *Hum Mut* 2006; 27: 977-989.
12. Fill M., Coronado R., Mickelson J.R., Vilven J., Ma J.J., Jacobson B.A., Louis C.F.: *Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia*. *Biophys J* 1990; 57: 471-475.

13. Yang T., Esteve E., Pessah N., Molinski T.F., Allen P.D., Lopez J.R.: *Elevated resting [Ca²⁺] in myotubes expressing malignant hyperthermia RyR1 cDNAs is partially restored by modulation of passive calcium leak from the SR.* Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292: 1591-1598.
14. Monnier N., Proaccio V., Stieglitz P., Lunardi J.: *Malignant hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle.* Am J Hum Genet 1997; 60: 1316-1325.
15. Iles D.E., Lehmann-Horn F., Scherer S.W., Tsui L.C., Olde Weghuis D., et al.: *Localization of the gene encoding the alpha2/delta-subunits of the L-type voltage-dependent calcium channel to chromosom 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families.* Hum Mol Genet 1994; 3 : 969-975.
16. Anetseder M., Müller C.R.: *Maligne Hyperthermie.* Intensivmed 2003; 40: 324-335.
17. Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin: *Empfehlung zur Therapie der malignen Hyperthermie.* 5. Auflage 2011: 110-111.
18. Wappler F., Scholz J., von Richthofen V., Fliege M., Köchling A., Matschke J., Winkler G., Schulte am Esch J.: *Incidence of disposition for malignant hyperthermia in patients with neuromuscular diseases.* Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1998; 33: 373-380.
19. Balog E.M., Enzmann N., Gallant E.M.: *Malignant hyperthermia: fatigue characteristics of skeletal muscle.* Muscle Nerve 2000; 23: 223-230.
20. Curran J.L., Hall W.J., Halsall P.J., Hopkins P.M., Iles D.E., Markham A., F., McCall S.H., Robinson R.L., West S.P., Bridges L.R., Ellis F.R.: *Segregation of malignant hyperthermia, central core disease and chromosome 19 markers.* Br J Anaesth 1999; 83: 217-222.
21. Heiman-Patterson T., Rosenberg H., Binning C.P., Tahmoush A.J., : *King-Denborough syndrome: Contracture testing and literature review.* Pediatr Neurol 1986; 2: 175-177.
22. D'Arcy C.E., Bjorksten A., Yiu E.M., Bankier A., Gillies R., McLean C.A., Shield L.K., Ryan M.M.: *King-denborough syndrome caused by a novel mutation in the ryanodine receptor gene.* Neurology 2008; 10: 776-777.
23. Barone V., Massa O., Intravaia E., Bracco A., Di Martino A., Teggazin V., Cozzolino S., Sorrentino V.: *Mutation screening of the RYR1 gene and identification of two novel mutations in Italian malignant hyperthermia families.* J Med Genet 1999; 36: 115-118.

24. Quane K.A., Healy J., Keating K.E., Manning B.M., Couch F.J., Palmucci L.M., Doriguzzi C., Fagerlund T.H., Berg K., Ording H., et al.: *Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia*. Nat Genet 1993; 5: 51-55.
25. Vita G.M., Olckers A., Jedlicka A.E., George A.L., Heiman-Patterson T., Rosenberg H., Flechter J.E., Levitt R.C.: *Masseter muscle rigidity associated with glycine 1306-to-alanine mutation in the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene*. Anesthesiology 1995; 82:1097-1103.
26. Heiman-Patterson T., Martino C., Rosenberg H., Flechter J., Tahmouh A.: *Malignant hyperthermia in myotonia congenita*. Neurology 1988;5: 810-812.
27. Koch B.M., Bertorini T., Eng G.D., Boehm R.: *Severe multicore disease associated with reaction to anesthesia*. Arch Neurol 1985; 42: 1204-1206.
28. Gurnaney H., Brown A., Litman R.S.: *Malignant hyperthermia and muscular dystrophies*. Anaesth Analg 2009; 4: 1043-1048.
29. The European Malignant Hyperthermia Group: *A protocol for the investigation of malignant hyperthermia (MH) susceptibility*. Br J Anaesth 1984; 56: 1267-1269.
30. Larach M.G., *For the North American Malignant Hyperthermia Group: Standardization of the Caffeine Halothane Muscle Contracture Test*. Analg 1989; 69: 511-515.
31. 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.
32. Urwyler A., Deufel T., McCarthy, West S., European Malignant Hyperthermia Group: *Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia*. Br J Anaesth 2001; 86: 283-287.
33. Kozack J.K., MacIntyre D.L.: *Malignant Hyperthermia*. Phys Ther 2001; 81: 945-951.
34. Schuster F., Hager M., Metterlein T., Muellenbach R.M., Wurmb T, Wunder C., Roewer N., Anetseder M.: *In-vivo-Diagnostik einer malignen Hyperthermie-Disposition*. Anaesthesist 2008; 57: 767-774.
35. Sawynok J.: *Pharmacological rationale for the use of caffeine*. Drugs 1995; 49: 37-50.

