

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

**Pilotstudie zur Evaluation eines
minimal-invasiven Diagnoseverfahrens
der Malignen Hyperthermie**

Inaugural – Dissertation

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

Michael Sachs
aus Gemünden am Main

Würzburg, Januar 2007

Referent: Prof. Dr. med. N. Roewer

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

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

23. Mai 2007

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	MALIGNEN HYPERTHERMIE – DIE ENTDECKUNG EINER KRANKHEIT	1
1.2	EPIDEMIOLOGIE UND GENETIK DER MALIGNEN HYPERTHERMIE	1
1.3	PATHOGENESE DER MALIGNEN HYPERTHERMIE.....	2
1.4	KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD DER MALIGNEN HYPERTHERMIE	3
1.5	DIAGNOSE DER MALIGNEN HYPERTHERMIE - DER INVITRO-KONTRAKTURTEST	4
1.6	STRESSEMPFINDLICHE SCHWEINE - MODELL DER MALIGNEN HYPERTHERMIE .	5
1.7	PRINZIP DER LAKTAT-MIKRODIALYSE	6
1.8	PRINZIP DER SPEKTROMETRISCHEN pH- UND pCO ₂ -MESSUNG	7
1.9	FRAGESTELLUNG	8
2	METHODIK	10
2.1	VERSUCHSTIERE	10
2.2	TRIGGERSUBSTANZEN	11
2.3	MIKRODIALYSESONDEN UND PUMPEN.....	11
2.4	LAKTAT-ANALYSE	12
2.5	GASANALYSE VON pH UND pCO ₂	13
2.6	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG.....	14
3	ERGEBNISSE.....	25
3.1	LAKTAT-MIKRODIALYSE UNTER HALOTHAN-STIMULATION	25
3.2	LAKTAT-MIKRODIALYSE UNTER KOFFEIN-STIMULATION	26
3.3	GEWEBE - pH UND pCO ₂ UNTER KOFFEIN-STIMULATION.....	29
3.4	SYSTEMISCHE, HÄMODYNAMISCHE UND METABOLISCHE PARAMETER	35
3.5	MALIGNEN-HYPERTHERMIE-KRISE	40
3.6	HISTOLOGIE.....	43
4	DISKUSSION	44
4.1	METHODENKRITIK	44
4.2	LAKTAT-MIKRODIALYSE UNTER HALOTHAN-STIMULATION	44

4.3	LAKTAT-MIKRODIALYSE UNTER KOFFEIN-STIMULATION	45
4.4	GEWEBE - pH UND pCO ₂ UNTER KOFFEIN-STIMULATION.....	48
4.5	SYSTEMISCHE PARAMETER.....	51
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	53
6	LITERATURVERZEICHNIS	56

1 Einleitung

1.1 Maligne Hyperthermie – die Entdeckung einer Krankheit

Narkosezwischenfälle unterschiedlicher Art sind seit der Entstehung der modernen Anästhesie bekannt. Hierzu zählt neben anderen Symptomen auch der plötzliche und unerwartete Anstieg der Herzfrequenz, der Kohlendioxidproduktion und schließlich der Körpertemperatur unter der Narkose mit volatilen Anästhetika. Dieses Phänomen wurde bereits im Jahre 1900 von der New York Academy of Medicine als perioperative Hitzschläge diskutiert. In den folgenden Jahren wurde von weiteren Fällen in den Vereinigten Staaten, England und Frankreich berichtet. Als Ursache wurden unter anderem allergische Reaktionen, hormonelle Imbalance oder falsches Narkoseregime genannt.¹

Im Jahr 1940 beschrieb G.E. Burford erstmals die ‚perioperative Hyperpyrexie‘ mit der charakteristischen Symptomentrias von Hyperthermie, Tachykardie und Tachypnoe.² Die Maligne Hyperthermie als eigenständige Erkrankung wurde allerdings erst 1960 durch M. Denborough und R.R.H. Lovell erkannt, welche im Rahmen der Reposition einer Unterschenkelfraktur Halothan zur Narkose verwendeten. Der Patient, in dessen Verwandtschaft bereits mehrere Mitglieder im Rahmen von Narkosen verstorben waren, entwickelte unter der Operation die Symptome der Malignen Hyperthermie. Nach Aufarbeitung des Falles schlossen Denborough und Lovell, dass spezielle pharmakologische Trigger die beobachtete Stoffwechsellage bewirken müssen.³

1.2 Epidemiologie und Genetik der Malignen Hyperthermie

Bei der Malignen Hyperthermie handelt es sich um eine subklinische genetische Erkrankung, die nur im Rahmen einer Narkose mit Triggersubstanzen manifest wird. Die Vererbung erfolgt autosomal dominant, wobei von einer mittleren Frequenz von 1:10 000 für das Auftreten des MHS-Allels ausgegangen wird.⁴ Die

Inzidenzrate wird abhängig von der Definition der klinisch manifesten MH mit 1:250 000 bis zu 1: 15 000 angegeben.⁵ Anhand von Linkage-Analysen wurden bis heute 6 verschiedene Genloci für die Maligne Hyperthermie beim Menschen gefunden. Bei etwa 40-50% der betroffenen Patienten konnte das verursachende Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 19 (19q13.1)^{6, 7} mit mehr als 100 verschiedenen Punktmutationen⁸ lokalisiert werden, welches als MHS1 Locus bezeichnet wird und für den Ryanodinrezeptor (RyR1) kodiert. Weitere Genorte konnten auf Chromosom 17 (17q11.2-q24, MHS2-Locus⁹), Chromosom 7 (7q21.1, MHS3-Locus¹⁰), Chromosom 3 (3q13.1, MHS4-Locus¹¹), Chromosom 1 (1q32, MHS5-Locus¹²) und Chromosom 5 (5p, MHS6-Locus¹²) nachgewiesen werden. Außer für den MHS5–Locus, welcher für die α 1-Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors kodiert, konnten die entsprechenden Genprodukte der weiteren Loci nicht eindeutig identifiziert werden. Verschiedene Genloci und bisher mehr als 100 beschriebene Mutationen allein auf dem Ryanodinrezeptor schränken den Einsatz eines Gentests zur Diagnose einer Veranlagung zur Malignen Hyperthermie beim Menschen ein.

1.3 Pathogenese der Malignen Hyperthermie

Bei der normalen Erregung der Skelettmuskelzelle werden in der T-Tubulusmembran lokalisierte, spannungsabhängige Dihydropyridin-Rezeptoren (Kalziumkanäle) aktiviert. Hierdurch werden im sarkoplasmatischen Retikulum Ryanodinrezeptoren stimuliert, welche eine Kalziumfreisetzung in das Zytosol bewirken. Über eine Bindung von Kalzium an Troponin und die Ausbildung von Querbrücken zwischen den Myofilamenten Aktin und Myosin resultiert eine Muskelkontraktion. Zum anderen werden durch Kalzium verschiedene Stoffwechselprozesse in der Skelettmuskelzelle aktiviert.^{13, 14}

Bei der Malignen Hyperthermie kommt es zu einer Störung der Kalziumhomöostase der Skelettmuskelzellen. Auslöser der Erkrankung sind externe Triggersubstanzen. Hierzu zählen vor allem halogenierte Inhalationsanästhetika mit Halothan als potentestem Trigger. Aber auch die vorher eingesetzten Substanzen Chloroform und Diethyether^{15, 16}, sowie die neueren Inhalationsanästhetika

Isofluran¹⁷, Sevofluran¹⁸ und Desfluran¹⁹, können eine Maligne Hyperthermie auslösen. Die zusätzliche Applikation eines depolarisierenden Muskelrelaxans (z.B. Succinylcholin) führt zu einer schnelleren und stärkeren Ausprägung. Die Triggersubstanzen verlängern die Öffnungszeit des Ryanodinrezeptors bei MH-veranlagten Patienten.^{20, 21, 22, 23} Dies führt zu einer vermehrten Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern und damit zu einer verstärkten und verlängerten Muskelkontraktion. Darüber hinaus werden die kalziumabhängigen intrazellulären Stoffwechselprozesse aktiviert, welches einen zellulären Hypermetabolismus mit den entsprechenden klinischen Symptomen zur Folge hat.

1.4 Klinisches Erscheinungsbild der Malignen Hyperthermie

Das klinische Erscheinungsbild der malignen Hyperthermie kann sehr stark variieren, da es kein einzelnes pathognomonisches Symptom gibt. Vielmehr ist die Diagnose an das Auftreten eines Musters in einem bestimmten zeitlichen Zusammenhang zu einer Exposition von Triggersubstanzen zu stellen. Auch die Ausprägung der Schwere einer Malignen Hyperthermie unterliegt einer großen Variabilität.²³ Des Weiteren besteht eine große multifaktoriell bedingte Variabilität hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung sowie der Geschwindigkeit des Auftretens von Symptomen.

Eines der ersten Symptome ist häufig ein erhöhter Tonus der Kaumuskulatur bei Verwendung des depolarisierenden Muskelrelaxans Succinylcholin, welcher bis hin zum Masseterspasmus reichen kann. Der Trismus geht nicht selten der Entwicklung einer MH-Krise erheblich voraus.^{23, 24} Die Inzidenz eines Masseterspasmus als erstes Zeichen einer MH während einer Narkose wird mit 40 – 80% angegeben.²⁵

Durch die Störung der Kalziumhomöostase wird ein zellulärer Hypermetabolismus stimuliert. Die zunächst aerobe Glykolyse führt zu einem erhöhten Anfall von CO₂, welches vermehrt abgeatmet wird und konsekutiv zu Tachypnoe, ansteigender endexpiratorischer CO₂ Konzentration und einem schnellen Verbrauch des CO₂ Absorbers führt. Im Rahmen eines rapiden Verbrauchs intrazellulärer energiereicher Phosphate, kann es bereits in diesem Stadium zu ei-

ner frühen Laktatazidose kommen. Diese metabolische Azidose führt zu einer Stimulation des sympathischen Systems, was sich in einer Tachykardie des Patienten bemerkbar macht.

Der Anstieg der Körpertemperatur ist im Rahmen des Hypermetabolismus ein relativ später Indikator, der in zeitlicher Latenz zu den oben genannten Symptomen auftreten kann. Entscheidend für die Prognose ist nicht das Temperaturmaximum, sondern die Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs, welche bis zu 1°C in 5 min bei fulminanten MH-Krisen betragen kann.

Im weiteren Verlauf kann eine generalisierte Muskelsteife auftreten. Die hierdurch eingeschränkte Blutzirkulation führt zu einer Unterversorgung der Muskulatur mit Sauerstoff und damit zu einer Einschränkung der oxidativen Energiegewinnung. Im Rahmen der zunehmenden anaeroben Glykolyse fällt Laktat an und verstärkt die metabolische Azidose. Daneben akkumulieren Wärme und die Muskelzellen verlieren ihre energiereichen Phosphate. Die Summe dieser Vorgänge führt schließlich zum Verlust der Zellintegrität und deren Untergang.

Mit einsetzender Rhabdomyolyse kommt es zur Freisetzung von Myoglobin mit konsekutiver Myoglobinurie und der Gefahr eines Nierenversagens. Das aus der zerstörten Muskulatur freigesetzte Kalium führt zusammen mit dem erhöhten sympathischen Tonus zu Herzrhythmusstörungen, die schließlich in ein Herz-Kreislauf-Versagen münden.

1.5 Diagnose der Malignen Hyperthermie - der In-vitro-Kontrakturtest

Bei familiärer Belastung mit der Anlage zur Malignen Hyperthermie bzw. früheren Narkosezwischenfällen sollte die individuelle Veranlagung für diese Erkrankung bei jedem Blutsverwandten bestimmt werden. Auf Grund der Heterogenität der Erkrankung ist beim Menschen eine zuverlässige genetische Untersuchung nur eingeschränkt möglich. Auch im Blut konnten, obwohl bei vielen Patienten die CK erhöht ist, kein zuverlässiger Parameter für die Diagnostik gefunden werden. Die präsymptomatische Diagnose der Veranlagung zur Malignen Hyperthermie wird durch den In-vitro-Kontrakturtest als Standardverfahren gestellt. Der Ende der 60er Jahre von Ellis²⁶ und Kalow²⁷ entwickelte Test be-

ruht auf der Beobachtung, dass Muskelproben von Anlageträgern unter Exposition mit den Triggersubstanzen Koffein und Halothan andere Kontrakturprofile zeigen, als die von Nicht-Anlageträgern. Von der „European MH Group“ wurden im Folgenden standardisierte Testprotokolle veröffentlicht, mit denen seit 1984 eine standardisierte Testung durchgeführt wird.^{28, 29} Diese führen zur Einteilung der Patienten in die drei Gruppen MHS (Anlageträger), MHN (Nichtanlageträger) und MHE (Grenzbereich zwischen MHS und MHN). Den Patienten muss für die Untersuchung in einer offenen Biopsie ein Biopsat des M. quadrizeps femoris zur Testung entnommen werden. Auf Grund der Invasivität des Verfahrens bestehen Risiken wie beispielsweise Blutungen, Infektionen, Nervenläsionen. Zudem ist mit einer postoperativen Rekonvaleszenz von 4 – 6 Wochen zu rechnen. Darüber hinaus ist es kosten- (OP, Arbeitsunfähigkeit etc.) und zeitintensiv. Auch gibt es in Deutschland lediglich 7 MH-Labors, welche diese Testung durchführen. Auch deswegen ist dieses Verfahren nicht für die schnelle Diagnostik geeignet und nicht bei allen Patienten auf Grund der Belastung durchzuführen. Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass die Sensitivität nicht mit 100% angenommen werden darf, da falsch negative Ergebnisse dokumentiert wurden.^{30, 31} Dennoch ist der In-vitro-Kontrakturtest heute der Goldstandard in der MH-Diagnostik.

1.6 Stressempfindliche Schweine - Modell der Malignen Hyperthermie

Zur menschlichen malignen Hyperthermie besteht mit dem „porcine stress syndrom“ der stressempfindlichen Schweine^{32, 33, 34} ein Korrelat im Tierreich. Diese Schweine werden wegen ihrer größeren Muskelmasse und ihrem fettarmen Fleisch gezielt gezüchtet. Darüber hinaus sind die Tiere dadurch gekennzeichnet, dass sie auf Trigger wie Stress mit einer generalisierten malignen Hyperthermie reagieren.³⁵ Die dabei auftretenden Veränderungen entsprechen in ihrem Erscheinungsbild (Vitalzeichen, Metabolismus, Säure-Basen-Haushalt, Temperatur und Muskelrigidität) der malignen Hyperthermie beim Menschen.^{36,37} 1966 gelang es erstmals Hall et al. bei stressempfindlichen englischen Landschweinen durch die Applikation von Succinylcholin eine MH-

ähnliche Reaktion auszulösen. Im Folgenden konnte der gleiche Effekt durch die Verabreichung von Halothan nachgewiesen werden. Seit dieser Zeit gelten diese stressempfindlichen Schweine als etabliertes Tiermodell der Malignen Hyperthermie des Menschen.

Die Ursache für das „porcine stress syndrom“ wurde in einem Calcium-Kanalprotein, dem Ryanodinrezeptor des sarcoplasmatischen Reticulums, gefunden. Bei Merkmalsträgern weist dieses Protein eine höhere Affinität zu Ryanodin auf, als bei normalen Schweinen.³⁸ Bei der zugrunde liegenden Mutation handelt es sich um eine Basensubstitution im Gen des Ryanodinrezeptors^{39, 40} auf Chromosom 6, welcher auch als HAL (halothane sensitivity locus) - Locus bezeichnet wird.⁴¹ Beim Menschen findet sich diese Mutation ebenfalls als Ursache für eine Maligne Hyperthermie.⁴² Jedoch macht diese Veränderung nur 2-7% aller MH-Veranlagungen aus, wohingegen sie bei MHS-Schweinen ausschließlich gefunden wird.

1.7 Prinzip der Laktat-Mikrodialyse

Die Mikrodialyse beruht auf der freien Diffusion von Molekülen. Treibende Kraft ist ein Konzentrationsgradient zwischen zwei flüssigkeitsgefüllten Kompartimenten, welche durch eine semipermeable Membran mit einer definierten Porengröße (molekularer Cut-off) getrennt sind.⁴³ Dabei ist bis zu einer Molekülgröße von 20.000 Da eine freie Diffusion möglich. Das Grundprinzip besteht nun darin, dass durch den Flüssigkeitsstrom im Inneren der Sonde die Konzentration ständig erniedrigt wird und es nie zu einem vollständigen Ausgleich der Konzentrationen kommt. Stattdessen bildet sich ein Gleichgewichtszustand (steady-state) aus, in dem pro Zeiteinheit eine bestimmte Anzahl von Molekülen über die Membran diffundiert. Umgekehrt kann über eine höhere Konzentration einer Substanz in der Perfusionslösung eine Diffusion in das äußere Kompartiment stattfinden.⁴⁴

Das Verhältnis der Konzentrationen im inneren und äußeren Kompartiment wird auch als Recovery bezeichnet. Man kann sie als relatives Verhältnis beider Konzentrationen zueinander (relative oder Konzentrations-Recovery) oder auch

die Anzahl der Moleküle als Maß heranziehen, welche pro Zeiteinheit dem Gleichgewicht entzogen werden (absolute oder Massen-Recovery). Die Recovery ist dabei abhängig von der Perfusionsgeschwindigkeit, der Membranoberfläche, der Porengröße sowie den Diffusionseigenschaften der zu messenden Substanz.

Aus den oben genannten Faktoren sind nun unterschiedliche mathematische Modelle entwickelt worden, mit denen sich die tatsächlichen extrazellulären Konzentrationen errechnen lassen.^{45, 46, 47} Für den hier beschriebenen Versuch ist allerdings nicht die absolute Konzentration, sondern die zeitliche Veränderung durch eine Stimulation von Bedeutung. Die im Folgenden angegebenen Konzentrationen entsprechen somit nicht den wahren extrazellulären Konzentrationen, sondern denen im Dialysat. In diesem Versuch wird lediglich die in-vitro-Recovery zur Bestimmung der Güte der Membranen bei mehrmaliger Verwendung eingesetzt.

1.8 Prinzip der spektrometrischen pH- und pCO₂-Messung

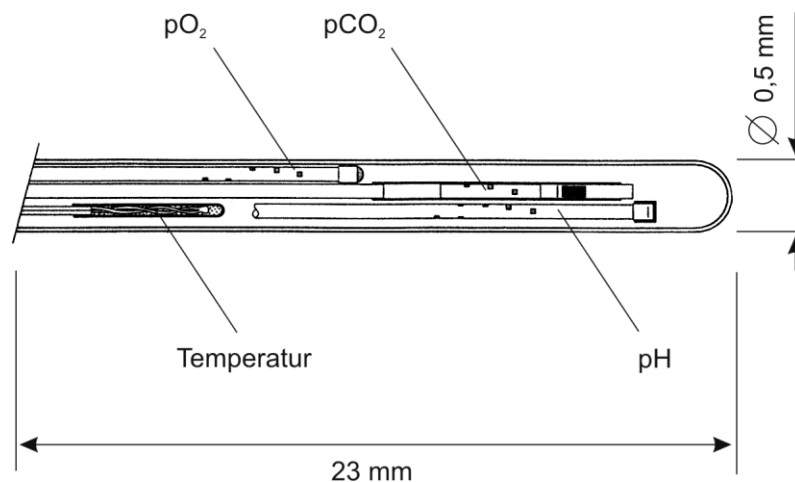


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Messsensoren der Multiparameter-Sonde Paratrend® 7

Die Multiparameter-Sonde Paratrend[®] 7^{FL} wurde zur kontinuierlichen Messung des intraarteriellen pO₂, pCO₂, pH, sowie der Temperatur entwickelt. Sie findet klinische Anwendung bei intensivpflichtigen Patienten in der Neurochirurgie und Neonatologie. Es existieren jedoch etliche tierexperimentelle Studien, in denen die Paratrend[®]-Sonde zur Erfassung von Gewebepartialdruck- sowie GewebepH-Veränderungen erfolgreich eingesetzt wurde. Im Rahmen der Studien wurden Messungen in Hirn⁻⁴⁸, Fett⁻⁴⁹ und Lebergewebe⁵⁰ sowie in der Darm-schleimhaut⁵¹ durchgeführt.