36. Su J.Y., Kerrick W.G.: *Effects of halothane on Ca²⁺ activated tension development in mechanically disrupted myocardial fibres.* Pflügers Arch 1978;375:111-117.
37. Kunst G., Graf B., Schreiner R., Martin E., Fink R.H.: *Differential effects of sevoflurane, isoflurane and halothane on Ca²⁺-release from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.* Anesthesiology 1999; 91:179-186.
38. Blanck T.J., Peterson C., Baroody B., Tegazzin V., Lou J.: *Halothane, enflurane and isoflurane stimulate calcium leakage from rabbit sarcoplasmic reticulum.* Anesthesiology 1992; 76:813-821.
39. Korth U., Klein J.: *Methodik und Anwendung der Mikrodialyse.* Anästh Intensivmed 2001; 42: 732-739.
40. Korth U., Merkel G., Fernandez F.F., Janewerth 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.
41. de Lange E.C., Danhof M., de Boer A.G., Breimer D.D.: *Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain.* Brain Res 1994; 12: 666(1): 1-8.
42. Schuster F., Metterlein T., Negele S., Kranke P., Muellenbach R.M., Schwemmer U., Roewer N., Anetseder M.: *An in-vivo metabolic test for detecting malignant hyperthermia susceptibility in humans: a pilot study.* Anesth Analg 2008; 3: 909-914.
43. Anetseder M., Hager M., Muller C.R., Roewer N.: *Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test.* Lancet 2002; 359:1579-1580.
44. Anetseder M., Sachs M., Hoyer A., Hartung E., Roewer N.: *Local intramuscular application of halothane in MH-susceptible pigs without systemic effects.* Anesthesiology 2000; 93: 209.
45. Gabow P.A., Kaehny W., Kelleher S.P.: *The spectrum of rhabdomyolysis.* Medicine 1982; 61: 141-152.
46. Schuster F., Schöll M., Hager M., Mueller R., Roewer N., Anetseder M.: *Dose-response relationship and regional distribution of lactate following intramuscular injection of halothane and caffeine in malignant hyperthermia susceptible pigs.* Anesth Analg 2006; 102: 468-472.
47. Adam H., Gottschaldt U., Pausch N.C., Ruffert H., Sipli K.M.: *Fulminant MH crisis during the ninth general anaesthesia.* Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2007; 42: 692-699.

48. Schuster F., Anetseder M., Metterlein T., Mueller R., Roewer N.: *Direct intramuscular injection of halothane induces hypermetabolism in MH non-susceptible and control volunteers*. *Anesthesiology* 2005; 103: A-1121.
49. Negele S.: *Koffein, Halothan und Sevofluran als Triggersubstanzen in einem minimal-invasiven Test zur Maligne-Hyperthermie-Diagnostik*. Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2008:44-46.
50. Baur C.P., Schlecht R., Jurkat-Rott K., Georgieff M., Lehmann-Horn F.: *Anästhesie bei neuromuskulären Erkrankungen, Teil 1: Einführung*. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002; 37: 77-79.
51. Baur C.P., Schara U., Schlecht R., Georgieff M., Lehmann-Horn F.: *Anästhesie bei neuromuskulären Erkrankungen, Teil 2: spezielle Krankheitsbilder*. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002; 37: 126.
52. Mueller R., Anetseder M., Hoyer A., Hartung E., Roewer N.: *Outcome evaluation of patients after muscle biopsy for malignant hyperthermia testing*. *Anesthesiology* 2000;93.
53. Metterlein T.: *Methodische Untersuchungen zur Entwicklung eines minimal-invasiven Tests für die Diagnostik zur Malignen Hyperthermie*. Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2006:21.
54. Schuster F.: *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*. Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2002:20.

7 Anhang

Tag der U.	Geschlecht	Proband	Diagnose	Alter [Jahre]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m ²]
13.11.2007	m	221	MHN	17	181	80	24
13.08.2007	w	223	MHN	27	176	75	24
21.10.2008	m	241	MHN	44	182	84	25
03.06.2008	m	228	MHN	68	167	55	19
05.08.2008	w	234	MHN	40	175	64	21
16.09.2008	m	237	MHN	44	178	81	26
13.01.2009	w	244	MHN	41	176	85	27
10.02.2009	m	248	MHN	44	187	110	31
14.10.2008	m	240	MHN	48	168	82	29
18.09.2007	m	218	MHN Neuro	38	176	75	24
04.12.2007	m	222	MHN Neuro	50	180	107	33
15.04.2008	m	226	MHN Neuro	48	190	133	34
07.10.2008	w	239	MHN Neuro	48	167	89	32
16.12.2008	w	243	MHN Neuro	43	172	60	20
06.05.2008	m	227	MHN Neuro	29	108	105	32
27.01.2009	w	246	MHN Neuro	54	165	66	24
12.08.2007	w	216	Control	20	170	56	19
02.09.2007	w	217	Control	23	166	61	22
31.10.2007	m	219	Control	25	179	74	21
06.11.2007	w	220	Control	23	165	58	21
12.08.2008	m	235	Control	23	186	74	21
16.01.2008	m	245	Control	29	194	81	21
03.02.2009	w	247	Control	24	172	64	21
10.06.2008	m	229	MHS	25	183	78	23
17.06.2008	m	230	MHS	54	181	83	25
29.06.2008	m	231	MHS	29	195	88	23
02.07.2008	w	232	MHS	28	169	64	22
29.07.2008	m	233	MHS	35	186	91	26
19.08.2008	m	236	MHS	46	182	90	27
23.09.2008	w	238	MHS	36	169	69	24