Die Messsonde selber setzt sich aus drei optischen Sensoren, sowie einem Thermoelement zusammen. Jeder optische Sensor stellt dabei ein eigenes kleines Photometer dar. Sie bestehen aus einer lichtleitenden Polymethylmethacrylfaser mit einem Durchmesser von 175 µm, an deren Ende Indikatorsubstanzen in den Strahlengang eingebracht sind. Das eingespeiste Licht wird durch einen kleinen Spiegel am Ende jedes Lichtleiters reflektiert und über die Absorption der Indikatorsubstanzen die Konzentration von pH, pCO₂ und pO₂ ermittelt.⁵²

1.9 Fragestellung

Es ist angesichts des invasiven In-vitro-Kontrakturtests von Interesse ein Verfahren zu entwickeln, welches die Möglichkeit bietet, minimal-invasiv und ohne große Belastung für den Patienten, eine MH-Veranlagung festzustellen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit Pietrain-Schweine, mit und ohne Veranlagung für das „porcine stress syndrom“, untersucht. Die Entwicklung einer MH-Episode wird normalerweise durch die systemische Gabe der entsprechenden Triggersubstanz in sämtlichen Muskeln des Körpers gleichzeitig ausgelöst. Dieser Pilotstudie liegt die Überlegung zu Grunde, dass die lokale Applikation der Triggersubstanzen Koffein bzw. Halothan direkt in den Skelettmuskel der veranlagten Schweine zu einem lokal begrenzten, MH-ähnlichen Hypermetabolismus führt, ohne eine generalisierte Maligne Hyperthermie auszulösen. Durch das Monitoring von systemischen Parametern (Herzfrequenz, Blutdruck, Körpertemperatur, endtidales Kohlendioxid, CK, Laktat, BGA) soll gezeigt wer-

den, dass die Veränderungen lokal begrenzt ablaufen, da ausgeschlossen werden muss, dass bei Anlageträgern eine MH-Episode im Rahmen eines möglichen Diagnoseverfahrens ausgelöst werden könnte.

Über direkt in den Muskel eingebrachte Sonden werden die für die MH typischen metabolischen Veränderungen in unmittelbarer Umgebung der Triggerrung registriert. Der induzierte zelluläre Hypermetabolismus lässt dabei einen Anstieg des lokalen Laktatspiegels, welcher über Mikrodialyse-Sonden gemessen wird, erwarten. Über die vermehrt ablaufende oxidative Energiegewinnung im Rahmen der begrenzten MH-Reaktion wird ein Anstieg des CO_2 Gewebepartialdruckes erwartet, welcher mittels einer Multiparametersonde erfasst werden soll. Zudem soll über die gleiche Sonde eine entstehende Azidose mit konsekutivem Abfall des Gewebe-pH-Wertes aufgezeichnet werden.

Im Rahmen einer Pilot-Studie soll das methodische Vorgehen evaluiert und Applikationsprotokolle für die jeweiligen Triggersubstanzen erarbeitet werden, da dieses Untersuchungsprinzip in der Literatur bisher nicht beschrieben worden war. Dabei liegt die zu prüfende Hypothese zu Grunde, dass durch die lokale Applikation von Halothan und Koffein über die lokale Erfassung der drei Parameter Laktat, pCO_2 und pH im Muskel eine Unterscheidung zwischen MH-positiven und MH-negativen Tieren möglich ist, ohne dabei eine generalisierte MH-Reaktion auszulösen.

2 Methodik

2.1 Versuchstiere

Mit Genehmigung der örtlichen Tierversuchskommission wurden 1-2 Wochen vor Versuchsbeginn 7 Pietrain-Schweine, welche homozygot für das „porcine stress syndrom“ waren, mit einem Alter von 12 bis 16 Wochen und einem Gewicht von 25 bis 35 kg aus Zuchtbetrieben des Regierungsbezirks Unterfranken bezogen und im Großtierstall der Experimentellen Chirurgie der Universität Würzburg artgerecht gehalten. Es wurden 4 Schweine mit und 3 Schweine ohne Veranlagung für das „porcine stress syndrom“ untersucht. Die einzelnen Tiere wurden mit zwischenzeitlicher Erholung mehreren Versuchen unterzogen. Dieses Vorgehen wurde für ethisch vertretbarer erachtet, als für jeden Versuch ein eigenes Tier zu verwenden, wodurch die Zahl der Versuchstiere mit etwa 35 zu veranschlagen gewesen wäre. Die Versuche wurden in alternierender Reihenfolge durchgeführt, so dass die Belastung der Tiere durch die Narkose und die Versuchsdurchführung reduziert wurde. Nach Abschluss der eigentlichen Messserien erhielten die Tiere eine Halothan - Inhalationsnarkose und Succinylcholin mit einer konsekutiven MH-Krise bei MH-positiven Tieren. Danach wurden alle Tiere durch i.v. Injektionen eines Lokalanästhetikums und Barbiturates getötet.

Zur eindeutigen Zuordnung zur Gruppe der MHS-/MHN-Tiere wurde eine genetische Testung, sowie ein In-vitro-Kontrakturtest durchgeführt. Dabei wurde bei einem vermeintlichen MHS-Tier eine heterozygote Veranlagung für das „porcine stress syndrom“ festgestellt, so dass dieses Tier von der Auswertung ausgeschlossen wurde.

Im Folgenden werden die Tiere gemäß der Zuordnung zu der Gruppe der Anlageträger mit MHS bzw. der Gruppe der Nicht-Anlageträger mit MHN bezeichnet und gemäß der Reihenfolge der Untersuchung durchnummeriert.

Die Versuchsdurchführung wurde gemäß des Tierversuchsantrages vom 21.06.99 durch die Ethikkommission der Universität Würzburg geprüft und genehmigt.

2.2 Triggersubstanzen

Zur Stimulation mit Halothan wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn 22,5 ml Lipofundin 20% (Braun, Melsungen, Deutschland) mit 2,5 ml des lipophilen Halothans (Fluothane, AstraZeneca, Wedel, Deutschland) in einem gasdichten Glaskolben gemischt.

Die verwendete Koffeinelösung wurde für die Versuche in der Apotheke der Universität Würzburg hergestellt. Kristallines Koffein wurde in Ringer (Ringer-Infusionslösung, Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst, so dass eine 80 mM Stammlösung hergestellt und unter Ultrafiltration in 50 ml Flaschen abgefüllt wurde. Alle weiteren Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit Ringerlösung aus der Stammlösung erzielt.

2.3 Mikrodialysesonden und Pumpen

In den Versuchen wurde die Sonde MAB 7.80.10 (Microtech/se AB, Stockholm, Schweden) verwendet. Sie besitzt eine PES Membran mit einem molekularen Cut-off von 15 kD. Die Länge des Schaftes beträgt dabei 80 mm, die der Membran 10 mm. Der Schaft der Sonde hat einen Außendurchmesser von 0,5 mm und die Membran von 0,6 mm. Der zuführende Schlauch (rot, FEP), sowie der ableitende Schlauch (durchsichtig, FEP) haben eine Länge von 20 cm. Das Totraumvolumen liegt bei 13,6 μ l.

Die invitro Recovery für Laktat bei der verwendeten Perfusionsgeschwindigkeit von 1 μ l/min wurde mit 70-80% ermittelt. Die Recovery wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert und ein Austausch bei einer Minderung von mehr als 5% vorgenommen.

Nach jedem Versuchsende wurden die Sonden in ein Gefäß mit sterilem Aqua dest. gegeben, bei einer Geschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit Aqua dest. für mindestens 30 min. gespült und bis zum nächsten Versuch aufbewahrt. Jede Mikrodialysesonde wurde beschriftet und immer für den gleichen Versuchsaufbau (Kontrolle, Koffein, Halothan-Messung, Halothan-Applikation) verwendet.

Die Perfusion erfolgt durch eine Mikrodialysepumpe (PHD 2000–Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatures, Holliston, MA, USA) mit vier Plätzen für 1 ml Spritzen (Pump Syringe. Becton Dickensen, Heidelberg, Deutschland). Die Mikrodialysespritzen wurden ebenfalls entsprechend ihrem Inhalt beschriftet, nach Versuchsende mit Aqua dest. gespült und anschließend bei 121°C sterilisiert.

Als Perfusionslösung wurde Ringer-Lösung (Ringer-Infusionslösung, Braun, Melsungen, Deutschland) gewählt.

Zur Applikation der Koffeinlösung wurde ein sterilisiertes PE10-Schläuchchen (\varnothing 0,2 mm I.D) (Hartenstein Laborversand, Würzburg, Deutschland) mit einem Gesamttotraum von 20 μl verwendet. Der Schlauch wurde so an der Mikrodialysesonde befestigt, dass das Ende in der Mitte der Membran lag.

Die Konnektion erfolgte mit Schlauch-Adaptern (CMA, Microdialysis AB, Solna, Schweden).

In den Muskel wurden die Sonden über Venenverweilkanülen von 14 bis 16 G (Abbott Laboratories, Illinois, USA) eingebracht.

2.4 Laktat-Analyse

Das gewonnene Dialysat wurde direkt im Anschluss an den Versuch mit einem Spektrophotometer (HP 8453-UV-Visible Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) auf seine Laktatkonzentration untersucht.

Mit Standardlösungen der Laktatkonzentration 4.44, 8.88 und 13.32 mmol/l (Sigma Chemicals Katalog-Nr. 753-11, Deisenhofen, Deutschland) wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm eine Eichgerade generiert. Zur Bestimmung der Laktatkonzentration im Dialysat wurde ein Laktat-Reagenz (Sigma Chemicals Katalog-Nr. 753-10, Deisenhofen, Deutschland) verwendet, welches unter en-

zymatischer Umwandlung von Milchsäure zur Kondensierung der Vorstufen eines Farbkomplexes führt, dessen Absorptionsmaximum bei 540 nm liegt. Die Extinktion und somit die Ermittlung der Laktatkonzentration ist bis zu einer Konzentration von 13.32 mmol/l direkt proportional.

Zur Analyse wurden vier Quarzkristallküvetten mit einer Schichtdicke von 10mm verwendet. Zunächst wurde das Photometer gegen destilliertes Wasser abgeglichen. Anschließend wurde die gleiche Küvette mit 1ml der Reaktionslösung befüllt und deren Absorption gegen Aqua ad injectabilia (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) bestimmt. Betrug diese weniger als 0.08, erfolgte ein Abgleich des Photometers gegen die Reaktionslösung.

Danach wurde zu 1 ml Reaktionslösung 10 µl Dialysat zugegeben. Nach Durchmischung, einer 10-minütigen Inkubation unter Lichtabschluss, erfolgte die photometrische Bestimmung der Laktatkonzentration.

2.5 Gasanalyse von pH und pCO₂

In den Versuchen wurde die Sonde Paratrend® 7^{FL} (MPS7004S) (Diametrics Medical Inc., High Wycombe, Buckinghamshire, HP13 5RE, England) zur kontinuierlichen Messung des Gewebe-pO₂, -pCO₂ und -pH verwendet. Der Messbereich an der Spitze der Sonde ist 23 mm lang und hat einen maximalen Durchmesser von 0,5 mm. Die Messbereiche erstrecken sich für den pH-Wert von 6.8 bis 7.8, für den pCO₂-Wert von 10 bis 160 mmHg und für den pO₂-Wert von 20 bis 500 mmHg.

Vor dem Einsatz der Sonde erfolgte eine automatisierte Kalibrierung zur Ermittlung des individuellen Ansprechverhaltens durch Begasung mit bekannten CO₂- und O₂ - Konzentrationen.

Bei mehrmaliger Verwendung erfolgte eine Desinfektion mit 80%igem Alkohol und Aufbewahrung in 0,9 %iger NaCl-Lösung. Da die Sonde zudem bei längerem Gebrauch eine Drift aufweist, wurde ein manueller Abgleich auf physiologische Werte von 45 mmHg pCO₂, 70 mmHg pO₂ und 7.4 pH durchgeführt.

Parallel zur Paratrend[®]-Sonde wurde ein PE10-Schlauch (\varnothing 0,2 mm I.D, Totraum 20 μ l) so befestigt, dass sich das Ende des Zuspritzkanals in der Mitte der Messmembran befand (~ 10 mm von der Spitze der Sonde).

2.6 Versuchsdurchführung

2.6.1 Prämedikation und Narkose

Die Prämedikation wurde gewichtsadaptiert mit Azaperon 3 mg/kg, Ketamin 3–5 mg/kg und Midazolam 0,15 mg/kg über eine Butterfly-Kanüle als i.m. Injektion durchgeführt. Das Tier wurde hierdurch innerhalb von 5 – 10 min sediert und bekam einen intravenösen Katheter in eine Ohrvene gelegt. Nach Transport in den Großtier-Op wurde die Narkose mit einer Bolusgabe von 4 – 5 mg/kg/KG Propofol eingeleitet. Das Schwein wurde daraufhin intubiert und mit einem Lachgas / Sauerstoffgemisch von 3 l/min bei einem FiO_2 von 0.3 beatmet. Der endtidale pCO_2 wurde auf 35 mmHg eingestellt und über einen pO_2 von >90 mmHg eine ausreichende Oxygenierung gewährleistet. Intraoperativ wurde Flüssigkeit in Form von 6 – 8 ml/kg/KG/h Ringer-Laktat-Lösung zugeführt. Die Körpertemperatur wurde durch eine Infrarotlampe und eine Wärmedecke im Normbereich gehalten. Über einen Propofol-Perfusor wurde die Narkose in einer Dosierung von 0,2 - 0,3 mg/kg/KG/min aufrechterhalten und bei Bedarf durch Bolusinjektionen von 30 - 60 μ g/kg/KG Alfentanil ergänzt. Zur Beendigung der Narkose wurde die kontinuierliche Propofolzufuhr gestoppt und gegebenenfalls eine Antagonisierung des Alfentanils mit 0,1 - 0,4 mg Naloxon durchgeführt. Dieses Vorgehen wurde je Tier 6-mal im Abstand von 1-3 Tagen wiederholt.

2.6.2 Systemische Parameter und Monitoring

Im Rahmen der Narkose wurde ein komplettes Monitoring der Versuchstiere durchgeführt. Die Messwerte wurden in 5-minütigen Intervallen in einem Versuchsprotokoll notiert bzw. über einen Computer kontinuierlich erfasst. Die Überwachung der Körperfunktionen beinhaltete die Messung der Körpertemperatur, EKG-Ableitung, Pulsoxymetrie, Kapnographie, sowie die Messung des arteriellen Mitteldrucks über einen arteriellen Zugang in der A. saphena. Über diesen Zugang erfolgten sowohl vor, als auch nach jedem Versuch Blutabnahmen. Im Serum der Versuchstiere wurde insbesondere Wert auf die Bestimmung der CK, sowie des Laktatspiegels gelegt. Daneben wurde zu Beginn und nach Ende des Protokolls eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt.

2.6.3 Versuchsanordnung und Versuchsprotokolle

Die Versuchstiere wurden auf dem Rücken gelagert und zur Vermeidung von einer Dislokation der Messsonden an Vorder- und Hinterläufen fixiert.

Es wurden jeweils die Mikrodialyse-Kontrollsonde und die Mikrodialyse-Koffein-Sonde auf einer, die Mikrodialyse-Halothan-Sonde und die Paratrend[®]-Sonde auf der kontralateralen Seite eingebracht. Die Seiten wurden bei aufeinander folgenden Versuchen gewechselt. Der Abstand zwischen den Sonden betrug mehr als 4 cm zur Vermeidung einer gegenseitigen Beeinflussung.

2.6.3.1 Laktat-Mikrodialyse: Kontrollsonde

Nach Desinfektion des Versuchsgebiets wurde über eine 16G Kanüle die Kontrollsonde in die Adduktorenmuskulatur eingebracht. Die Kanüle wurde daraufhin zurückgezogen, so dass die Mikrodialysemembran mit der ganzen Länge im Muskel zum Liegen kam.

Nach Konnektion an die Mikrodialysepumpe und einer Äquilibrationsphase von mindestens 30 min wurde mit dem Sammeln der Proben begonnen. Es

wurde mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einem Sammelintervall von 15 min gearbeitet.

Die Kontrollsonde lieferte zeitgleiche Basiswerte ohne Stimulation sowohl für die Koffein- als auch für die Halothan-Mikrodialysesonden.

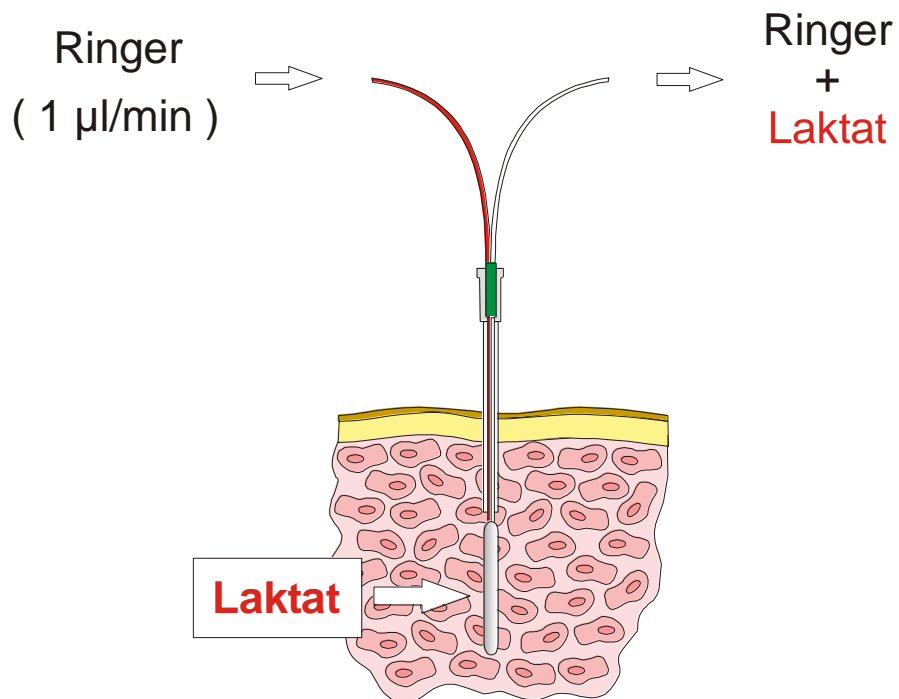


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Mikrodialyse-Kontrollsonde. Das unter Ruhebedingung im Muskel gebildete Laktat wird über die Mikrodialysesonde herausdialysiert.

2.6.3.2 Laktat-Mikrodialyse: Halothanmesssonde

Die Halothan-Messsonde wurde mit der Applikationssonde am Schaft verbunden und über eine 14G Kanüle gemäß dem vorbeschriebenen Procedere gemeinsam in die Adduktorenmuskulatur eingebracht.

2.6.3.2.1 Halothan 10% in Fettemulsion

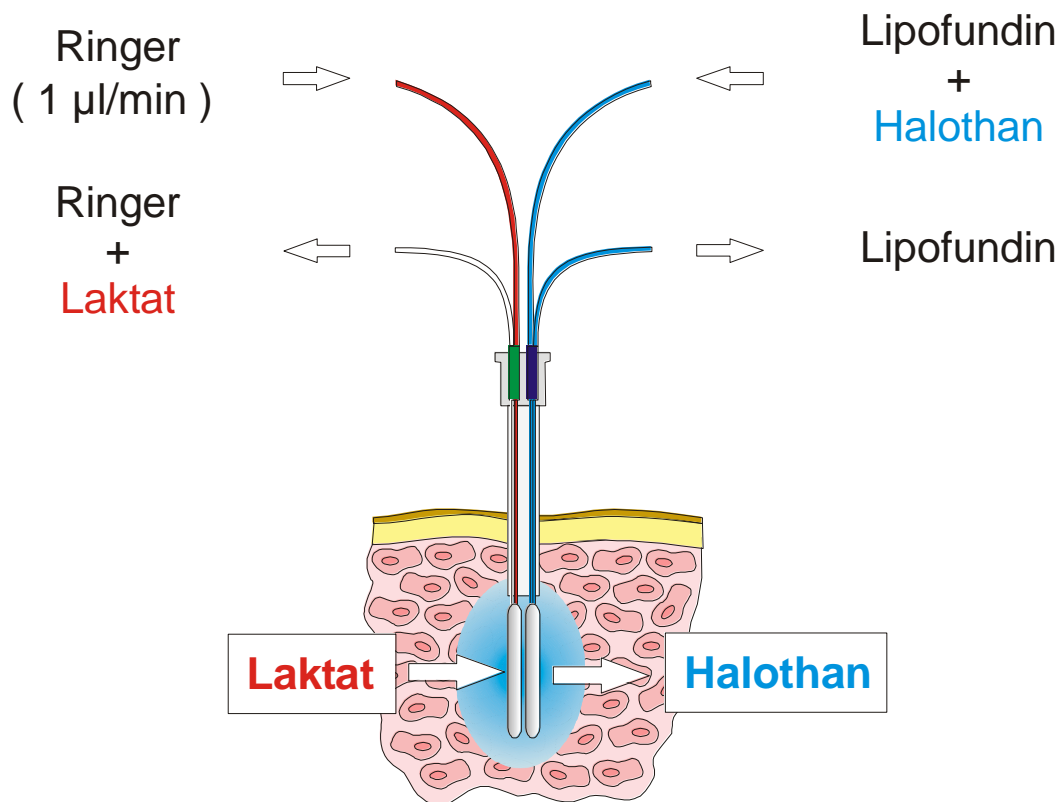


Abb. 2-2: Schematische Darstellung des Mikrodialyse - Versuchsaufbaus zur Stimulation mit in Lipofundin gelöstem Halothan, welches über die Stimulationssonde (blau) in den Muskel diffundiert. Das im Muskel gebildete Laktat wird über die Messsonde (rot) herausdialysiert.

Das Protokoll wurde in unveränderter Form in allen Versuchen der Tiere MHS 1-4 und MHN 1-3 angewandt.

Mittels einer Mikrodialyse-sonde wird in Fettlösung befindliches Halothan in das Muskelgewebe transportiert. Über die Membran kann Halothan in den Muskel diffundieren und so als Trigger in unmittelbarer Nähe der Applikationssonde wirken. Um dem Abdiffundieren des Halothans in das Gewebe Rechnung zu tragen, wurde die Stimulationssonde mit der Halothan-Fettlösung perfundiert. Auf Grund der Gewebeeigenschaften ist von einem Diffusionsradius von weniger als 2 cm auszugehen.

Nach Einbringen der Sonden wurde zunächst nur die Halothan-Messsonde mit Ringerlösung bei einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert. Nach Äquilibrium wurden 2 Ruhewerte gemessen. Unmittelbar vor Beginn der Stimulation wurde die Halothan-Fett-Lösung in eine Mikrodialysespritze aufgezogen und die Halothan-Stimulationssonde mit einer konstanten Geschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert. Das Dialysat der Halothan-Messsonde unter Stimulation wurde über mindestens 90 min (6 Sammelintervalle) aufgefangen.

2.6.3.3 Laktat-Mikrodialyse: Koffeinmesssonde

Über eine 16 G Kanüle wurde die Koffein-Messsonde mit Injektionsschlauch in die Adduktorenmuskulatur der Versuchstiere eingebracht.

2.6.3.3.1 Vorversuch 1: Injektion verschiedener Volumina von Koffein 20 mM

Dieses Protokoll wurde bei den Schweinen MHS 1 (Versuch 1-3) und MHS 2 (Versuch 2-3) angewandt. Bei diesem ersten Koffeinprotokoll wurde eine Dosierung über die Menge an appliziertem 20 mM Koffein erreicht.

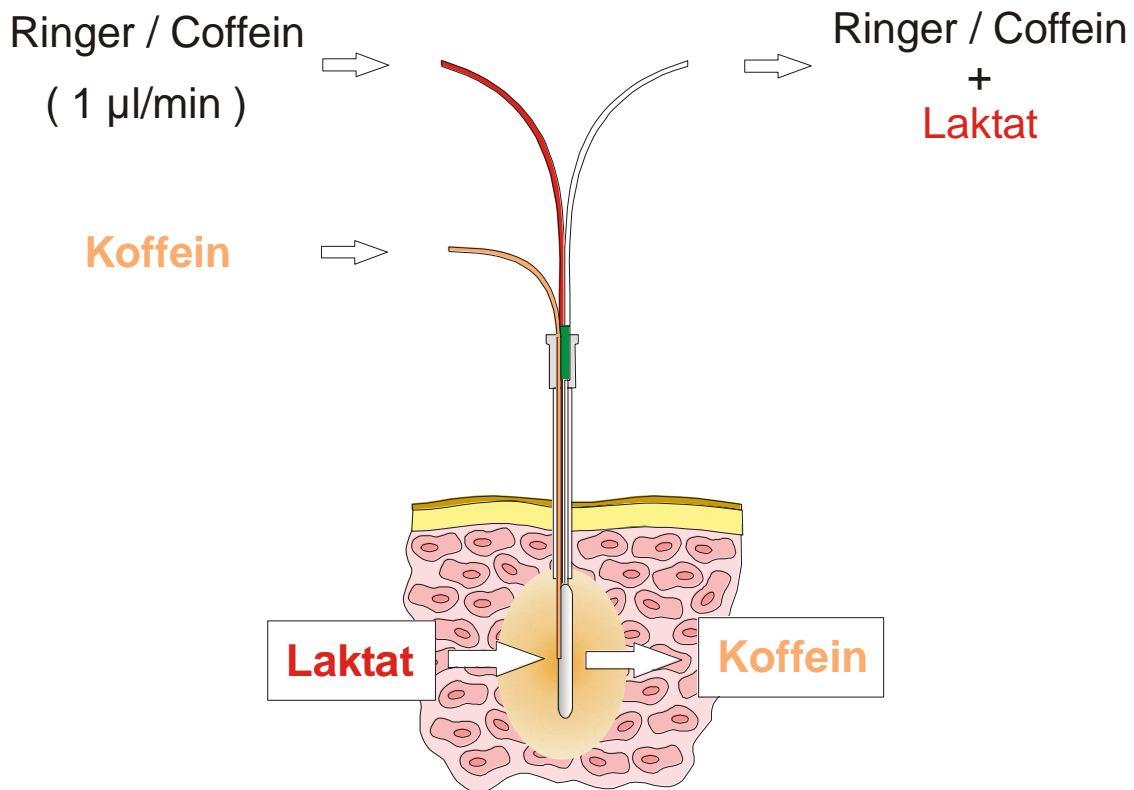


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des Mikro dialyse-Versuchsaufbaus zur Stimulation mit Koffein, welches über einen an der Messsonde (rot) befestigten PE-Schlauch in den Muskel gespritzt wird.

Die Mikro dialysesonde wurde dabei mit 20 mM Koffeinlösung bei einer Geschwindigkeit von 1 µl/min perfundiert, um ein Auswaschen bzw. eine Rückdiffusion des zugespritzten Koffeins zu verhindern. Aus vorangegangenen Arbeiten an Ratten war bekannt, dass es hierdurch nicht zu einer ausreichenden Diffusion von Koffein in den Muskel kommt, um einen Effekt zu erzielen.

Nach Äquilibrierungsphase und Ermittlung von 2 Ruhelaktatwerte wurde mit der Stimulation begonnen. Die Applikation des Koffeins erfolgte durch eine Mikro dialysepumpe mit einer konstanten Geschwindigkeit von 100 µl/min. Im ersten Bolus wurde 50 µl (+20 µl Totraum) 20 mM Koffein zugegeben und das Dialysat der Koffeinmesssonde über 2 Messintervalle gesammelt. Der zweite Bolus umfasste 100 µl, der dritte 200 µl und der vierte 400 µl 20 mM Koffein. Diese wurden in analoger Weise appliziert und anschließend jeweils 2 Mikro dialyseproben gesammelt.

2.6.3.3.2 Vorversuch 2: *Injektion verschiedener Volumina von Koffein 80 mM*

Analog zum ersten Protokoll wurde die Mikrodialyse-sonde mit 80 mM Koffein in Ringerlösung und mit 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert.

Nach Äquilibration und Ermittlung von 2 Ruhewerten wurde über den PE10 Schlauch mittels einer Mikrodialysepumpe und einer Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ Boli von 50 μl , 100 μl , 200 μl und 400 μl 80 mM Koffein in den Muskel injiziert. Nach jedem Bolus wurde das Dialysat über 2 Messintervalle aufgefangen.

2.6.3.3.3 Hauptversuch: *Injektion verschiedener Konzentrationen von 100 μl Koffein*

Das Protokoll der Hauptversuche der Mikrodialysemessung unter Koffeinstimulation wurde bei den Versuchstieren MHS 3 (Versuch 1-6), MHS 4 (Versuch 1-6), MHN 1 (Versuch 1-6), MHN 2 (Versuch 1-6) und MHN 3 (Versuch 1-6) angewandt.

Die Dosierung erfolgte über die Konzentration des zugespritzten Koffeins bei einem konstanten Bolusvolumen von 100 μl .

Nach Einbringen der Koffein-Mikrodialyse-sonde wurde diese zunächst mit Ringerlösung perfundiert, um eine Reaktion durch aus der Perfusionsflüssigkeit diffundierendes Koffein zu vermeiden.

Nach Äquilibration und Ermittlung von 2 Ruhelaktatwerten wurde die Perfusion der Koffein-Mikrodialyse-sonde auf 80 mM Koffein umgestellt, um eine Rückdiffusion des zugespritzten Koffeins zu verhindern. Zeitgleich wurde manuell der erste Bolus von 100 μl Koffein 10 mM über den PE10 Schlauch appliziert. In analoger Weise wurden beim zweiten Bolus 100 μl 20 mM und beim dritten 100 μl Koffein 40 mM zugespritzt. Im Anschluss an jede Bolusgabe wurde das Dialysat der Koffeinmesssonde über 2 Sammelintervalle aufgefangen.

2.6.3.4 Gewebe-pCO₂ und -pH unter Koffeinstimulation

Über eine 16 G Venenverweilkanüle wurde die Paratrend[®]-Sonde in die Adduktorenmuskulatur eingebracht, so dass sich die Sonde mit der ganzen Länge der Messmembran sicher im Muskel befand. Das Gebiet über dem Versuchsmuskel wurde mit einem Tuch abgedeckt, um Störungen der photometrischen Messung zu vermeiden. Es schloss sich eine Äquilibrierungsphase von 30-45 min an, bis die Sonde über 10 min konstante Werte lieferte. Danach wurde mit den jeweiligen Versuchsprotokollen begonnen. Die gemessenen Daten für pH, pCO₂, pO₂ und Temperatur, sowie die durch das Patientenmodul errechneten Werte für HCO₃⁻, BE und O₂-Sättigung, wurden über einen Computer in 1-minütigen Intervallen erfasst. Aufgezeichnet wurden die Original-Werte und die Werte nach manueller Kalibrierung der Sonde.

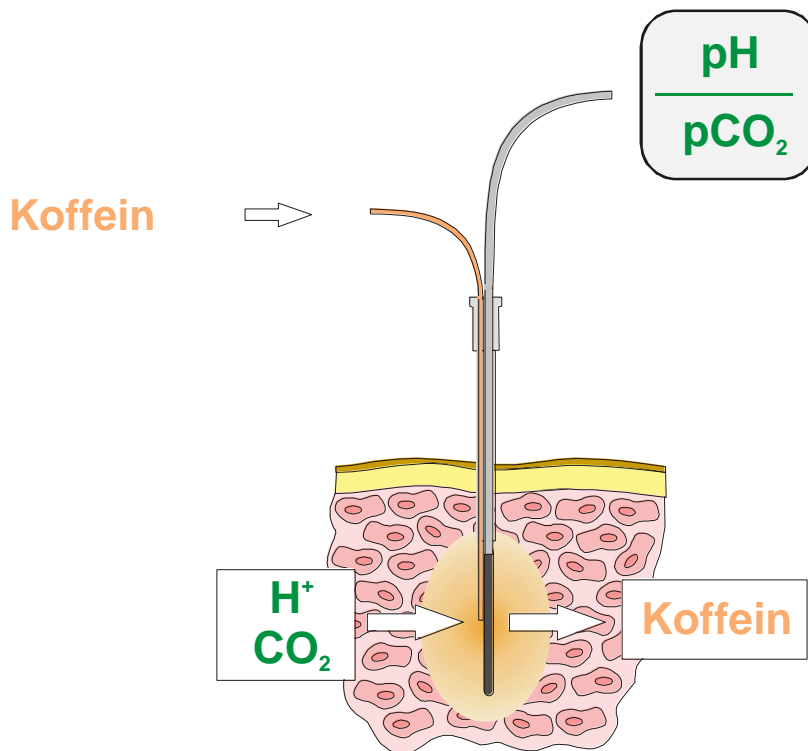


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Gewebepartialdruckmessung. Koffein wird über einen an der Messsonde befestigten PE10-Schlauch in den Muskel eingebracht.

2.6.3.4.1 Vorversuch: Injektion verschiedener Volumina von Koffein 20 mM

Das erste Protokoll für die Applikation von Koffein an die Paratrend[®]-Sonde wurde lediglich bei den Versuchstieren MHS 1 (Versuch 1-6) und MHS 2 (Versuch 2-6) verwendet. Die Dosierung erfolgte dabei über eine stufenweise Steigerung des Volumens an zugegebenem 20 mM Koffein.

Nach Äquilibration und Messung konstanter Werte über 10 min, wurde 20 mM Koffein im Abstand von 30 min mit 50, 100, 200 und 400 µl mit einer Geschwindigkeit von 100 µl/min injiziert.

2.6.3.4.2 Hauptversuch: Injektion verschiedener Konzentrationen von 100 µl Koffein

Das zweite Protokoll wurde bei den Versuchstieren MHS 3 (Versuch 1-6), MHS 4 (Versuch 2-5), MHN 1 (Versuch 2-6), MHN 2 (Versuch 1-6) und MHN 3 (Versuch 1-6) angewandt. Die Dosierung erfolgte dabei durch eine stufenweise Steigerung der Koffein-Konzentration bei konstantem Bolusvolumen.

Nach Einbringen der Paratrend[®]-Sonde und Äquilibration erfolgte ein manueller Abgleich der pH- und pCO₂-Messwerte. Danach wurden nochmals für 10 min konstante Ausgangsbedingungen dokumentiert.

Im Abstand von 30 min wurden jeweils 100 µl mit Koffeinkonzentrationen von 2, 5, 10 und 20 mM manuell appliziert.

2.6.4 Auslösen einer MH-Krise

Am Ende jeder Versuchsserie wurde im Anschluss an den 6. Versuch eine MH-Krise induziert. Dieses Vorgehen wurde sowohl auf die Gruppe der MHS- als auch die der MHN-Tiere angewandt. Es sollten systemische und lokale Veränderungen einer generalisierten MH-Reaktion im zeitlichen Zusammenhang dargestellt werden.

In der ersten und zweiten Serie mit den Tieren MHS 1, MHS 2 und MHN 1, wurde zunächst ein geeignetes Protokoll mit unterschiedlichen Halothankonzentrationen sowie Steigerungsintervallen erarbeitet.

Das resultierende Protokoll wurde einheitlich zur Durchführung der MH-Krise bei den Tieren MHS 3, MHS 4, MHN 2 und MHN 3 angewandt und ausgewertet. Nach Einbringen und Äquilibration der Kontroll-Mikrodialyse-sonde wurden Proben bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ und einem Sammelintervall von 7,5 min gewonnen. Die Paratrend[®]-Sonde wurde ebenfalls neu eingelegt, äquilibriert und abgeglichen. Es wurden die Werte für Temperatur, Herzfrequenz, arterieller Mitteldruck, O₂-Sättigung sowie endexpiratorisches CO₂ in 5-minütigen Intervallen notiert. In 15-minütigen Intervallen erfolgten Blutentnahmen zur Bestimmung der CK, des Laktats sowie zur Blutgasanalyse. Zu Beginn der MH-Krisen wurde die Narkose von der kontinuierlichen i.v. Propofol- auf eine Halothan-Inhalations-Narkose umgestellt und eine endexpiratorische Halothankonzentration von 0,5 Vol% angestrebt. Die endexpiratorische Halothankonzentration wurde im Folgenden alle 30 min um 0,5 Vol% gesteigert. 15 min nach Beginn des Versuches wurde in 15-minütigen Intervallen Succinylcholin in einer Dosierung von 3 mg/kg/KG injiziert.

Bei MHS-Tieren wurde diese Steigerung bis zum Eintritt einer manifesten MH-Krise durchgeführt. Bei den MHN-Tieren wurde bis zu einer endexpiratorischen Halothankonzentration von 1,5%, welche über 30 min aufrechterhalten wurde, gesteigert.

Im Anschluss wurden die Tiere durch eine i.v.-Injektion eines Lokalanästhetikums und Barbiturates getötet.

2.6.5 Histologische Auswertung

Zur Abschätzung des Ausmaßes der zellulären Schädigung durch die Applikation von Triggersubstanzen direkt in den Muskel, wurde nach Beendigung der Versuchsserie eine histologische Untersuchung zur Beurteilung der Invasivität des Verfahrens sowie der Schädigung des Versuchsmuskels durchgeführt.

Zur Markierung wurden kleinste Mengen Tusche unterschiedlicher Farbe, entsprechend der jeweiligen Sonde, über die Führungskanüle in den Muskel injiziert. Nach Abschluss der einzelnen Serie wurden die Versuchsmuskeln auf beiden Seiten en bloc reseziert, in Formalin fixiert und zur Begutachtung in das pathologische Institut der Universität Würzburg verbracht.