Tabelle 1: Biometrische Daten (U.: Untersuchung, m: männlich, w: weiblich).

Proband	Diagnose	pH	Base Excess [mmol/l]	pCO ₂ [mmHg]	Laktat [mmol/l]
221	MHN	*	*	*	*
223	MHN	7,38	0,8	40,4	1,1
241	MHN	7,38	0,4	41,9	1,0
228	MHN	7,38	2,3	46,0	1,1
234	MHN	7,25	-10,6	35,5	0,7
237	MHN	7,38	1,2	43,9	0,7
244	MHN	7,36	1,8	47,6	1,4
248	MHN	7,37	2,6	47,5	1,3
240	MHN	7,34	-0,4	46,4	0,8
218	MHN Neuro	7,42	1,4	39,2	1,8
222	MHN Neuro	7,38	1,3	44,2	1,2
226	MHN Neuro	7,40	-0,9	37,8	1,2
239	MHN Neuro	7,40	2,1	43,3	1,3
243	MHN Neuro	7,40	5,8	50,3	1,0
227	MHN Neuro	7,39	0,4	40,8	1,6
246	MHN Neuro	*	*	*	*
216	Control	7,39	4,0	48,4	1,5
217	Control	7,31	1,2	54,4	0,9
219	Control	7,36	4,4	52,8	1,7
220	Control	7,44	0,2	35,3	1,3
235	Control	7,43	2,3	39,6	1,3
245	Control	7,38	4,8	50,6	1,3
247	Control	7,38	1,6	45,0	1,2
229	MHS	7,40	3,6	46,3	0,9
230	MHS	7,40	-1,6	36,2	0,7
231	MHS	*	*	*	*
232	MHS	7,35	-4,0	37,4	1,2
233	MHS	7,37	1,1	45,0	1,4
236	MHS	7,41	1,9	41,1	0,7
238	MHS	7,40	0,1	39,4	0,7

Tabelle 2: Venöse Blutgasanalyse vor der Untersuchung, *: Messartefakt.

Proband	Diagnose	pH	Base Excess [mmol/l]	pCO ₂ [mmHg]	Laktat [mmol/l]
221	MHN	7,39	3,5	46,4	1,4
223	MHN	7,35	0,8	42,9	0,8
241	MHN	7,40	-2,2	35,7	0,9
228	MHN	7,42	-2,5	32,5	1,9
234	MHN	7,39	0,9	41,8	0,6
237	MHN	7,38	-1,0	40,5	0,7
244	MHN	7,39	0,7	42,0	0,5
248	MHN	7,39	3,3	46,2	0,8
240	MHN	7,37	-0,2	43,1	0,8
218	MHN Neuro	7,40	3,5	46,1	1,0
222	MHN Neuro	7,40	-0,2	38,8	1,2
226	MHN Neuro	7,45	-2,7	29,6	1,3
239	MHN Neuro	7,42	1,3	39,6	1,1
243	MHN Neuro	7,41	4,5	45,5	1,1
227	MHN Neuro	7,38	-15,1	15,8	1,6
246	MHN Neuro	7,43	2,3	40,1	0,8
216	Control	7,40	4,0	47,0	0,8
217	Control	7,38	0,4	42,6	0,7
219	Control	7,37	1,1	45,6	1,6
220	Control	7,42	-0,9	35,5	1,7
235	Control	7,40	1,4	42,0	1,4
245	Control	7,41	3,9	44,3	0,8
247	Control	7,42	3,2	42,4	1,3
229	MHS	7,38	3,3	47,8	1,5
230	MHS	7,43	-0,1	36,0	0,7
231	MHS	7,39	5,7	50,1	1,1
232	MHS	7,36	3,0	49,5	1,2
233	MHS	7,41	0,3	39,0	1,5
236	MHS	7,41	0,6	40,8	0,6
238	MHS	7,41	-0,8	37,3	0,5

Tabelle 3: Venöse Blutgasanalyse unmittelbar nach der Untersuchung.

Proband	Diagnose	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min
221	MHN	100	98	96	100	98	100	98	98
223	MHN	76	72	70	72	76	78	74	72
241	MHN	68	70	68	68	70	68	70	66
228	MHN	76	78	70	66	68	70	70	68
234	MHN	80	82	83	78	78	76	78	76
237	MHN	52	54	58	58	60	62	58	56
244	MHN	60	58	60	62	60	56	56	56
248	MHN	70	72	74	76	74	72	72	74
240	MHN	80	80	82	80	80	82	82	80
218	MHN Neuro	65	66	70	68	70	68	66	66
222	MHN Neuro	58	60	60	60	78	78	80	80
226	MHN Neuro	78	78	80	76	74	72	72	72
239	MHN Neuro	78	78	80	78	76	76	76	76
243	MHN Neuro	60	58	60	62	64	62	60	60
227	MHN Neuro	66	68	66	64	66	68	66	64
246	MHN Neuro	84	84	76	74	72	70	70	70
216	Control	65	63	54	48	61	62	62	62
217	Control	62	70	72	71	74	73	72	74
219	Control	96	88	82	84	90	92	90	92
220	Control	78	76	78	76	76	78	78	78
235	Control	98	90	88	86	86	90	92	90
245	Control	60	62	60	60	62	60	60	62
247	Control	54	54	54	54	52	60	60	58
229	MHS	52	50	54	52	50	52	54	54
230	MHS	62	62	64	66	62	66	64	62
231	MHS	70	72	72	70	72	70	74	72
232	MHS	70	68	70	72	70	68	66	70
233	MHS	60	60	62	60	62	64	64	62
236	MHS	56	58	66	68	70	72	72	74
238	MHS	62	60	62	64	62	62	64	62

Tabelle 4: Herzfrequenz [min⁻¹] während der Untersuchung.

Proband	Diagnose	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min
221	MHN	81	88	87	83	83	78	90	95
223	MHN	72	70	73	75	72	76	72	72
241	MHN	91	92	94	93	93	90	90	93
228	MHN	80	80	82	88	86	84	78	80
234	MHN	90	88	88	86	80	80	79	90
237	MHN	90	92	90	89	94	92	89	88
244	MHN	66	71	70	70	68	70	68	70
248	MHN	89	92	99	95	93	93	94	93
240	MHN	120	116	121	118	126	123	116	116
218	MHN Neuro	70	70	77	72	76	75	77	76
222	MHN Neuro	105	104	103	122	138	135	131	130
226	MHN Neuro	92	89	91	90	94	88	87	90
239	MHN Neuro	86	85	85	87	86	86	89	91
243	MHN Neuro	82	80	80	78	80	80	83	80
227	MHN Neuro	78	78	78	92	88	92	78	72
246	MHN Neuro	107	105	100	103	100	107	105	105
216	Control	68	72	72	70	74	72	72	72
217	Control	69	76	74	70	72	76	75	74
219	Control	78	80	81	82	81	82	83	81
220	Control	70	75	73	75	78	72	71	75
235	Control	88	86	95	87	81	85	84	83
245	Control	80	85	80	86	90	88	91	80
247	Control	68	70	70	74	66	69	66	68
229	MHS	82	84	88	82	82	80	81	88
230	MHS	96	96	97	96	98	90	94	92
231	MHS	92	79	74	85	84	86	86	85
232	MHS	80	79	79	81	80	82	80	80
233	MHS	78	78	76	77	86	85	88	88
236	MHS	88	90	78	84	80	85	85	88
238	MHS	79	82	82	84	83	80	83	80

Tabelle 5: Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg] während der Untersuchung.

Proband	Diagnose	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min
221	MHN	100	100	100	100	100	100	100	100
223	MHN	99	99	98	99	97	98	99	97
241	MHN	99	98	98	99	99	99	99	99
228	MHN	99	98	98	98	100	100	100	99
234	MHN	98	98	98	98	97	100	98	100
237	MHN	100	99	96	96	96	97	97	97
244	MHN	100	100	100	100	100	100	100	100
248	MHN	99	98	98	98	98	98	98	98
240	MHN	97	98	98	98	98	98	99	98
218	MHN Neuro	100	100	100	100	100	100	100	100
222	MHN Neuro	100	100	100	100	100	100	100	100
226	MHN Neuro	99	98	100	98	99	99	99	99
239	MHN Neuro	97	97	98	99	99	100	99	99
243	MHN Neuro	100	100	100	100	100	100	100	100
227	MHN Neuro	100	100	98	97	100	97	97	100
246	MHN Neuro	99	99	98	99	99	99	100	100
216	Control	100	100	100	100	100	100	100	100
217	Control	100	100	100	100	100	100	100	100
219	Control	100	100	100	100	100	100	100	100
220	Control	100	100	100	100	100	100	100	100
235	Control	98	99	98	99	99	99	99	99
245	Control	99	100	99	99	99	99	99	98
247	Control	100	100	99	99	100	100	100	100
229	MHS	99	98	98	100	97	97	97	97
230	MHS	100	100	100	100	100	100	100	100
231	MHS	98	100	97	98	97	98	98	100
232	MHS	99	100	100	100	98	100	98	98
233	MHS	100	99	100	100	100	100	100	100
236	MHS	98	98	99	97	100	98	98	98
238	MHS	98	100	98	97	99	99	99	99

Tabelle 6: Periphere Sauerstoffsättigung [%] während der Untersuchung.