Bei der Aufarbeitung der Präparate zeigte sich, dass die Tusche relativ weit im Muskel verlaufen war und eine Zuordnung einzelner Muskelstellen zu einem Protokoll nur bedingt möglich war. Sicher zu identifizierende Injektionsstellen wurden in Paraffin gebettet, geschnitten, HE-gefärbt und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie beurteilt. Durch dieses Vorgehen konnten zumindest globale Aussagen über die im Rahmen der Versuche eingetretenen Muskelschädigungen getroffen werden.

2.6.6 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Auf Grund der geringen Fallzahl unabhängiger Versuche in dieser Pilotstudie wurde auf eine statistische Analyse verzichtet. Die Ergebnisse jedes Versuches werden einzeln dargestellt und diskutiert. Die Werte werden, sofern nicht anders indiziert, als Median mit der Interquartilenspanne (25% - 75% Median) als Streuungsparameter angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Laktat-Mikrodialyse unter Halothan-Stimulation

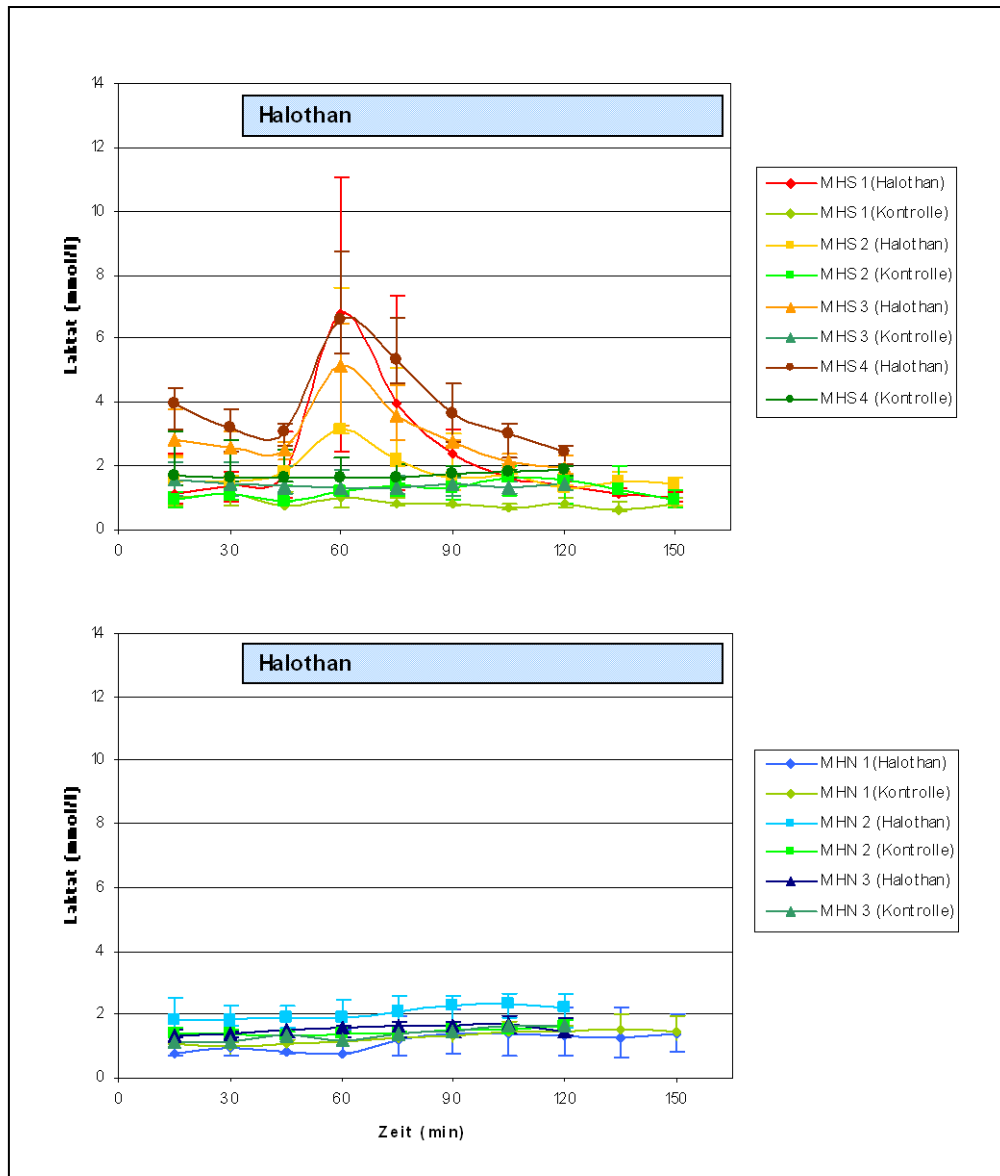


Abb. 3-1: Mittels Mikrodialyse ermittelte intramuskuläre Laktatkonzentrationen mit und ohne Stimulation mit Halothan 10 Vol% gelöst in Sojabohnenöl bei MHS- (oben) und MHN-Tieren (unten).

Für die Versuche der MHS - Tiere ergaben sich in diesem Versuchsprotokoll Ruhelaktatwerte von 1.4 - 3.2 mmol/l. Unter Applikation von Halothan über die Stimulationssonde konnte bei Tieren mit Veranlagung für das „porcine-stress-syndrom“ nach 60 min ein Maximum von 3.1 - 6.8 mmol/l ermittelt werden. Bis zum Ende des Versuches unter fortdauernder Stimulation fielen die Laktatspiegel im Muskel wieder auf Werte von 1.3 - 2.5 mmol/l. Die ermittelten Laktatwerte ohne Stimulation schwankten in der Gruppe der Anlageträger zwischen 1.3 - 1.9 mmol/l.

Die über die Halothan-Messsonde ermittelten Basalwerte der MHN-Tiere lagen bei 0.9 - 1.8 mmol/l. Unter Stimulation mit Halothan stieg der mediane Laktatspiegel im Sinne eines Maximums nicht an. Die Werte schwankten dabei in der Gruppe der Nicht-Anlageträger zwischen 0.8 - 2.3 mmol/l. Über die Kontrollsonde wurden zeitgleich Werte ermittelt, welche von 1.0 - 1.6 mmol/l schwankten.

3.2 Laktat-Mikrodialyse unter Koffein-Stimulation

3.2.1 Vorversuch 1: Injektion von Koffein 20 mM mit 50, 100, 200 und 400 µl

Dieses Protokoll wurde bei den Schweinen MHS 1 (Versuch 1-3) und MHS 2 (Versuch 2 und 3) angewandt.

Unter Stimulation konnte bei Ausgangslaktatwerten zwischen 0.6 - 1.7 mmol/l in 3 Versuchen ein Anstieg der Laktatkonzentration auf Werte zwischen 3.9 - 4.5 mmol/l nach 60 bzw. 75 min gesehen werden. Im Anschluss fielen die Werte trotz weiterer Bolusapplikation auf das Ausgangsniveau ab.

Die korrespondierenden Kontrollwerte lagen zwischen 0.6 - 2.0 mmol/l.

3.2.2 Vorversuch 2: Injektion von 80 mM Koffein mit 50, 100, 200 und 400 μ l

Dieses Protokoll wurde bei den Tieren MHS 1 (Versuch 4-6) und MHS 2 (Versuch 4-6) eingesetzt.

Nach Äquilibration auf Laktatwerte zwischen 1.2 – 2.2 mmol/l konnte in 4 Versuchen nach 60 min ein Maximum zwischen 3.7 und 10.2 mmol/l mit anschließendem Abfall auf das Ausgangsniveau unter weiterer Bolusgabe gesehen werden. Bei 2 Versuchen fehlte ein Laktatanstieg. Die Ruhewerte schwankten zwischen 0.7 und 2.5 mmol/l.

3.2.3 Hauptversuch: Injektion von 100 μ l Koffein mit 10, 20 und 40 mM

Nach zwei Ruhewerten bei 15 und 30 min wurden jeweils 100 μ l Koffein-Boli in ansteigender Konzentration von 10 mM (30min), 20 mM (60 min) und 40 mM (90 min) injiziert. Dieses Protokoll wurde bei den Tieren MHS 3 (Versuch 1-6), MHS 4 (Versuch 1-6), MHN 1 (Versuch 2-6), MHN 2 (Versuch 1-6) und MHN 3 (Versuch 1-6) angewandt.

Für die Tiere MHS 3 und MHS 4 ergaben sich Ausgangswerte ausgehend zwischen 2.3 – 4.0 mmol/l. In den Versuchen MHN 3 fand sich kein eindeutiges Maximum, wohingegen in den Versuchen MHN 4 ausgehend von 2.4 mmol/l (30 min) kleinere Maxima von 2.9 mmol/l (60 min), 2.8 mmol/l (90 min) und 2.8 mmol/l (120 min) festgestellt werden konnten. Dazwischen fiel die Laktatkonzentration auf Werte von 2.3 mmol/l (75 min) und 2.1 mmol/l (105 min). Die Mediane der Kontrollwerte schwankten zwischen 1.3–1.9 mmol/l.

Die Ruhelaktatwerte der Versuchstiere MHN 1, MHN 2 und MHN3 äquilibrierten über die Koffein-Sonde auf Werte von 0.8 – 1.2 mmol/l. Sie schwankten dabei unter Stimulation mit Koffein zwischen 0.6 – 1.4 mmol/l und lagen im Bereich der über die Kontrollsonde gemessenen Laktatwerte von 1.1– 1.6 mmol/l.

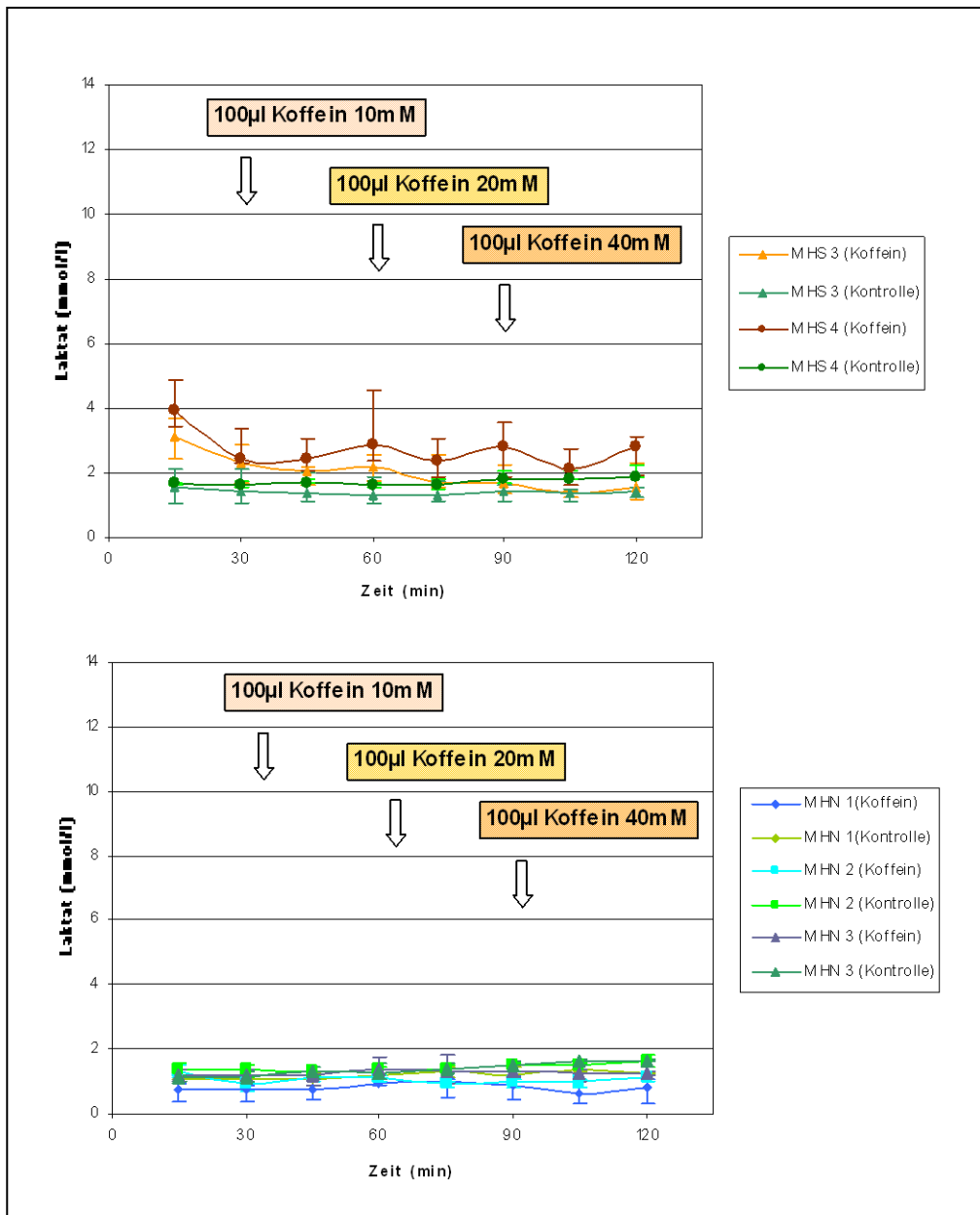


Abb. 3-2: Mittels Mikrodialyse ermittelte intramuskuläre Laktatkonzentrationen mit und ohne Stimulation mit 100 µl Koffein steigender Konzentration (10 mM, 20 mM, 40 mM) bei MHS- (oben) und MHN-Tieren (unten).

3.3 Gewebe - pH und pCO₂ unter Koffein-Stimulation

3.3.1 Vorversuch: Injektion von 20 mM Koffein mit 50, 100, 200 und 400 µl

3.3.1.1 pH

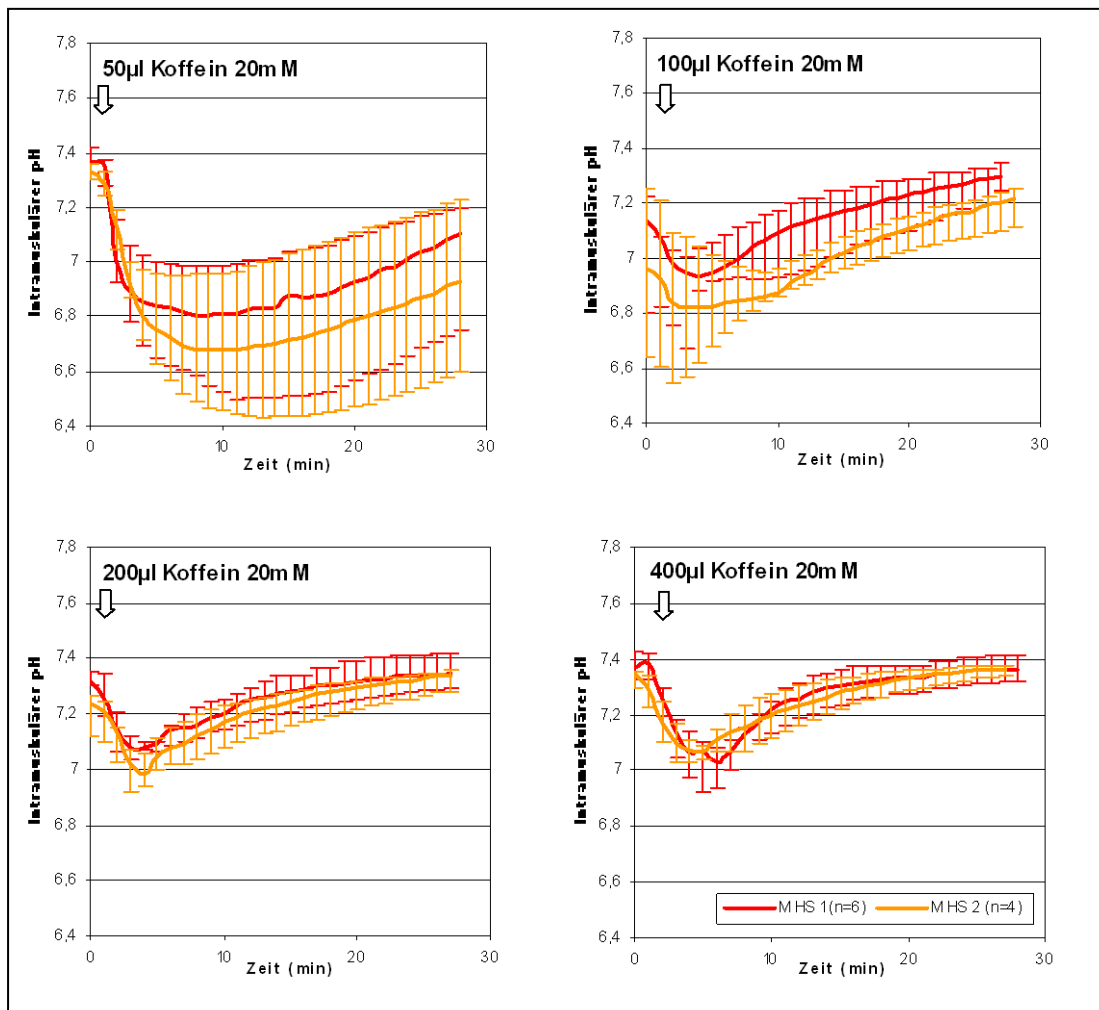


Abb. 3-3: Mittels Gewebe-pH-Messung ermittelter intramuskulärer pH-Verlauf bei zwei MHS-Tieren nach Applikation von Koffein 20 mM ansteigender Volumina (50 µl [oben links], 100 µl [oben rechts], 200 µl [unten links], 400 µl [unten rechts])

Bei der Betrachtung der pH-Werte zeigte sich nach dem initialen Bolus von 50 μl Koffein 20 mM ein ausgeprägter Abfall des Gewebe-pH-Wertes auf minimale Werte von 6.81 bzw. 6.68 jeweils 8 min nach Injektion, ohne vollständige Normalisierung nach 30 min. Die folgenden Applikationen von 100 μl , 200 μl und 400 μl Koffein 20 mM zeigten zwar ebenfalls ein Absinken des Gewebe-pH-Wertes, welcher mit steigendem Volumen geringer wurde (Minima 100 μl : 6.94 bzw. 6.82, 200 μl : 7.08 bzw. 6.99 und 400 μl : 7.04 bzw. 7.07). Darüber hinaus zeigte sich mit steigendem Bolusvolumen eine zunehmende Normalisierung der Gewebe-pH-Werte am Ende des Messintervalls.

3.3.1.2 pCO₂

Die pCO₂-Werte zeigten ein ähnliches Verhalten wie die pH-Werte. Nach der Applikation des ersten Bolus mit 50 μl Koffein 20 mM fand sich ein deutlicher Anstieg des Gewebe-pCO₂ bei medianen Ausgangswerten von 60.5 mmHg bzw. 58.8 mmHg auf 109.5 mmHg bzw. 106.7 mmHg 6 min nach Injektion. Auch hier kam es nicht zu einer vollständigen Normalisierung des Gewebe-pCO₂ am Ende des 30minütigen Messintervalls. Unter der Applikation steigender Bolusvolumina des 20 mM Koffeins zeigte sich ein geringerer Anstieg des Gewebe-pCO₂ über den Ausgangswert (Maxima 100 μl : 79.8 mmHg bzw. 81.1 mmHg, 200 μl : 64.7 mmHg bzw. 65.7 mmHg, 400 μl : 64.7 mmHg bzw. 65.7 mmHg). Daneben kommt es mit zunehmendem Volumen des Bolus zu einem stärkeren initialem Abfall des pCO₂ nach Applikation (50 μl : 42.7 mmHg bzw. 56.4 mmHg, 100 μl : 39.8 mmHg bzw. 37.4 mmHg, 200 μl : 23.0 mmHg bzw. 27.4 mmHg, 400 μl : 13.4 mmHg bzw. 17.0 mmHg).