Proband	Diagnose	Myoglobin vor der U.	CK vor der U.	Myoglobin nach der U.	CK nach der U.	Myoglobin 24h nach U.	CK 24h nach U.
221	MHN	46	95	49	94	44	169
223	MHN	68	77	71	124	*	*
241	MHN	57	143	47	120	59	223
228	MHN	65	61	70	72	65	61
234	MHN	57	52	56	37	40	179
237	MHN	53	136	55	130	35	206
244	MHN	41	103	46	87	47	163
248	MHN	90	269	90	231	*	*
240	MHN	51	234	48	210	58	208
218	MHN Neuro	57	1549	60	1353	118	998
222	MHN Neuro	73	322	65	323	78	381
226	MHN Neuro	115	581	106	456	145	649
239	MHN Neuro	183	1120	168	1117	*	*
243	MHN Neuro	80	384	80	388	61	508
227	MHN Neuro	86	760	69	630	87	739
246	MHN Neuro	76	333	78	309	*	*
216	Control	23	34	33	24	*	*
217	Control	33	21	33	15	*	*
219	Control	22	96	21	82	21	79
220	Control	25	89	24	80	23	147
235	Control	22	131	21	122	25	175
245	Control	33	55	38	76	43	105
247	Control	27	157	27	116	30	111
229	MHS	50	253	58	254	72	513
230	MHS	43	102	51	90	*	*
231	MHS	56	223	52	195	*	*
232	MHS	152	1805	142	1869	102	1838
233	MHS	79	156	84	167	80	374
236	MHS	70	177	56	165	*	*
238	MHS	193	789	219	809	*	*

Tabelle 7: Muskelenzyme CK [U/l] und Myoglobin [$\mu\text{g/l}$] vor, unmittelbar nach der Untersuchung und 24 Stunden nach der Untersuchung, (U.: Untersuchung), *: keine Blutproben zurückgeschickt.

Proband	Diagnose	-30min	-15min	0min	15min	30min	45min
221	MHN	*	*	*	*	*	*
223	MHN	0,32	0,41	0,29	0,88	1,10	1,02
241	MHN	1,40	1,38	1,03	1,83	1,93	1,96
228	MHN	0,42	0,45	0,39	0,64	0,70	0,81
234	MHN	0,72	0,66	0,68	0,68	0,85	1,06
237	MHN	0,45	0,72	0,31	0,36	0,63	0,66
244	MHN	1,10	1,20	0,91	1,13	1,11	1,07
248	MHN	0,38	0,35	0,95	7,46	2,81	5,20
240	MHN	0,84	0,93	0,66	0,59	0,79	0,96
218	MHN Neuro	0,48	0,56	0,52	0,90	0,88	0,67
222	MHN Neuro	0,50	0,52	0,52	2,92	4,27	3,17
226	MHN Neuro	0,38	0,36	0,35	0,51	0,60	0,61
239	MHN Neuro	1,20	1,13	0,66	0,98	1,02	0,98
243	MHN Neuro	0,33	0,26	0,56	11,58	13,16	12,86
227	MHN Neuro	0,28	0,23	0,13	0,34	0,42	0,63
246	MHN Neuro	0,46	0,51	0,54	3,25	4,81	4,13
216	Kontrolle	0,11	0,16	0,18	0,008	0,19	0,23
217	Kontrolle	0,19	0,15	0,18	0,25	0,11	0,23
219	Kontrolle	0,58	0,49	0,51	0,81	0,85	0,91
220	Kontrolle	0,46	0,47	0,35	1,15	1,43	1,19
235	Kontrolle	0,51	0,43	0,38	0,46	0,48	0,44
245	Kontrolle	0,59	0,61	1,28	4,55	2,96	1,83
247	Kontrolle	1,19	1,30	2,14	2,90	1,82	1,45
229	MHS	0,70	0,87	0,99	2,4	1,66	1,32
230	MHS	0,50	0,49	0,41	3,37	3,76	2,10
231	MHS	0,51	0,41	3,66	6,13	4,62	2,68
232	MHS	0,42	0,46	1,47	6,66	4,91	3,35
233	MHS	0,79	0,87	0,60	1,70	1,66	1,73
236	MHS	0,26	0,23	1,12	8,2	10,06	9,48
238	MHS	0,73	0,68	1,35	7	7,08	5,18

Tabelle 8: Intramuskuläre Laktatkonzentration [mmol/l] nach Stimulation mit 200 µl Halothan 4 Vol%, Sonde 1, *: Dialysatmenge zur Messung nicht ausreichend.

Proband	Diagnose	-30min	-15min	0min	15min	30min	45min
221	MHN	0,51	0,79	0,9	1,74	1,46	1,67
223	MHN	*	*	*	*	*	*
241	MHN	0,69	0,62	0,42	0,89	0,99	1,00
228	MHN	0,32	0,36	0,35	0,67	0,78	0,99
234	MHN	0,69	0,81	0,50	0,96	1,05	0,95
237	MHN	0,39	0,32	0,35	0,70	0,65	0,66
244	MHN	0,39	0,53	0,49	0,68	0,62	0,60
248	MHN	0,44	0,38	0,97	7,94	8,96	6,81
240	MHN	0,83	0,90	0,57	0,75	0,75	0,85
218	MHN Neuro	1,05	1,06	0,88	1,61	1,77	1,42
222	MHN Neuro	0,23	0,29	0,14	0,33	0,27	0,24
226	MHN Neuro	0,88	1,15	1,10	0,90	0,98	1,09
239	MHN Neuro	0,78	0,78	0,70	0,94	0,95	0,98
243	MHN Neuro	0,55	0,41	0,51	5,76	7,96	7,17
227	MHN Neuro	0,16	0,19	0,11	0,70	0,51	0,70
246	MHN Neuro	0,63	0,59	0,71	5,15	5,24	3,80
216	Kontrolle	0,25	0,28	0,13	0,15	0,25	0,28
217	Kontrolle	0,38	0,31	0,33	0,45	0,24	0,61
219	Kontrolle	0,87	0,88	0,85	1,24	1,38	1,34
220	Kontrolle	0,44	0,39	0,32	0,53	0,69	1,07
235	Kontrolle	0,88	1	0,88	1,41	1,27	1,23
245	Kontrolle	0,94	0,87	0,73	1,46	1,20	1,19
247	Kontrolle	1	1,31	1,30	2,16	1,89	1,75
229	MHS	0,47	0,45	0,72	12,03	12,1	11,78
230	MHS	*	*	*	*	*	*
231	MHS	0,55	0,62	2,85	4,73	3,90	2,72
232	MHS	1,13	1,05	0,80	1,53	1,18	1,04
233	MHS	0,85	0,85	5,23	4,19	4,20	2,98
236	MHS	0,60	0,58	0,48	1,20	1,03	0,82
238	MHS	0,21	0,31	0,48	5,68	6,80	6,01

Tabelle 9: Intramuskuläre Laktatkonzentration [mmol/l] nach Stimulation mit 200 µl Halothan 4 Vol%, Sonde 2, *: Dialysatmenge zur Messung nicht ausreichend.

Proband	Diagnose	-30min	-15min	0min	15min	30min	45min
221	MHN	0,80	0,43	0,40	1,55	1,48	1,22
223	MHN	*	*	*	*	*	*
241	MHN	1,10	1,10	1	2,47	1,66	1,51
228	MHN	0,20	0,23	0,30	0,80	0,54	0,20
234	MHN	0,95	0,96	0,90	0,87	0,97	1,21
237	MHN	0,41	0,48	0,51	1,25	0,87	0,71
244	MHN	0,72	0,84	0,86	0,79	0,93	1,01
248	MHN	0,57	0,69	0,36	0,76	0,63	0,67
240	MHN	0,90	0,84	0,61	0,94	0,94	0,75
218	MHN Neuro	1,33	1,39	1	1,86	2,48	2,05
222	MHN Neuro	*	*	*	*	*	*
226	MHN Neuro	1,02	0,82	0,70	0,70	1,44	1,40
239	MHN Neuro	0,39	0,60	0,45	0,88	0,92	0,93
243	MHN Neuro	0,69	0,52	0,45	1,62	1,40	1,03
227	MHN Neuro	0,26	0,55	0,12	0,93	1,05	0,66
246	MHN Neuro	0,71	0,86	0,68	1,08	0,97	1,14
216	Kontrolle	0,34	0,24	0,17	0,20	0,17	0,29
217	Kontrolle	0,28	0,36	0,32	0,27	0,17	0,33
219	Kontrolle	0,83	0,83	0,71	1,54	1,13	1,11
220	Kontrolle	0,37	0,61	0,68	0,95	0,74	0,72
235	Kontrolle	0,88	0,87	0,96	3,32	2,40	1,81
245	Kontrolle	0,60	0,70	1,22	2,08	1,53	1,49
247	Kontrolle	0,90	1,03	1,28	1,60	1,24	1,17
229	MHS	0,72	0,60	0,65	3,19	6,39	3,87
230	MHS	0,79	0,75	0,68	1,84	1,58	1,19
231	MHS	0,62	0,57	0,59	0,71	0,77	0,85
232	MHS	0,87	0,89	1,50	2,44	1,60	1,35
233	MHS	0,60	0,67	0,77	1,16	1,41	0,99
236	MHS	0,34	0,22	0,65	5,52	5,75	4,10
238	MHS	0,54	0,60	0,83	4,57	5,79	4,10

Tabelle 10: Intramuskuläre Laktatkonzentration [mmol/l] nach Stimulation mit 200 µl Koffein 80 mM, Sonde 1, *: Dialysatmenge zur Messung nicht ausreichend.