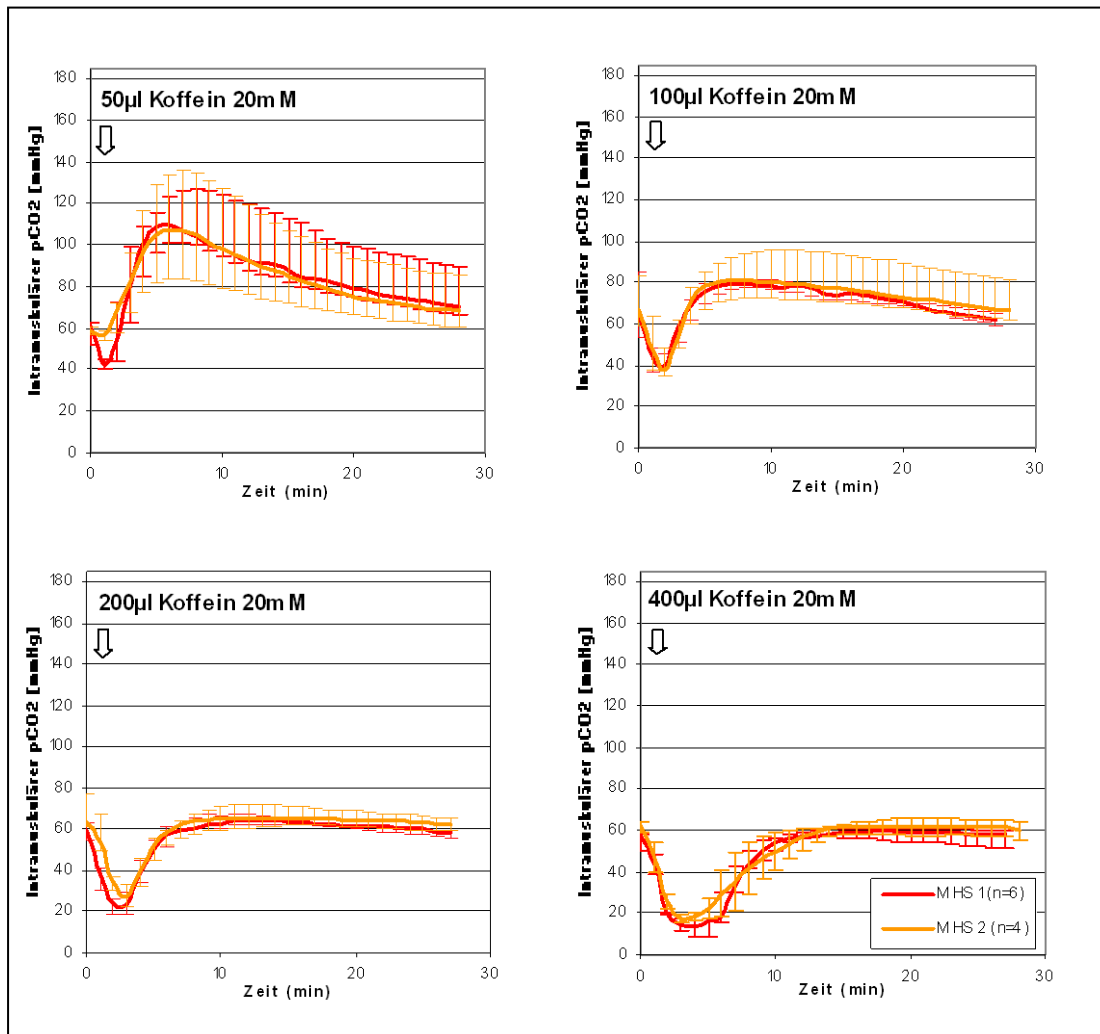


Abb. 3-4: Mittels Gewebe-pCO₂-Messung ermittelter intramuskulärer pCO₂-Verlauf bei zwei MHS-Tieren nach Applikation von Koffein 20 mM ansteigender Volumina (50 µl [oben links], 100 µl [oben rechts], 200 µl [unten links], 400 µl [unten rechts]).

3.3.2 Hauptversuch: Injektion von 100 μ l Koffein mit 2, 5, 10 und 20 mM

3.3.2.1 pH

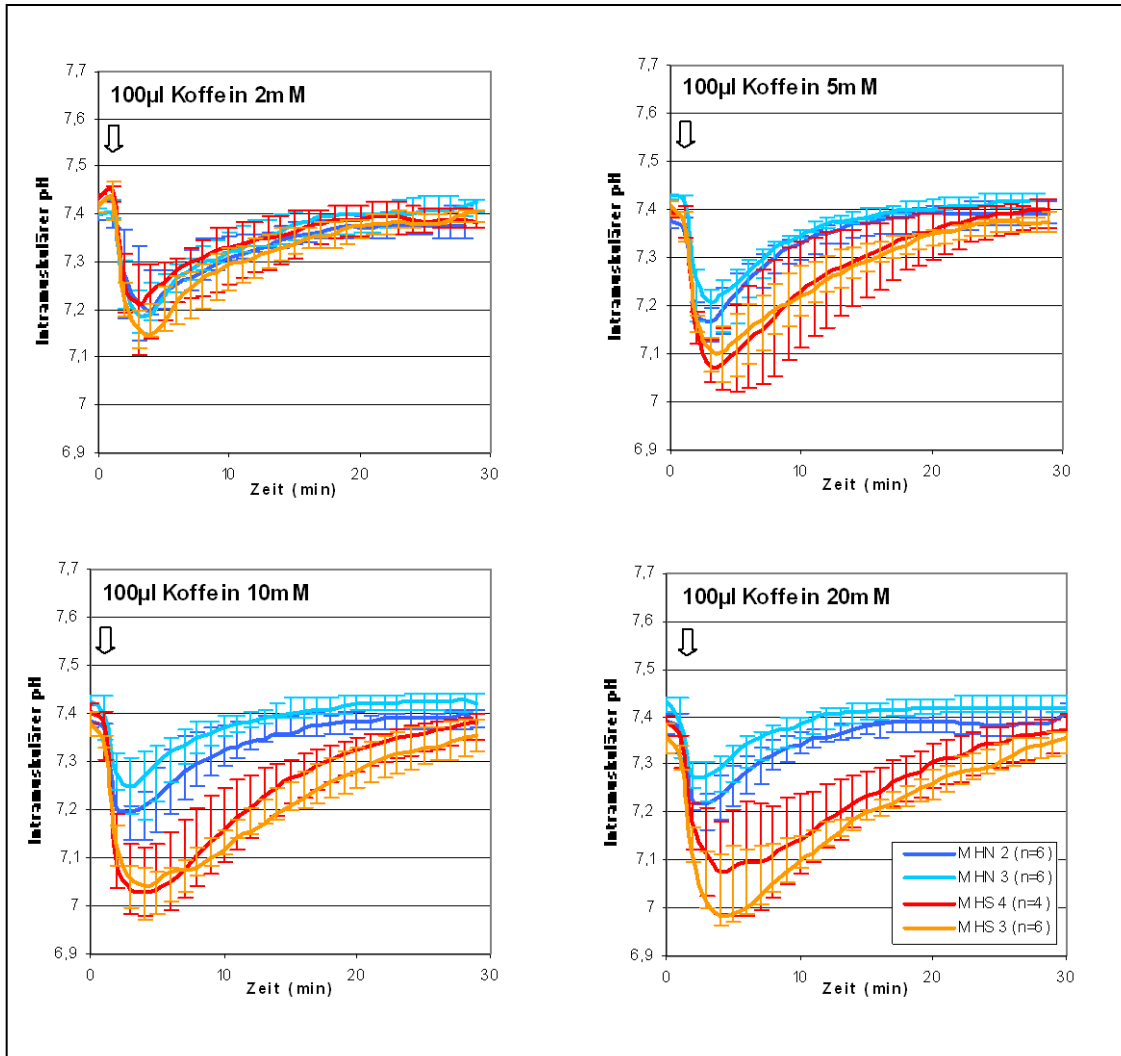


Abb. 3-5: Mittels Gewebe-pH-Messung ermittelter intramuskulärer pH-Verlauf bei MHS (rot) – und MHN (blau) - Tieren nach Applikation von 100 μ l Koffein ansteigender Konzentration (2 mM [oben links], 5 mM [oben rechts], 10 mM [unten links], 20 mM [unten rechts]).

Die Messung des Gewebe-pH unter diesem Protokoll zeigt, dass in der Gruppe der MHS-Tiere (MHS 3 und MHS 4) mit steigender Koffeinkonzentration ein zunehmender Abfall der pH-Werte zu beobachten ist (2 mM: 7.15 bzw. 7.21, 5 mM: 7.11 bzw. 7.08, 10 mM: 7.04 bzw. 7.03, 20 mM: 6.99 bzw. 7.08). Die minimalen pH-Werte werden dabei zwischen 3 und 5 min nach Applikation des Bolus gemessen. Abhängig vom Ausmaß des pH-Abfalls dauert es länger, bis sich der Gewebe-pH normalisiert. Die Ausgangswerte werden jedoch am Ende des Messintervalls von 30 min wieder erreicht.

In der Gruppe der MHN-Tiere (MHN 2 und MHN 3) konnte mit ansteigender Konzentration des Koffeinbolus kein zunehmender Abfall der medianen Werte für den Gewebe-pH beobachtet werden (2 mM: 7.20 bzw. 7.19, 5 mM: 7.17 bzw. 7.21, 10 mM: 7.20 bzw. 7.25, 20 mM: 7.22 bzw. 7.28).

3.3.2.2 pCO₂

In der Gruppe der MHS-Tiere zeigte sich, dass ab einer Koffein-Dosierung von 5mM bei konstantem Bolusvolumen von 100 µl ein zunehmender Anstieg des Gewebe-pCO₂ über das Ausgangsniveau mit Erreichen eines Maximums zu beobachten ist (5 mM: 49.4 mmHg bzw. 52.2 mmHg, 10 mM: 58.1 mmHg bzw. 54.4 mmHg, 20 mM: 64.1 bzw. 65.3 mmHg). Der maximale Wert wurde mit jedem Bolus früher erreicht (5 mM: 12 bzw. 15 min, 10 mM: 8 bzw. 12 min, 20 mM: 9 bzw. 7 min). Der Gewebe-pCO₂ normalisiert sich mit zunehmender Konzentration des Koffeinbolus am Ende des 30minütigen Messintervalls immer unvollständiger. Nach Gabe des 2 mM Koffeinbolus konnte kein Anstieg des pCO₂ über das Ausgangsniveau festgestellt werden.

Die Werte der MHN-Tiere (MHN 2 und MHN 3) erbrachten bei keiner Koffeinkonzentration einen Anstieg des Gewebe-pCO₂ über das Ausgangsniveau.

Sowohl in der Gruppe der MHS- als auch der MHN-Tiere konnte 1 - 2 min nach Applikation des Bolus ein Abfall des pCO₂ auf Werte zwischen 26.2 – 37.6 bzw. 25.4 – 30.8 mmHg registriert werden.

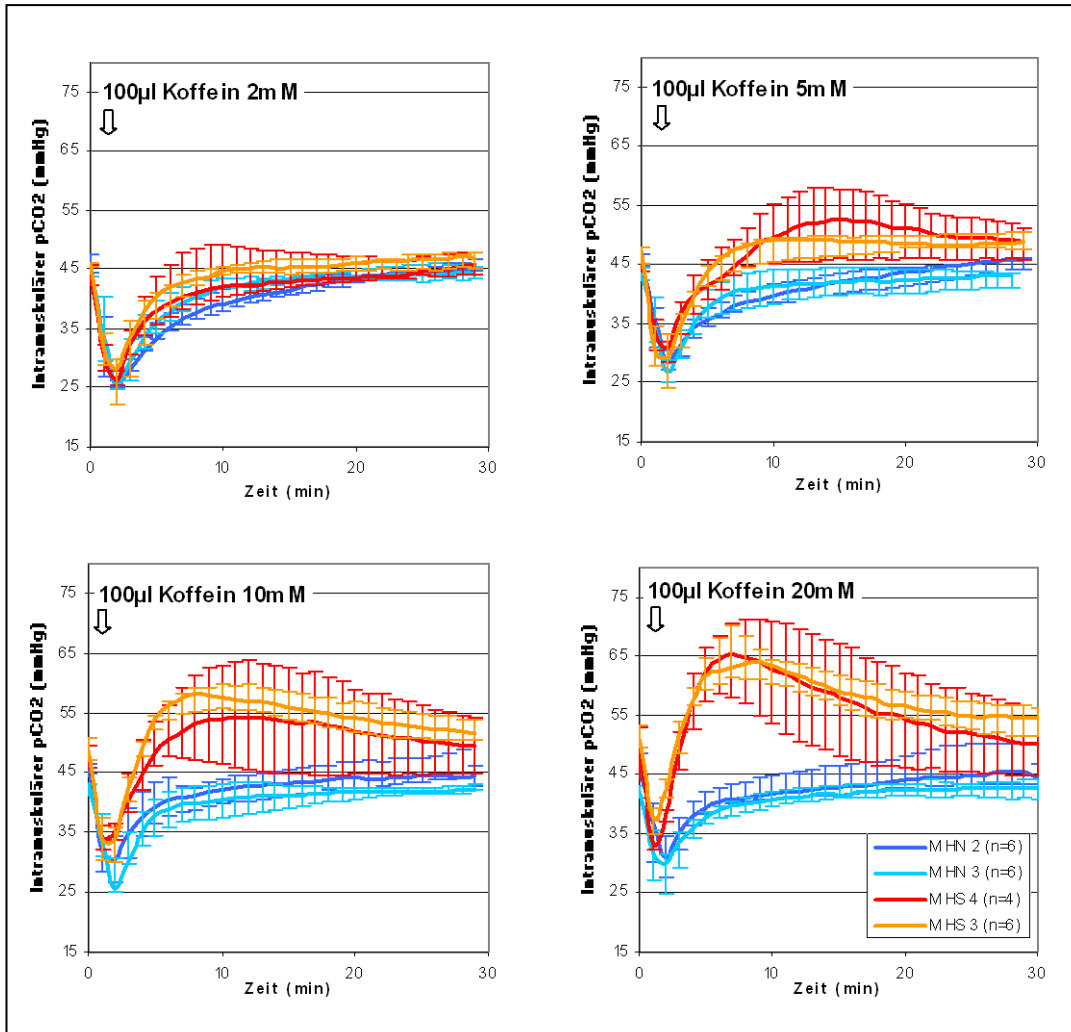


Abb. 3-6: Mittels Gewebe-pCO₂-Messung ermittelter intramuskulärer pCO₂-Verlauf bei MHS (rot) – und MHN (blau) - Tieren nach Applikation von 100 μl Koffein ansteigender Konzentration (2 mM [oben links], 5 mM [oben rechts], 10 mM [unten links], 20 mM [unten rechts]).

3.4 Systemische, hämodynamische und metabolische Parameter

3.4.1 Herzfrequenz

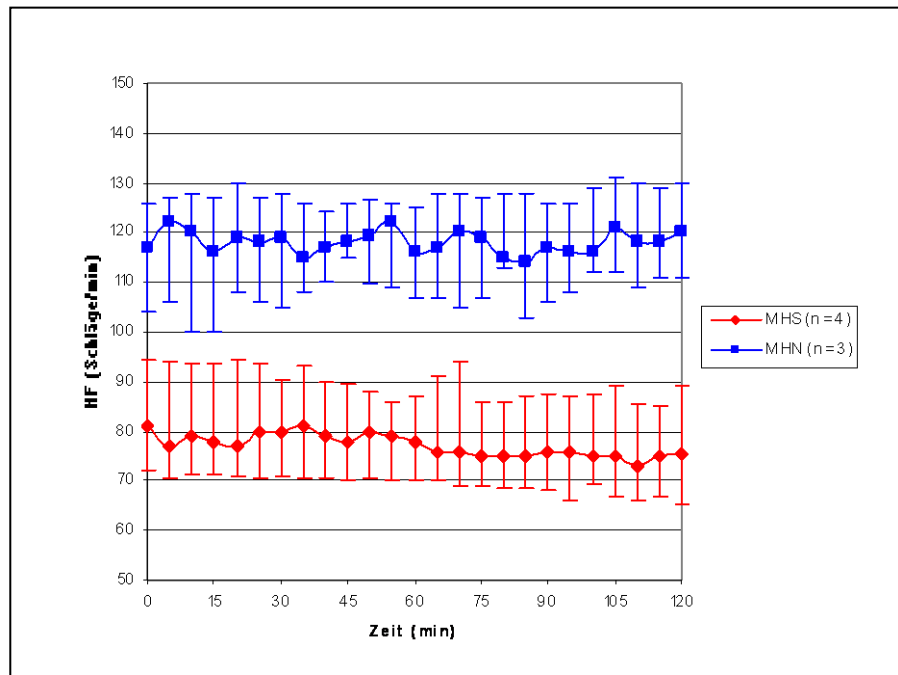


Abb. 3-7: Verlauf der medianen Herzfrequenzen in der Gruppe der MHS- (rot) und der MHN-Tiere (blau).

Bei den MHS-Tieren (n=4) lag die Herzfrequenz zwischen 81 (1 min) und 73 Schlägen/min (110 min).

Die MHN-Tiere (n=3) zeigten sich deutlich tachykarder mit Herzfrequenzen zwischen 114 (85 min) und 122 Schlägen/min (5 min).

3.4.2 Mittlerer arterieller Druck

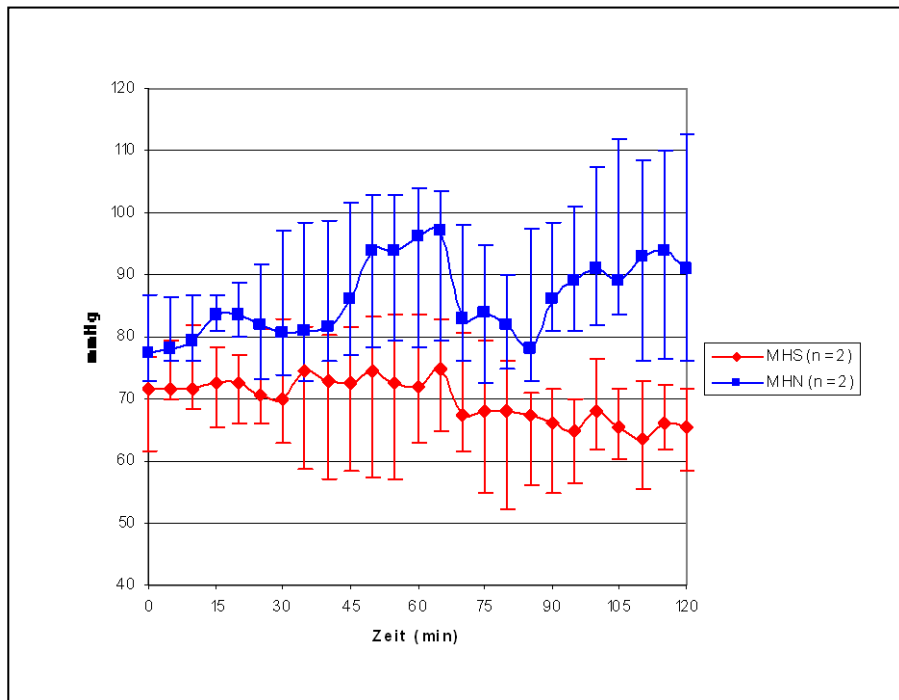


Abb. 3-8: Verlauf der medianen Werte für den arteriellen Mitteldruck unter der Versuchsdurchführung in der Gruppe der MHS- (rot) und MHN-Tiere (blau).