Proband	Diagnose	-30min	-15min	0min	15min	30min	45min
221	MHN	0,51	0,54	0,32	1,22	1,40	1,27
223	MHN	*	*	*	*	*	*
241	MHN	0,74	0,71	0,78	1,87	1,61	1,14
228	MHN	0,30	0,19	0,23	0,45	0,45	0,70
234	MHN	0,70	0,65	0,87	0,78	0,35	0,45
237	MHN	0,54	0,45	0,43	0,65	0,66	0,67
244	MHN	1,13	1,13	1	1,09	1,06	1,03
248	MHN	0,06	0,19	0,13	0,56	0,58	0,67
240	MHN	1,13	1	1,08	0,94	1,02	0,96
218	MHN Neuro	0,86	0,93	0,75	1,73	1,35	1,30
222	MHN Neuro	0,35	0,34	0,26	0,70	1,19	0,95
226	MHN Neuro	*	*	*	*	*	*
239	MHN Neuro	0,72	0,65	0,32	0,99	0,82	0,79
243	MHN Neuro	0,46	0,35	0,27	1,3	1,39	1,19
227	MHN Neuro	*	*	*	*	*	*
246	MHN Neuro	0,38	0,36	0,29	1,30	0,76	0,74
216	Kontrolle	*	*	*	*	*	*
217	Kontrolle	0,19	0,25	0,32	0,28	0,23	0,28
219	Kontrolle	0,87	0,87	0,81	1,23	1,15	1,22
220	Kontrolle	0,51	0,67	0,74	0,86	0,91	0,98
235	Kontrolle	0,78	0,79	0,79	2,36	2,14	1,65
245	Kontrolle	0,82	0,83	0,76	1,34	1,20	1,22
247	Kontrolle	0,75	0,90	1,08	1,11	0,95	0,91
229	MHS	0,71	0,50	0,76	4,08	4,09	2,90
230	MHS	0,90	0,87	0,84	1,28	1,34	1,35
231	MHS	0,27	0,29	1,81	1,27	1,10	0,98
232	MHS	0,56	0,56	0,62	1,87	1,49	0,94
233	MHS	0,87	0,84	1,11	2,27	2,69	1,46
236	MHS	1,10	1,20	1,31	3,81	3,27	2,86
238	MHS	0,56	0,61	1,93	11,06	11,49	11,11

Tabelle 11: Intramuskuläre Laktatkonzentration [mmol/l] nach Stimulation mit 200 µl Koffein 80 mM, Sonde 2, *: Dialysatmenge zur Messung nicht ausreichend.

Proband	Diagnose	Einstechen	Spritzen	direkt nach Entfernung
221	MHN	1	0	2
223	MHN	2	0	1
241	MHN	3	1	1
228	MHN	0	0	0
234	MHN	5	1	0
237	MHN	4	2	1
244	MHN	5	0	0
248	MHN	3	2	3
240	MHN	3	1	1
218	MHN Neuro	6	2	1
222	MHN Neuro	1	1	2
226	MHN Neuro	4	0	2
239	MHN Neuro	5	4	1
243	MHN Neuro	6	1	1
227	MHN Neuro	0	0	0
246	MHN Neuro	5	5	0
216	Kontrolle	3	0	0,5
217	Kontrolle	0	0,5	0
219	Kontrolle	4	2	1
220	Kontrolle	1	1	1
235	Kontrolle	0	0,5	1
245	Kontrolle	4	3	0
247	Kontrolle	2	4	0
229	MHS	6	5	4
230	MHS	7	5	0,5
231	MHS	4	6	4
232	MHS	2	3	2
233	MHS	3	2	1
236	MHS	4	1,5	1
238	MHS	5	5	1

Tabelle 12: Werte der Visuellen Analogskala [0-10] während der Untersuchung, (0: kein Schmerz; 10: maximaler Schmerz).