Ausgehend von einem arteriellen Mitteldruck von 71 mmHg kam es in der Gruppe der MHS-Tiere (n=2) zu einem leichten Abfall auf 65 mmHg. Der arterielle Mitteldruck der MHN-Tiere stieg hingegen von 77 mmHg auf 91 mmHg an. Dazwischen wurden stärkere Schwankungen gemessen, deren minimaler Wert bei 78 mmHg (85 min), der maximale bei 97 mmHg (65 min) lag.

3.4.3 Creatinkinase im Serum

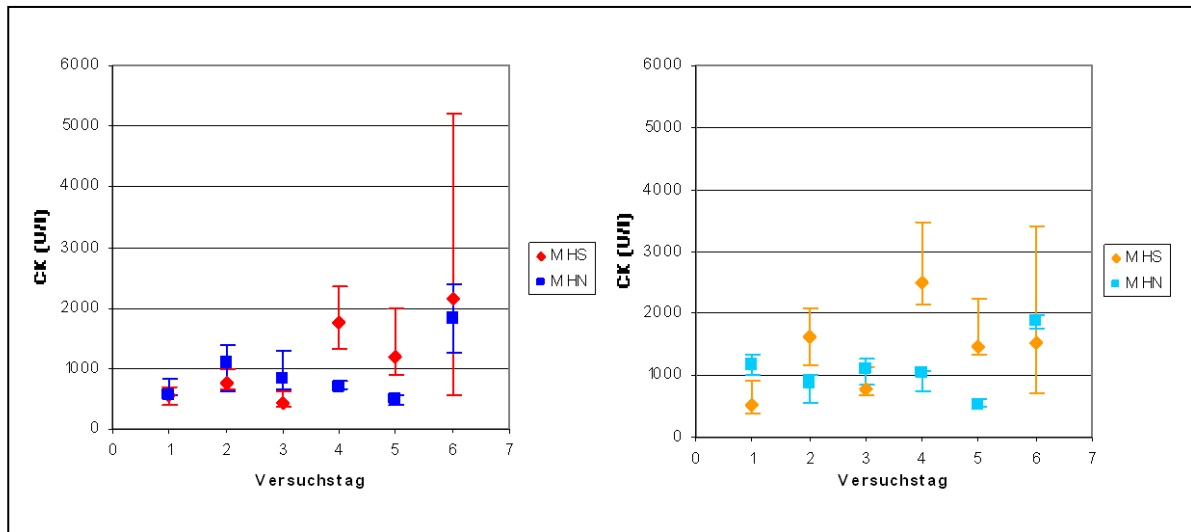


Abb. 3-9: Mediane CK-Werte vor (links) und nach (rechts) Versuchsdurchführung an den jeweiligen Versuchstagen in der Gruppe der MHS- und MHN-Tiere.

Nach einer Muskelschädigung kommt es ab 2 Stunden nach dem Ereignis zu einem Anstieg der CK im Serum. Das Maximum wird in unterschiedlichen Untersuchungen zwischen 24-48h⁵³ bzw. 48-72h⁵⁴ angegeben, bevor die Werte im Laufe von 3-5 Tagen wieder abfallen.

Bei den dargestellten Werten ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse von Tag 6 nur bedingt zu verwerthen sind, da vor der Versuchsdurchführung eine Muskelbiopsie durchgeführt wurde. Auf Grund des Muskelschadens ist hier mit erhöhten CK-Werten zu rechnen gewesen.

Vor Beginn des Versuches wurde in der Gruppe der MHS-Tiere (n=4) an den Tagen 1 bis 6 CK-Werte von 574 U/l, 775 U/l, 432 U/l, 1760 U/l, 1200 U/l und 2165 gemessen. Nach Beendigung des Versuches wurden CK-Werte von 517 U/l, 1630 U/l, 786 U/l, 2510 U/l, 1475 U/l und 1523 U/l ermittelt. In der Differenz vor und nach Versuchsdurchführung ergeben sich – 57 U/l, + 855 U/l, + 354 U/l, + 750 U/l, +275 U/l und – 642 U/l.

In der Gruppe der MHN-Tiere (n=3) wurden vor Versuchsdurchführung CK-Werte von 559 U/l, 1090 U/l, 824 U/l, 711 U/l, 482 U/l und 1827 U/l ermittelt. Die

Kontrolle nach Beendigung der Versuche ergab 1180 U/l, 873 U/l, 1110 U/l, 1040 U/l, 525 U/l und 1870 U/l. Dies entspricht Differenzen von + 621 U/l, - 217 U/l, + 286 U/l, + 329 U/l, + 43 U/l und + 44 U/l.

3.4.4 Laktat im Serum

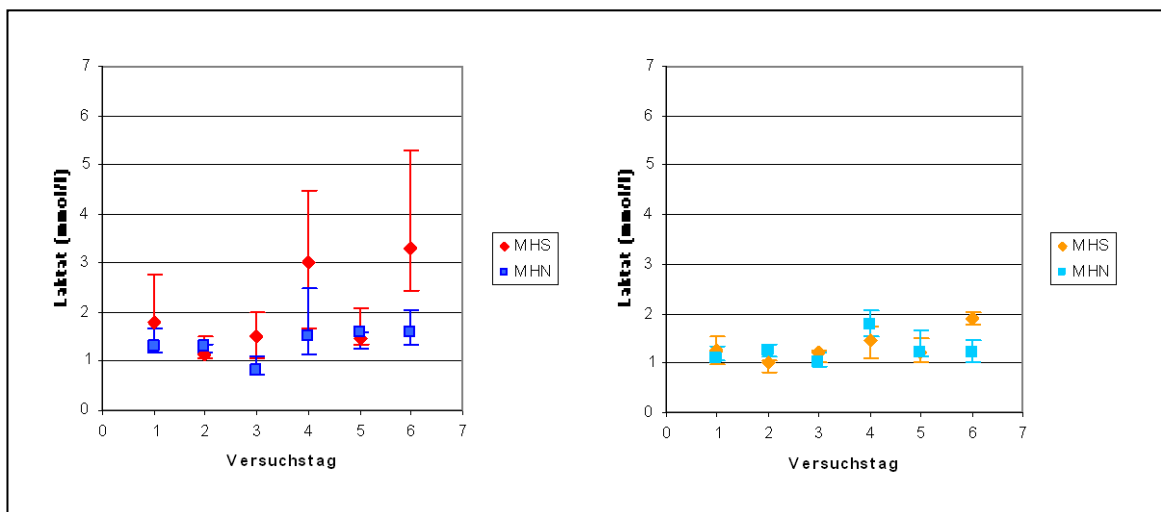


Abb. 3-10: Venöse Laktatspiegel vor (rechts) und nach (links) Versuchsdurchführung an den jeweiligen Versuchstagen in der Gruppe der MHS- und MHN-Tiere.

Vor Beginn des jeweiligen Versuches wurde an den Tagen 1 bis 6 in der Gruppe der Anlageträger (n=4) venöse Laktatspiegel zwischen 1.15 mmol/l und 3.30 mmol/l gemessen. Danach lagen die Werte zwischen 1.00 mmol/l und 1.90 mmol/l. Dies entspricht einer Differenz vor und nach Versuchsdurchführung zwischen - 0.15 mmol/l und - 1.55 mmol/l

In der Gruppe der MHN-Tiere (n=3) wurden vor Durchführung des Versuches Laktatwerte in einem Bereich von 0.80 mmol/l und 1.60 mmol/l gemessen, welche nach Abschluss der Versuche zwischen 1.00 mmol/l und 1.20 mmol/l lagen. Hieraus ergeben sich Differenzwerte von - 0.40 mmol/l bis + 0.30 mmol/l.

3.4.5 Arterielle Blutgasanalyse

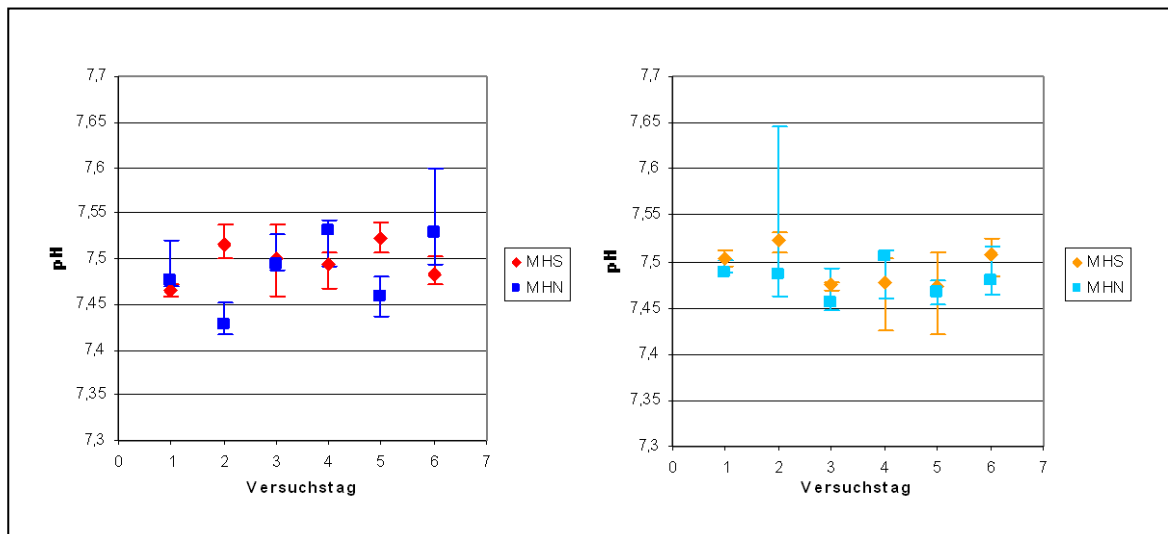


Abb. 3-11: Arterielle pH-Werte vor (links) und nach (rechts) Versuchsdurchführung in der Gruppe MHS- und MHN-Tiere

Die arterielle Blutgasanalyse vor Versuchsbeginn ergab in der Gruppe der MHS-Tiere (n=4) Blut-pH-Werte von 7.46 bis 7.52, welche nach Ende der Versuche zwischen 7.47 und 7.52 lagen. Dies ergibt mediane Veränderungen im Laufe des Versuches von -0.05 bis $+0.04$.

Die Gruppe der MHN-Tiere (n=3) wies arterielle Blut-pH-Werte zwischen 7.43 und 7.53 auf. Nach Abschluss der Versuche wurden Werte von 7.46 bis 7.51 mit entsprechenden Differenzen zwischen -0.05 und $+0.06$ gemessen.

3.4.6 Körpertemperatur

Die Tiere wurden während der Versuchsdurchführung mittels Wärmedecke und Infrarotlampe vor einem Auskühlen geschützt und die Körpertemperatur konstant gehalten, so dass keine Aussage über den spontanen Temperaturverlauf getroffen werden kann. Allerdings wurde vor allem bei den MHS-Tieren kein Temperaturanstieg im Sinne einer generalisierten MH-Reaktion gesehen.

3.5 Maligne-Hyperthermie-Krise

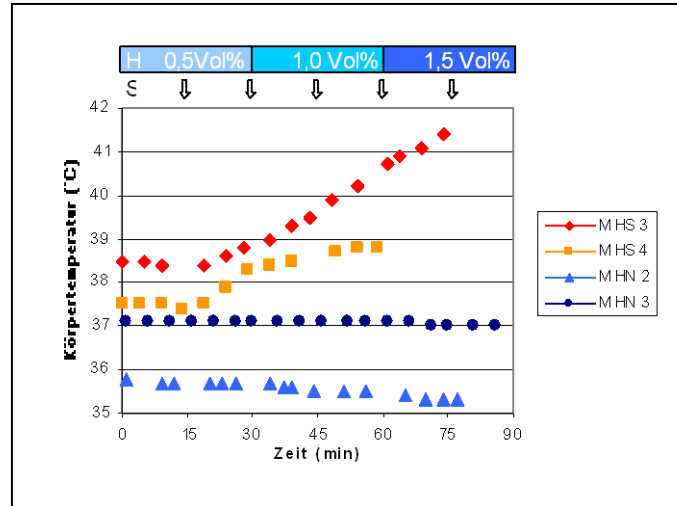


Abb. 3-12: Temperaturverlauf der MHS- (rot) und MHN-Tiere (blau) unter Triggerung einer MH-Krise durch Inhalationsnarkose mit Halothan (H) und Applikation von Succinylcholin (S).

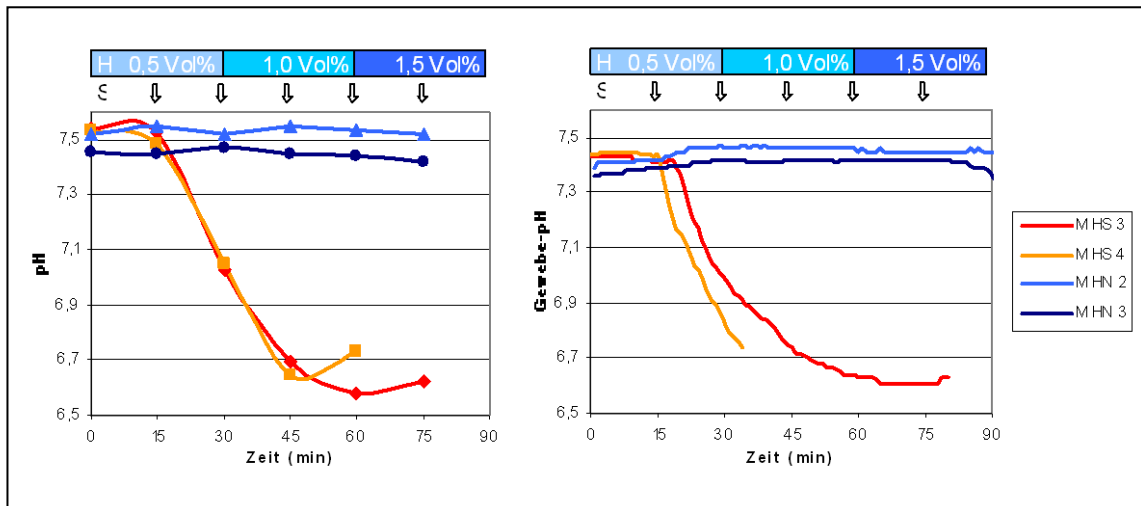


Abb. 3-13: Arterieller (links) und intramuskulärer (rechts) pH-Wert nach Triggerung einer MH-Reaktion mit Succinylcholin und Halothan bei MHS-(rot) und MHN-Schweinen (blau) .

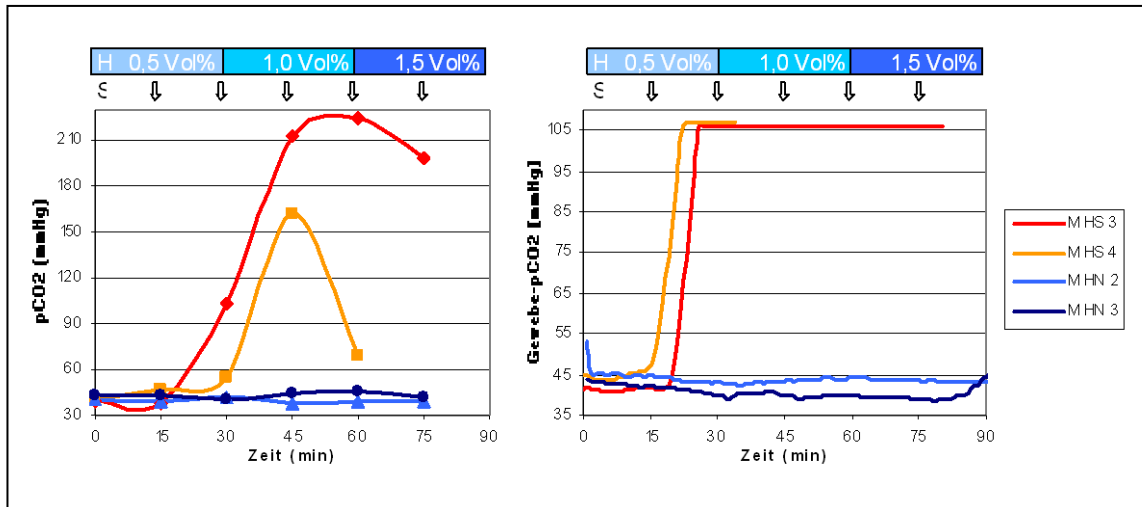


Abb. 3-14: Arterieller (links) und lokaler (rechts) pCO₂ für die MHS- (rot) bzw. MHN-Tiere (blau) bei Auslösung einer MH-Reaktion.

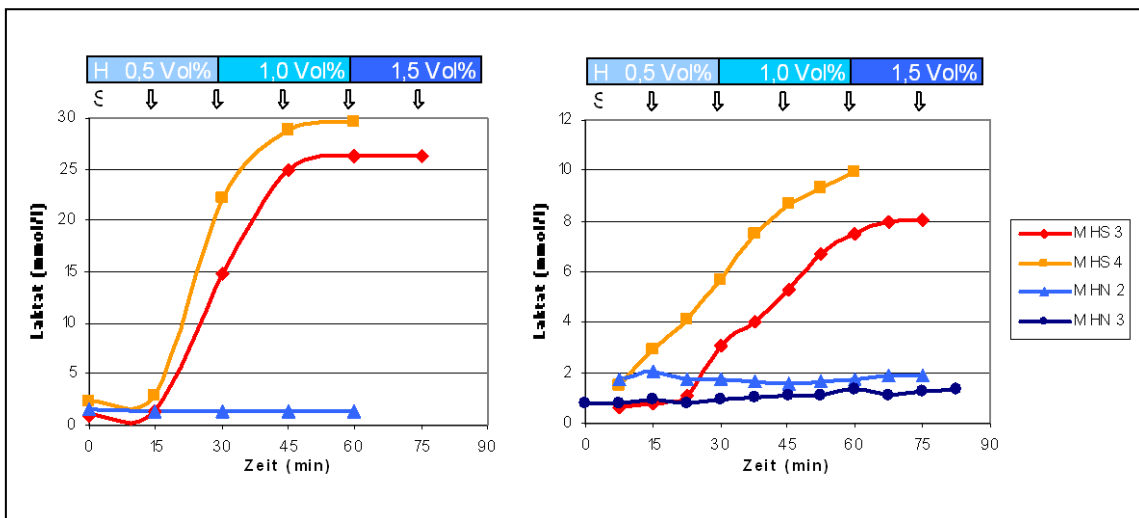


Abb. 3-15: Venöse (links) und mittels Mikro dialyse im Muskel (rechts) bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2 μ l ermittelte Laktatwerte für die MHS- (rot) bzw. die MHN-Tiere (blau) unter Triggerung einer MH-Reaktion.

In der Gruppe der MHS-Tiere (MHS 3 und MHS 4) konnte mit einem persistierenden Muskelrigor unter einer endtidalen Halothankonzentration von 0,5 vol% und nach Applikation des ersten 100mg Succinylcholin Bolus nach 15 min der Beginn einer klinisch manifesten MH-Reaktion festgestellt werden. Unter Steigerung der Halothankonzentration und Gabe von Succinylcholin kam es zu einem Anstieg der Körpertemperatur auf maximal 41,4 bzw. 38,8°C. Parallel hierzu traten die erwarteten systemischen und lokalen Veränderungen der gemessenen Parameter ein. Im Rahmen des einsetzenden Hypermetabolismus mit kombinierter metabolischer und respiratorischer Azidose kam es zu einem Anstieg des Laktatspiegels auf 26.3 bzw. 29.6 mmol/l, des arteriellen pCO₂ auf 224.4 bzw. 161.8 mmHg und einem Abfall des arteriellen pH-Wertes auf 6.58 bzw. 6.64. Analoge Veränderungen ergaben die Messungen des lokalen Milieus im Muskel. Der mittels Mikrodialyse gemessene Laktatspiegel stieg auf maximal 8.06 mmol/l bzw. 9.93 mmol/l an. Die pCO₂-Messung erbrachte einen Anstieg über den Messbereich der Sonde, bei einem Abfall der Gewebe-pH-Werte auf 6.61 bzw. 6.74.

Die MHN-Tiere (MHN 2 und MHN 3) zeigten unter Narkose mit Halothan und Relaxation mit Succinylcholin weder einen Anstieg der Körpertemperatur noch Veränderungen der systemischen bzw. lokalen Werte für Laktat, pCO₂ und pH.

3.6 Histologie

Die exemplarische makroskopische und histologische Untersuchung des untersuchten Skelettmuskels zeigte im Bereich der Injektionsstellen Muskelnekrosen mit einem Durchmesser bis zu 2 cm. In Abhängigkeit der repetitiven Injektionen von Halothan und Koffein lagen frühe leukozytäre Infiltrate neben älteren fibrohistiozytären Zellverbänden. Einzelne angulierte Fasern weisen auf einen Zelluntergang hin.

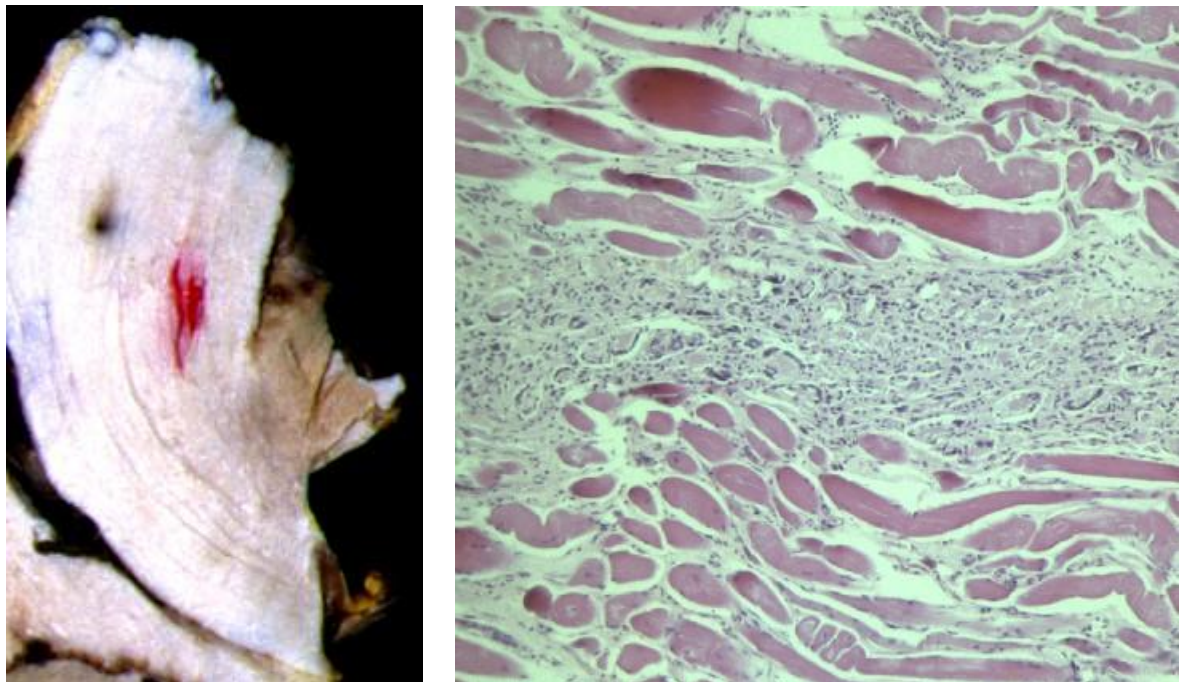


Abb. 3-16: Makroskopisches und histologisches Präparat der Adduktorenmuskulatur des Tieres MHS 4. Links sind mit Tinte markierte Injektionsstellen, rechts lymphozytäre und fibrozytäre Einwanderung sowie einzelne spiralige Verformung von Muskelfasern als Zeichen der Nekrose dargestellt.

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter lokaler Stimulation mit Halothan und unter maximaler Triggerung mit Koffein in der Gruppe der MHS-Tiere ein Anstieg des intramuskulären Laktatspiegels messbar ist. Durch repetitive Stimulation mit steigenden Koffeinkonzentrationen konnte bei Anlageträgern ein zunehmender Anstieg des lokalen pCO_2 und Abfall des pH festgestellt werden. In keinem Versuch wurden systemische Reaktionen beobachtet.

4.1 Methodenkritik

Prinzipiell ist bei der Diskussion der Ergebnisse kritisch anzumerken, dass auf Grund des Versuchsaufbaus mit repetitiver Untersuchung der Versuchstiere keine ausreichende Fallzahl unabhängiger Versuche für eine statistische Auswertung erzielt werden konnte. Jedoch lag ein Hauptaugenmerk dieser Pilotstudie in der Entwicklung möglicher Versuchsprotokolle sowie in der intraindividuellen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

4.2 Laktat-Mikrodialyse unter Halothan-Stimulation

Bei diesen Versuchen wurde eine kontinuierliche Stimulation über eine zweite Mikrodialysesonde mit 10% Halothan durchgeführt. Da das Halothan aus der Fettemulsion in den Muskel diffundiert und nicht in einem laktatfreien Medium in den Muskel injiziert wird, ist hier kein Verdünnungseffekt des dialysierten Laktats zu befürchten. Prinzipiell ist eine gleichmäßigere Stimulation zu erwarten, da sich ein Gleichgewicht zwischen Abtransport und Nachlieferung des Halothans im Muskel einstellen sollte.

Bei den Anlageträgern kann durch die kontinuierliche Stimulation mit Halothan ein reproduzierbarer Hypermetabolismus im Sinne einer malignen Hyperthermiereaktion ausgelöst werden. Dieser führt bis hin zur anaeroben Glykolyse mit messbarem Anstieg des Laktatspiegels. Da unter der gleichen Stimulation bei MHN-Tieren kein Anstieg des Muskellaktats gemessen werden konnte, erscheint dieses Protokoll im Rahmen des Mikrodialyseverfahrens zur Unterscheidung zwischen Anlageträgern und Nicht-Anlageträgern geeignet.

Interessanterweise findet sich unter der kontinuierlichen Stimulation kein kontinuierlicher Anstieg des Muskellaktatspiegels. Stattdessen fallen die Werte unter weiterer Applikation der Triggersubstanz nach einem Maximum auf das Ausgangsniveau ab. Hierfür sind verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu diskutieren. Einerseits kann es zu einer Erschöpfung der Glykogenvorräte kommen. Dies würde bedeuten, dass nach einer maximal getriggerten Reaktion durch Aufbrauchen des Stoffwechselsubstrates kein Laktat mehr gebildet werden kann. Andererseits ist als Maximalvariante ein Zelluntergang im Rahmen der getriggerten malignen Hyperthermiereaktion im Stimulationsbereich denkbar, so dass der Trigger im weiteren Verlauf auf avitales Gewebe trifft, in dem keine weitere Reaktion möglich ist. Gegen letztere Überlegung spricht jedoch, dass in den histologischen Untersuchungen ein relativ geringes Maß an Zelluntergängen gesehen wurde.

4.3 Laktat-Mikrodialyse unter Koffein-Stimulation

4.3.1 Vorversuch 1: Injektion von 20 mM Koffein mit 50, 100, 200 und 400 µl

Angewandt wurde dieses Protokoll zunächst bei zwei MHS-Tieren, um den Effekt bei Anlageträgern beurteilen zu können.

Nur unter der ersten Koffeinapplikation ist ein Anstieg des lokalen Laktatspiegels zu finden. Eine Erklärungsmöglichkeit ergibt sich im Vergleich mit den äquivalent durchgeführten pH- und pCO₂-Messungen, in denen sich bereits un-

ter dem ersten Bolus von 50 μ l Koffein 20 mM ein maximaler Effekt erzielen ließ. Dies kann bedeuten, dass bereits mit dieser ersten Koffeinapplikation ein anaerober Hypermetabolismus mit Bildung von Laktat im Sinne der malignen Hyperthermie ausgelöst wurde. Ein weiterer Anstieg der Laktatkonzentration wird durch Limitierung des Hypermetabolismus bei Verbrauch des intrazellulären Glykogens bereits nach Applikation des initialen Bolus verhindert. Dies erklärt den sich im weiteren Verlauf normalisierenden Laktatspiegel im Muskel unter der weiteren Stimulation.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen ersten Versuchen der Schluss ziehen, dass ein Laktatanstieg unter der initialen Stimulation mit 50 μ l von 20 mM Koffein bei MHS Schweinen zu finden ist, welcher jedoch durch eine weitere Erhöhung des Volumens der 20 mM Koffeinlösung nicht zu steigern ist.

4.3.2 Vorversuch 2: Injektion von 80 mM Koffein mit 50, 100, 200 und 400 μ l

Auf Grund des nur geringen Anstiegs des Laktatspiegels im Vergleich zur Stimulation mit Halothan, wurde in den weiteren Versuchen der Tiere MHS 1 und MHS 2 das Protokoll dahingehend abgeändert, dass Boli steigenden Volumens einer 80 mM Koffeinlösung appliziert wurden.

Entsprechend den Überlegungen zu dem ersten Koffein-Stimulationsprotokoll ließ sich zwar ein höherer maximaler Laktatwert erreichen, jedoch zeigte lediglich der erste Koffeinbolus einen Effekt. Analog ist hier mit einem maximalen hypermetabolen Effekt bereits unter der ersten Triggerapplikation zu argumentieren.

4.3.3 Hauptversuch: Injektion von 100 μ l Koffein mit 10, 20 und 40 mM

Entsprechend wurde das Protokoll für die Stimulation mit Koffein bei Messung des Laktatspiegels im Muskel mittels Mikrodialyse abgeändert. Da die Ergebnisse sowohl der Stimulation mit 20 mM bzw. 80mM Koffein bereits einen maximalen Effekt bei Applikation des ersten Bolus zeigten, wurde bei den weiteren

Versuchen die Konzentration des Koffeins von 10 mM bis 80 mM bei konstantem Bolusvolumen von 100 μ l gesteigert. Gestützt wurde dieses Vorgehen durch die ersten Auswertungen der pH- und pCO₂-Messungen, welche bereits für eine Stimulation mit 50 μ l 20 mM Koffein einen starken Abfall des pH-Wertes im Muskel mit gleichzeitigem Anstieg des pCO₂ über den Ausgangswert ergaben.

Es fand sich jedoch lediglich bei einzelnen Versuchen der MHS-Tiere ein geringer Anstieg des Muskellaktatspiegels. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind ebenfalls im Zusammenhang mit den korrespondierenden Gewebepartialdruckmessungen zu interpretieren. Unter den Konzentrationen von 5 – 20 mM Koffein ist mit steigenden Konzentrationen ein zunehmender pH-Abfall sowie ein Anstieg des pCO₂ über das Ausgangsniveau in der Gruppe der MHS Tiere zu beobachten. Diese Effekte sind am ausgeprägtesten in den ersten 15 min nach Applikation des entsprechenden Bolus und nähern sich in den zweiten 15 min wieder den Ausgangswerten an. Da unter diesen Konzentrationen ein Effekt im Sinne eines hypermetabolen Stoffwechsels bei MHS Tieren gesehen werden kann, kann man ebenfalls davon ausgehen, dass in zeitlich ähnlichem Verlauf die Laktatproduktion im Muskel gesteigert ist. Eine Ursache dafür, dass ein solcher Laktatanstieg nicht gemessen werden konnte, ist zum einen in der geringen zeitlichen Auflösung der Messmethode mit einem Sammelintervall von 15 min zu sehen. Dies könnte durch die Verkürzung des Sammelintervalls mit Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit bei gleichzeitig verringerter Recovery umgangen werden.

Daneben ist es bemerkenswert, dass entgegen den Ergebnissen der Vorversuche unter diesem Protokoll selbst bei der Applikation des 20 mM Koffein-Bolus kein Anstieg des Laktats zu beobachten ist. Dies lässt den Schluss zu, dass durch den vorangegangenen Bolus mit Koffein 10 mM ein Anstieg unter dem 20 mM bzw. 40 mM Bolus verhindert wird. Durch die niedrigeren Konzentrationen von 10 mM Koffein kann zwar ein Hypermetabolismus in Gang gesetzt werden, dessen Stoffwechselprodukt – Laktat – durch die Messmethode nicht erfasst werden kann. Im weiteren Verlauf kann die Reaktion dann nicht durch höhere Konzentrationen weiter getriggert werden. Ob hier ein limitierender Mechanis-

mus der weiteren Triggerung, ein Verbrauch des Glykogens bei einer Laktatproduktion, welche mit der Messmethode nicht nachgewiesen werden kann, oder ein vermehrter Abtransport durch die durchblutungsfördernde Wirkung des Koffeins vorliegt, ist an dieser Stelle nicht sicher zu beantworten.

4.4 Gewebe - pH und - pCO₂ unter Koffein-Stimulation

4.4.1 Vorversuch: Injektion von 20 mM Koffein mit 50, 100, 200 und 400 µl

Es zeigte sich schon nach dem initialen Koffeinbolus ein maximaler Abfall der pH- sowie Anstieg der pCO₂-Werte, welcher durch weitere Bolusgaben nicht mehr gesteigert werden konnte.

Der initiale Abfall des pCO₂ bei Applikation der Koffeinlösung ist durch den niedrigen pCO₂ der Lösung bei Raumluft bedingt. Dieser Effekt könnte durch eine Begasung des Koffeins mit 5% CO₂ unmittelbar vor Injektion verhindert werden, dient aber als ausgezeichnete Marker für die erfolgte Applikation.

Bei der Interpretation dieser Versuchsreihe ist der Anstieg des pCO₂ über das Ausgangsniveau bzw. ein Abfall des Gewebe-pH durch die bereits mit dem ersten Koffein-Bolus maximal getriggerte hypermetabole Stoffwechselfunktion zu sehen. Eine weitere Volumensteigerung hat keinen weiter steigenden Effekt auf den Hypermetabolismus. Als Ursache hierfür kann ein Substratverbrauch bzw. Zelluntergang mit areaktivem Gewebe im Wirkungsbereich des Bolus / Messbereich des Sensors vermutet werden. Betrachtet man sich die unphysiologischen pH- bzw. pCO₂ Werte unter dem ersten Bolus, erscheint ein Zelluntergang jedoch wahrscheinlicher. Gestützt wird die Theorie der bereits maximalen Triggerung durch Vergleich der Werte unter Stimulation mit Koffein mit den Messergebnissen der MH-Krisen, bei denen im Rahmen der systemischen und letztendlich letalen Reaktion lokale pH und pCO₂ Werte in vergleichbarer Höhe gemessen wurden.

Zusammenfassend lässt sich der Schluss ziehen, dass durch die Applikation von Koffein ein Hypermetabolismus initiiert werden kann, jedoch bereits mit dem ersten Bolus ein maximaler Effekt erzielt wird. Das Ziel einer Steigerung des Hypermetabolismus mittels einer Volumensteigerung des Triggers konnte nicht erreicht werden, da die Dosis zur Auslösung der Reaktion unterhalb von 50 μl 20 mM Koffein anzunehmen ist. Somit wurde in den nachfolgenden Versuchen eine Steigerung der Dosis von 2 mM, 5 mM, 10 mM bis hin zu einer Konzentration von 20 mM bei gleich bleibendem Volumen von 100 μl gewählt. Darüber hinaus zeigt sich bereits hier ein Vorteil gegenüber dem Verfahren der Mikrodialyse, da bei Messintervallen von 1 Minute eine höhere zeitliche Auflösung der Reaktionsvorgänge im Muskel und somit eine höhere Aussagefähigkeit des Verfahrens an sich möglich ist.

Da lediglich 2 MHS-Tiere untersucht wurden, sind diese Versuche im Sinne einer Dosisfindung zu interpretieren und erlauben keine Aussage hinsichtlich einer möglichen Unterscheidung zwischen Anlageträger und Nicht-Anlageträger.

4.4.2 Hauptversuch: Injektion von 100 μl Koffein mit 2, 5, 10 und 20 mM

Auf Grund des Vorversuches wurde, ausgehend von einer niedrigen Koffeinkonzentration von 2 mM, eine Steigerung auf 20 mM bei konstantem Bolusvolumen von 100 μl durchgeführt.

Durch die Applikation der Koffeinelösung an sich kann sowohl bei MHS als auch bei MHN-Tieren ein Abfall des gemessenen Gewebe-pH Wertes auf Werte um 7,2 bewirkt werden, unabhängig von der Konzentration. Ein darüber hinausgehender stärkerer Abfall des Gewebe-pH in der Gruppe der MHS-Tiere unter den steigenden Boluskonzentrationen von 5 mM, 10 mM und 20 mM kann als eine lokale Azidose im Rahmen einer initiierten hypermetabolen Reaktion interpretiert werden, auf Grund derer eine Unterscheidung zwischen Anlageträgern und Nichtanlageträgern getroffen werden kann.

Zudem kann ab einer Boluskonzentration von 5 mM in der MHS-Gruppe ein zunehmender Anstieg des pCO_2 über das Ausgangsniveau gefunden werden.

Dieser ist im Unterschied zu den MHN-Tieren durch den mit steigender Koffeindosis ausgelösten Hypermetabolismus zu erklären. Die angewandten Koffeinkonzentrationen bewirken in der Gruppe der MHN-Tiere keine vermehrte CO₂-Produktion, so dass hier eine sehr gute Beurteilbarkeit der Veranlagung zur malignen Hyperthermie zu sehen ist.