Proband	Diagnose	Gesamtverlauf	Information im Vorfeld	Betreuung	S. Kanüle legen	S. Lokalanästhesie	S. Einstechen Messkatheter	S. Triggerapplikation	S. Entfernung Messkatheter	S. Tag der Untersuchung	S. Tag nach Untersuchung	Beeinträchtigung Tag n. Versuch	Rötung Einstichstelle	Bluterguss Einstichstelle	Tage durch S. beeinträchtigt	Schmerzcharakter	Schmerzdauer [min]	Einstichstelle verheilt [Tage]	IVCT/ Messkatheter
229	MHS	1	2	1	1	5	6	4	3	2	1	2	2	5	5	kr	45	10	Mess
232	MHS	2	1	1	2	2	2	3	1	2	1	3	2	3	2	ku	5	6	Mess
236	MHS	1	2	1	1	3	2	2	1	1	1	1	1	3	0	kr	2	10	Mess
238	MHS	1	1	1	2	4	5	6	6	5	2	2	1	3	2	kr	30	3	Mess
218	MHN N	3	2	1	6	3	7	5	3	2	2	3	2	2		ku	3	3	Mess
222	MHN N	1	3	1	2	2	2	2	2	3	3	5	5	5	5	st	3	3	Mess
239	MHN N	1	2	1	5	3	5	4	4	10	9	9	3	3	14	ku	5	7	Mess
227	MHN N	1	1	1	2	1	3	1	3	2	2	3	2	4	3	ku	3	3	Mess
243	MHN N	1	1	1	1	1	5	3	2	2	1	1	2	7	0	st	0	5	Mess
241	MHN	1	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	2	0	k	0	14	Mess
223	MHN	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	2	5	2	k	0	2	Mess
221	MHN	1	1	1	1	2	1	1	1	4	3	4	1	1	4	k	0	3	Mess
228	MHN	1	1	1	2	1	3	1	3	2	2	3	2	4	3	ku	30	3	Mess
234	MHN	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	sp	0	5	Mess
237	MHN	1	1	1	3	1	1	2	2	2	4	5	2	2	6	k	0	3	Mess
248	MHN	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	k	0	2	Mess
216	Kontrolle	1	1	1	2	3	4	2	1	4	2	3	2	2	4	st	1	20	
217	Kontrolle	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	st	1	2	
219	Kontrolle	2	2	2	1	4	5	4	2	3	3	3	2	3	2	ku	10	10	
220	Kontrolle	9	8	10	2	7	3	4	2	3	1	2	2	4	3	sp	2	6	
235	Kontrolle	3	2	1	3	7	5	1	2	3	1	2	3	3	2	sp	10	7	
245	Kontrolle	1	1	1	2	3	4	3	2	2	1	2	1	3	1	ku	10	3	
247	Kontrolle	1	1	1	1	7	4	4	4	2	2	2	2	2	1	st	5	4	

Tabelle 13: Einzelergebnisse des Fragebogens, Zahlen mittels Visueller Analogskala [0-10], (0: kein Schmerz, 10: maximaler Schmerz, kr: krampfartig, ku: kurz einschließend, st: stumpf, k: kein, sp: spitz, S.: Schmerz, Mess: Messkatheter, N: Neuro).

	0,5 µl/min		1 µl/min		2 µl/min		5 µl/min		10 µl/min	
1	1,26	1,29	1,01	1,03	0,57	0,58	0,27	0,27	0	0
2	1,28	1,17	0,86	0,86	0,63	0,56	0,29	0,28	0	0
3	1,25	1,25	1	0,92	0,60	0,66	0,19	0,16	0	0
4	1,17	1,35	1,05	1,02	0,68	0,65	0,14	0,13	0	0
5	1,07	1,10	0,83	0,96	0,55	0,57	0,14	0,17	0	0
6	1,09	1,19	1,01	0,94	0,41	0,38	0,17	0,16	0	0
7	1,03	1,12	0,94	0,97	0,33	0,37	0,12	0,11	0	0

Tabelle 14: Absolute Laktatwerte der relativen Recovery [mmol/l] bei unterschiedlichen Perfusionsgeschwindigkeiten, Anzahl der Sonden n=7, je zwei Werte pro Flussrate.

8 Danksagung

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Frank Schuster für die stetige Unterstützung während der Versuche und bei der Erstellung der Arbeit. Ohne sein Engagement, seine Geduld und Diskussionsbereitschaft wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Ein herzlicher Dank gebührt Herrn Dr. med. Thomas Metterlein, der mir jederzeit mit Tipps und konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Danken möchte ich dem gesamten Team des MH-Labors sowie der peri-anästhesiologischen Station für ihre tatkräftige Unterstützung. Die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre werden mich meine Zeit als Doktorandin in bester Erinnerung behalten lassen.

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

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Cosima Maria Roth
E-Mail: cosimaroeth@yahoo.de
Geburtsdatum: 06.03.1984
Geburtsort: Erlangen

AUSBILDUNG

1994 - 2003 Georg-Wilhelm-Steller-Gymnasium, Bad Windsheim
2004 - 2010 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians
Universität, Würzburg
März 2006 erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2010 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PRAKTISCHES JAHR

02/2009 - 06/2009 Gynäkologie, Leopoldina-Krankenhaus, Schweinfurt
06/2009 - 10/2009 Medizinische Klinik, Spital Zimmerberg, Horgen,
Schweiz
10/2009 - 12/2009 Chirurgie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz

FAMULATUR

2006 - 2009 Anästhesie, Urologie, Orthopädie, Medizinische Klinik

AUSSERBERUFLICHE WEITERBILDUNG

09/2003 - 02/2004 Studium der französischen Sprache am „l'institut
catholique“, Paris

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

01/2011 –09/2011 Assistenzärztin Viszeralchirurgie, UniversitätsSpital
Zürich, Schweiz
Ab 01.04.2012 Assistenzärztin Gynäkologie, Spital Oberengadin,
Samedan, Schweiz

Würzburg, den 09.03.2012