Die Schwelle zur Auslösung einer lokalen hypermetabolen Stoffwechselfunktion wurde bei 100 µl Koffein 5 mM gesehen. Bei dieser Konzentration erfolgt noch keine maximale Reaktion, da nach Normalisierung der Werte mit den Boli höherer Konzentrationen bei den MHS-Tieren erneut ein Hypermetabolismus hervorgerufen ist. Im Vergleich zu den korrespondierenden ersten Versuchen der pH- und pCO₂-Messung unter Applikation von 50 µl Koffein 20 mM fällt jedoch auf, dass das Ausmaß des pH-Abfalls bzw. des pCO₂-Anstieges deutlich geringer ist. Ursache hierfür kann die vorangegangene submaximale Triggerung sein, im Rahmen derer die Stärke der folgenden Reaktionen z. B. durch einen durchblutungsfördernden Effekt des Koffeins abgeschwächt ist. Das Ausmaß von möglichen Zelluntergängen unter diesem Protokoll erscheint nur gering, da die jeweils stärkeren Reaktionen nur bei vitalem Gewebe möglich sind. Die Dauer des Hypermetabolismus sowie das lokale Ausmaß ist dabei nur begrenzt, da es zu einer weitgehenden Normalisierung der Werte des pH, sowie des pCO₂ am Ende des 30-minütigen Messintervalls kommt. Eine über diese Effekte hinausgehende, sich selbst unterhaltende hypermetabole Reaktion im Sinne einer generalisierten malignen Hyperthermie nach Ende der Einwirkung des Triggers konnte in der Gruppe der Anlageträger nicht gesehen werden.

Zusammenfassend liegt mit der Steigerung der Koffeinkonzentration von 2 mM bis 20 mM bei konstantem Bolusvolumen von 100 µl ein praktikables Protokoll der Gewebe-pH sowie -pCO₂-Messung vor, welches eine Unterscheidung zwischen Anlageträgern und Nicht-Anlageträgern durch beide Parameter erlaubt. Die pCO₂-Messung erscheint dabei eine höhere Aussagekraft zu haben, da hier eine überschießende Produktion von CO₂ im Muskel der MHS-Tiere vorliegt, welche in keinem Fall der MHN-Tiere gesehen wurde.

4.5 Systemische Parameter

Bei der Betrachtung der systemischen Auswirkungen der lokalen Applikation von Triggersubstanzen ist ein Augenmerk auf den Vergleich der Parameter zwischen den MHS- und den MHN-Tieren zu legen. Auf der anderen Seite ist auch der Vergleich mit den entsprechenden Parameter bei Auslösung der generalisierten MH-Reaktion mittels Halothan / Succinylcholin zu ziehen.

Die Körpertemperatur kann dabei nicht als unabhängige Variable für eine Generalisation angesehen werden, da diese konstant gehalten werden musste. Es zeigte sich jedoch in keinem Versuch der MHS-Tiere ein vergleichbarer Anstieg der Körpertemperatur, wie unter den getriggerten MH-Krisen.

Auch die Betrachtung der Herzfrequenz sowie des arteriellen Mitteldrucks ergab keine in zeitlichem Zusammenhang mit der Versuchsdurchführung stehende systemische Kreislaufdysregulation.

Die Untersuchung der CK als Marker für die Schädigung der Muskelzellen erbrachte im Vergleich zwischen MHN und MHS-Tieren höhere Werte für die MHS-Tiere sowohl vor als auch nach Versuchsdurchführung. Auf Grund dieser Ergebnisse muss ein vermehrter Zelluntergang in der Gruppe der MHS-Tiere mit kumulativer Erhöhung der CK im Verlauf der Versuchsserie diskutiert werden. Andererseits könnten auch externe Faktoren mit unterschiedlicher Auswirkung auf die zwei Versuchstiergruppen, wie zum Beispiel körperlicher Stress im Rahmen der Prämedikation, hierzu beitragen.

Das Verhalten des aus dem venösen Blut gemessenen Laktatspiegels zeigt lediglich eine deutliche Erhöhung der medianen Werte jeweils vor Versuchsbeginn an den Tagen 4 und 6. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein Trigger im Rahmen des Versuchsaufbaus eingewirkt hatte, muss hierfür ein externer Faktor, wie beispielsweise körperliche Aktivität vor der Narkose, als Ursache angesehen werden. Unter der Durchführung der Versuche fanden sich insbesondere nach Applikation der Triggersubstanzen vergleichbare systemische Laktatwerte. Ein systemischer anaerober Hypermetabolismus ist daher nicht anzunehmen.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Betrachtung der medianen arteriellen pH-Werte in den Gruppen MHS und MHN, welche jeweils vor als auch nach Versuchsdurchführung in einem weitgehend gleichen, physiologischen Bereich lagen.

Auch der subjektive Eindruck nach Ende des Versuches und Erwachen der Tiere aus der Narkose erbrachte, auch angesichts der mehrfach durchgeführten Stimulation, keine fassbare Beeinträchtigung der MHS- bzw. MHN-Tiere.

Zusammenfassend fand sich kein Hinweis auf eine generalisierte MH-Reaktion in der Gruppe der hierdurch potentiell gefährdeten MHS-Tiere unter lokaler Applikation der Triggersubstanzen Koffein und Halothan. Es ist somit davon auszugehen, dass die beobachteten Veränderungen unter Stimulation streng lokal ablaufen, nach Absetzen der Triggersubstanz limitiert sind und zu keiner systemischen Reaktion oder gar vitaler Bedrohung der Versuchstiere führen.

5 Zusammenfassung

Die Maligne Hyperthermie ist eine genetisch determinierte Stoffwechselerkrankung, bei der es unter der Exposition von volatilen Anästhetika und depolarisierenden Muskelrelaxantien zu einem generalisierten Hypermetabolismus mit Laktatazidose und vermehrter Produktion von CO₂ kommt.

Die Diagnose wird mittels dem, für den Patienten belastenden, invasiven In-vitro-Kontrakturtest als Goldstandard gestellt. Ein wichtiger Schwerpunkt der anästhesiologischen Forschung liegt daher in der Entwicklung eines weniger invasiven Diagnoseverfahrens der Disposition zur Malignen Hyperthermie.

Als Modell der malignen Hyperthermie ist das „porcine-stress-syndrom“ etabliert. Wir nahmen an, dass durch die intramuskuläre Applikation von Koffein und Halothan als Triggersubstanzen bei stressempfindlichen Schweinen (MHS) im Gegensatz zu nicht veranlagten Tieren (MHN) eine lokal begrenzte hypermetabole Reaktion ohne systemische Auswirkungen ausgelöst wird.

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission wurden 4 Schweine mit (MHS) und 3 Schweine (MHN) ohne Veranlagung für das „porcin-stress-syndrom“ jeweils 6-mal in Narkose untersucht. Es wurden 3 modifizierte Mikro-dialyse (MD) - Sonden, sowie eine pH- / pCO₂- Messsonde, in die Adduktoren-muskulatur der Tiere eingebracht. Bei der ersten MD - Sonde wurde ein Schlauch zur Applikation von Koffeidlösungen angebracht. In 2 Vorversuchen wurden nach Äquilibration steigende Volumina (50, 100, 200 und 400 µl) von 80 bzw. 20 mM zugegeben. Im Hauptversuch wurden 100µl Koffeidlösung ansteigender Konzentration (10, 20 und 40 mM) verwendet. Bei der zweiten MD - Sonde handelte es sich um eine Mess- und eine Stimulationssonde, welche mit einer 10%-igen Lösung von Halothan in Lipofundin 20% bei 1 µl/min perfundiert wurde. Die dritte MD - Sonde lieferte Kontrollwerte. Das Dialysat wurde bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2 µl/min in 15-minütigen Intervallen aufgefangen und die Laktatkonzentration photometrisch bestimmt. In der Mitte der pH- / pCO₂- Messsonde wurde im Vorversuch 20 mM Koffein steigender Volumina (50, 100, 200 und 400 µl), im Hauptversuch 100 µl Koffein steigender

Konzentration (2, 5, 10 und 20 mM) injiziert und der pH /pCO₂ kontinuierlich gemessen. Bei Versuchsdurchführung wurden hämodynamische und metabolische Parameter dokumentiert. Nach dem letzten Versuch wurde eine Maligne-Hyperthermie-Krise ausgelöst, sowie die Zugehörigkeit zu den Versuchgruppen mittels Invitro-Kontrakturtest und genetischer Testung gesichert.

Im Rahmen dieser Pilotstudie wurde bei einer nur geringen Anzahl unabhängiger Versuche auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die Einzelversuche wurden im Detail ausgewertet. Die Ergebnisse der Mikrodialyse-Versuche unter Stimulation mit Koffein erbrachten bei Anlageträgern nur bei maximaler Triggerrung mit einem 20 mM bzw. 80 mM Koffeinbolus einen messbaren Laktatanstieg. Eine Annäherung an diese Schwellendosis, ausgehend von niedrigeren Boluskonzentrationen, zeigte keine messbaren Veränderungen der lokalen Laktatkonzentration. Unter der kontinuierlichen Stimulation mit Halothan findet sich nur bei den MHS-Tieren ein Anstieg der Laktatkonzentration. Die Werte der intraindividuellen Kontrollsonden unterschieden sich dabei nicht in den Gruppen der MHS- / MHN-Tiere.

Die Messung des Gewebe-pH / -pCO₂ im Vorversuch erbrachte bereits durch den initialen 20 mM Koffeinbolus bei den MHS-Tieren einen ausgeprägten Abfall des lokalen pH-Wertes und Anstieg des pCO₂ im Sinne eines lokalen Hypermetabolismus. Der Hauptversuch zeigte, dass im Gegensatz zu den MHN-Tieren bei repetitiver Stimulation nur in der Gruppe der MHS-Tiere ab einer Koffeinkonzentration von 5 mM ein zunehmender Abfall des lokalen pH-Wertes und ein Anstieg des pCO₂ über das Ausgangsniveau auszulösen ist.

Klinisch zeigte sich keine systemische Reaktion auf die lokale Triggerapplikation. Ebenso wurden keine Unterschiede in den hämodynamischen und metabolischen Parameter der MHS- / MHN-Tiere gesehen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es in vivo möglich ist bei MH-Anlageträgern, mittels intramuskulär applizierter Triggersubstanzen, einen lokalen, MH-ähnlichen Hypermetabolismus auszulösen ohne Induktion einer systemischen Reaktion. Auf Grund dieser Erkenntnisse konnte eine Übertragung des Testverfahrens auf den Menschen erfolgen, wel-

ches das Potenzial hat, den wesentlich invasiveren In-vitro-Kontrakturtest als Diagnoseverfahren abzulösen.

6 Literaturverzeichnis

1. Helpap B, Gullotta F, Schulte am Esch J (Hg.) 1983: Maligne Hyperthermie. Stuttgart, New York.
2. Buford GE 1940 : Hyperpyrexia following anesthesia. A consideration of control of body temperatur during anesthesia. Anesthesiology 1 : S.208-215
3. Denborough MA, Lovell RRH 1960: Anesthetic deaths in a family. Lancet 2: 45-50
4. West S 2000: Linkage Analysis, in: Malignant Hyperthermia, Schulte am Esch J (u.a.) (Hg) 2000, S.212-221
5. Britt BA, Kalow W 1970: Malignant hyperthermia: a statistic review. Can Anaesth Soc J 17, S.293
6. Mac Lennan DH (u.a.) 1990: Ryanodin receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. Nature 343: S.562-564
7. McCarthy u.a. 1990: Localisation of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. Nature 343: S.562-564
8. Robinson R (u.a.) 2006: Mutations in RYR 1 in malignant hyperthermia and central core disease. Hum Mut. 2006 Oct; 27 (10): 977-989
9. Levitt RC (u.a.) 1992: Evidence for the localisation of a malignant hyperthermia susceptibility locus (MHS2) to human chromosome 17q. Genomics 14, S. 562-566
10. Iles DE (u.a.) 1994: Localisation of the gene encoding the α_2/δ -subunits of the L-type voltage-dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families. Hum Mol Genet 3, S.969-691
11. Sudbrak R (u.a.) 1995: Mapping of a further malignant hyperthermia locus to chromosome 3q13.1. Am J Hum Genet 56, S.689-691

12. Robinson (u.a.) 1997: A genome wide search for susceptibility loci in three European malignant hyperthermia pedigrees. *Hum Mol Genet* 6, S953-961
13. Klinke R, Silbernagel S 1996: *Lehrbuch der Physiologie*, Stuttgart; New York
14. Löffler G, Petrides PE 1997: *Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin
15. Denborough MA (u.a.) 1962: Anaesthetic deaths in a family. *Br J Anaesth* Jg. 34: S.395-396
16. Harrison GG, Isaacs H 1992: Malignant hyperthermia. An historical vignette. *Anaesthesia*, Jg. 47, S.54-56
17. Hopkins PM 2000: Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis. *Br J Anaesth*, Jg. 85, S.118-128
18. Durcart A (u.a.) 1995: Malignant hyperthermia during sevoflurane administration. *Anesth Analg*, Jg. 80, S.609-611
19. Allen GC, Brubaker CL 1998: Human malignant hyperthermia associated with desflurane anesthesia. *Anesth Analg*, Jg. 86, S.1328-1331
20. Steinfath M, Wappler F, Scholz J 2002: Maligne Hyperthermie – Allgemeine, klinische und experimentelle Aspekte. *Anaesthesist* 2002, 51: 328 - 347
21. Fill M, Coronado R, Mickelson JR (u.a.) 1990: Abnormal ryanodin receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophys J* 57: 471 - 475
22. Nelson TE 1983: Abnormality in calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia. *J Clin Invest* 72: 862 - 872
23. Roewer N 1991: Maligne Hyperthermie heute. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 26: 244 - 249
24. Wappler F 2001: Malignant hyperthermia. *Eur J Anaesthesiol* 18: 632 - 652
25. Christian AS, Ellis FR, Hallsal PJ 1989 : Is there an relationship between masseteric muscle spasm and malignant hyperpyrexia ?. *Br J Anaesth*. 1989 ; 62 : 540-544

26. Ellis FR, Harriman DGF, Keaney NP (u.a.) 1971: Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 43: 721 - 722
27. Kalow W, Britt BA, Terrau ME, Haist C 1970: Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet* II: 895 - 898
28. European Malignant Hyperthermia Group 1984: A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anaesth* 56: 1267 - 1269
29. Ording H, Brancadoro V, Cozzolino S (u.a.) 1997: In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: Results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. *Acta Anaesthesiol Scand* 41: 955 - 966
30. Isaacs H, Badenhorst M 1993: False-negative results with muscle caffeine halothane contracture testing for malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 79: 5-9
31. Wedel DJ, Nelson TE 1994: Malignant hyperthermia – diagnostic dilemma: false-negative contracture responses with halothane and caffeine alone. *Anesth Analg* 78: 787 - 792
32. Smith L, Bampton PR: Inheritance of reaction to halothane anaesthesia in pigs. *Genet Res* 1977; 77:29:287-292
33. Harrison GG: Procine malignant hyperthermia. *Lancet* 1991; 337:503
34. Mitchell G, Heffron JJ: Porcine stress syndrom. *Adv Food Res* 1992; 28: 167-230
35. Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F 2000: Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve*
36. Mabry JW, Christian LL, Kuhlert DL 1981: Inheritance of porcine stress syndrom. *J Hered*; 72: 429-430.
37. Reik TR, Rempel WE, McGrath CJ (u.a.) 1983: Further evidence on the inheritance of halothane reaction in pigs. *J Anim Sci*; 57:826-831.
38. Mickelson JR, Gallant EM, Litterer LA (u.a.) 1988: Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodin receptor in malignant hyperthermia. *J Biol Chem*; 263: 9310-5

39. Fuji J, Otsu K, Zorzato F (u.a.) 1991: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Biophys J* 57: 471 - 475
40. MacLennan DH, Duff C, Zorzato F (u.a.) 1990: Malignant Hyperthermia. *Science* 256: 789 - 794
41. Harbitz I, Chowdhary B, Thomsen PD (u.a.) 1990: Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11 – q21 segment of chromosome 6. *Genomics* 8: 243 - 248
42. Steinfath M, Scholz J, Singh S (u.a.) 1996: Welche Bedeutung haben Genotypveränderungen in der Diagnostik der malignen Hyperthermie? *Anaesth Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 31: 334 - 343
43. Jacobson I, Sandberg M, Hamberger A 1985: A Mass transfer in brain dialysis device – a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration. *J. Neurosci. Methods* 15: 263-268
44. Ungerstedt U 1991: Microdialysis-principles and applications in studies in animals and man. *J. Int. Med.* 230: 365-373
45. Larsson C 1991: The use of an “internal standard” for control of the recovery in microdialysis. *Life Scie.* 49: 73-78
46. Amberg G, Lindefors N 1989: Intracerebral microdialysis: II. Mathematical studies of diffusion kinetics. *J. Pharmacol. Methods* 22: 157-183
47. Lonroth P, Jansson P, Smith U 1987: A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am. J. Physiol.* 253: 228-231
48. Hoffman WE, Charbel FT, Edelman G (u.a.) 1997: Brain tissue acid-base changes during ischemia. *Neurosurgical Focus* 2(5): Article 2
49. Mellstrom A, Hartmann M, Jedlinska B (u.a.) 1999: Effect of hyperoxia and hypoxia on subcutaneous tissue gases and pH. An experimental study in pigs. *Eur Surg Res* 31(4): 333-339
50. Soller BR, Heard SO, Cingo NA (u.a.) 2001: Application of fiberoptic sensors for the study of hepatic dysoxia in swine hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 29 (7): 1438-1444
51. Knichwitz G, Rotker J, Brussel T (u.a.) 1996: A new method for continuous intramucosal pCO₂ measurement in the gastrointestinal tract. *Anesth Analg* 83 (1): 6-11

52. Morgan C, Newell SJ, Drucker DA (u.a.) 1999: Continuous neonatal blood gas monitoring using a multiparameter intra-arterial sensor. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 80: F93 – F98
53. Antognini JF 1995 : Creatinin Kinase alterations after acute Malignant Hyperthermia episodes and common surgical procedures. Anesthesia and Analgesia 81 (S): 1039-1042
54. Denborough MA 1998: Malignant hyperthermia. Lancet 352: 1131-1136

Danksagung

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

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. N. Roewer für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, sowie meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Anetseder für seine fortwährende Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meinen Eltern für alles, was Sie mir ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau, die mir in jeder Situation liebe- und verständnisvoll zur Seite steht.

Für meine Tochter Anne

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Nachname: Sachs
Vorname: Michael
Adresse: Rhönweg 25, 97737 Gemünden a. Main
Geburtsdatum: 11.10.1975 in Würzburg
Familienstand: Verheiratet, 1 Kind
Eltern: Gerlinde Sachs – Grundschullehrerin i.R.
Lorenz Sachs – Dipl. Vermessungsingenieur (FH) i.R.

Schulbildung

1982 - 1986	Grundschule:	Gemünden
1986 - 1995	Gymnasium:	Friedrich-List-Gymnasium (Gemünden)

Bundeswehr

1995 - 1996	Sanitätssoldat	1. Panzergrenadierbataillon 352
-------------	-----------------------	---------------------------------

Hochschulbildung

1996 - 2002	Humanmedizin	Julius-Maximilian-Universität, Würzburg
03/1998	Physikum	
04/1999	1. Staatsexamen	
09/2001	2. Staatsexamen	
12/2002	3. Staatsexamen	

Praktisches Jahr

10/2001 – 02/2002	Neurologie	Universitätsklinik Würzburg
02/2002 – 06/2002	Innere Medizin	Universitätsklinik Würzburg
06/2002 – 09/2002	Chirurgie	Universitätsklinik Würzburg

Ärztliche Tätigkeit

03/2003 – 09/2004	Arzt im Praktikum	Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg Prof. Dr. K. Wilms
Ab 10/2004	Assistenzarzt	Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universität Würzburg Prof. Dr. K. Wilms Prof. Dr. H. Einsele

Michael Sachs