

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer**

CHLOROCRESOL ALS  
KONSERVIERUNGSTOFF IN  
MEDIKAMENTEN: SERUMSPIEGEL UND  
IN-VITRO-EFFEKTE BEI VERANLAGUNG  
ZUR MALIGNEN HYPERTHERMIE

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Lutz Ritter**

**aus Salzburg**

**Würzburg, August 2006**



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

**Koreferent:** Prof. Dr. med. N. Roewer

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 6.6.2007

**Der Promovend ist Arzt**



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>-1-</b>
	A. ALLGEMEINES	-1-
	B. GESCHICHTE	-1-
	C. PATHOPHYSIOLOGIE DER MH	-2-
	D. KLINIK	-3-
	E. THERAPIE DER MH	-4-
	F. DIAGNOSTIK DER MH	-5-
	G. CHLOROCRESOL	-6-
<b>II.</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>-8-</b>
<b>III.</b>	<b>METHODIK</b>	<b>-9-</b>
	A. IVCT	-9-
	B. HPLC	-12-
	C. STATISTIK	-14-
	D. METHODIK – MATERIALIEN	-14-
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>-14-</b>
	A. IVCT	-14-
	B. HPLC	-22-
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>-26-</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>-31-</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>-32-</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat	MHEc	Maligne Hyperthermie equivocal coffeine
BGA	Blutgasanalyse	MHEh	Maligne Hyperthermie equivocal halothane
4-CmC	Chlorocresol	MHN	Maligne Hyperthermie non- susceptible
CK	Cretinkinase	MHS	Maligne Hyperthermie susceptible
DMSO	Dimethylsulfoxid	$\mu\text{M}$	Mikromolar
Hz	Hertz	mN	Millinewton
HPLC	High pressure liquid chromatography	PCME	Paracresolmethylether
IE	Internationale Einheiten	R <sub>YR</sub> <sub>1</sub>	Ryanodinrezeptor
ICVT	In-Vitro-Kontraktur-Test	SERCA	Sarkoplasmatische Calcium-ATPase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
$\Lambda$	Lambda	O <sub>2</sub>	Sauerstoff
MH	Maligne Hyperthermie	U/min	Umdrehungen pro Minute





4-CMC ALS  
KONSERVIERUNGSTOFF IN  
MEDIKAMENTEN: SERUMSPIEGEL  
UND IN-VITRO-EFFEKTE BEI  
VERANLAGUNG ZUR MALIGNEN  
HYPERTHERMIE

I. Einleitung

A. Allgemeines

Die Maligne Hyperthermie (MH) stellt unter den zahlreichen und vielfältigen Komplikationen, mit denen der Anästhesist zu rechnen hat, sicher einen Sonderfall dar. Es handelt sich zwar um eine relativ seltene Erkrankung, stellt aber als akute, potentiell tödliche Narkosekomplikation eine der großen Risiken jeder Operation dar. Bei Erwachsenen wird die Häufigkeit der MH auf 1:10.000 bis 1:15.000 geschätzt, für Kinder werden Zahlen zwischen 1:3.000 und 1:15.000 genannt. Die klinische Inzidenz liegt bei etwa 1:30.000, da nicht jeder prädisponierte Patient während der Exposition durch auslösende Substanzen eine MH-Krise entwickelt.<sup>1</sup> Nach derzeitigem Wissensstand ist die MH eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit variabler Penetranz und Expressivität.

B. Geschichte

Die ersten Berichte über MH-Krisen finden sich schon Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts, 1929 beschrieb Ombredanne eine postoperative Blässe und Hyperthermie in Verbindung mit hoher Mortalität bei Kindern, die eine Vollanästhesie erhalten hatten.<sup>2</sup> Allerdings entdeckte er keinen familiären Zusammenhang. 1960 schlossen Denborough und Lovell auf eine genetische Komponente dieser Krankheit, als sie den Fall eines 21-jährigen Australiers mit einer offenen Beinfraktur schilderten, der mehr Angst vor der Anästhesie als vor der Operation hatte, weil 10 Mitglieder seiner Familie unter Äthernästhesie verstorben waren.<sup>3</sup> In einer späteren Arbeit wurde von ihnen ein autosomal-dominanter Erbgang in dieser Familie beschrieben.<sup>4</sup> Diese Beobachtung wurde auch von anderen bestätigt.

Als Hall, Woolf und Bradley dann beim Schwein durch Halothan und Succinylcholin ein MH-ähnliches Krankheitsbild beobachteten<sup>5</sup>, etablierte sich das Tiermodell in der MH-Forschung. Gravenstein und Kirby prägten in diesem Zusammenhang den Begriff „porcine stress syndrome“.<sup>6</sup> Nachdem beim Schwein die Lokalisation des dem „porcine stress syndrome“ zugrunde liegenden Gendefektes gelungen war<sup>7</sup>, erfolgten molekulargenetische Untersuchungen entsprechender Genorte im menschlichen Genom auf dem langen Arm des Chromosoms 19.<sup>8</sup> Auf 19q13.1 konnte ein Ryanodinrezeptorgen lokalisiert werden. Dessen Produkt ist ein Calcium-freisetzender Kanal der terminalen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), dem eine zentrale Rolle bei der Kontraktionsentwicklung in der Skelettmuskulatur zukommt. Obwohl der kodierende Bereich dieses Gens über 15.000 Basenpaare umfasst, sind mittlerweile mehrere Punktmutationen dieses Gens als Ursache der MH beschrieben worden; diese lassen sich allerdings nur bei einigen, längst nicht bei allen MH-Familien nachweisen.<sup>9, 10</sup> Inzwischen sind zahlreiche Punktmutationen bei Patienten mit MH-Veranlagung beschrieben worden.<sup>11, 12, 13</sup> Zurzeit sind über 100 verschiedene Mutationen bekannt, die mit einer MH-Veranlagung einhergehen, für 22 Mutationen ist derzeit der kausale Zusammenhang nachgewiesen.

### C. Pathophysiologie der MH

Der pathophysiologische Vorgang, aufgrund dessen bei einem Anlageträger nach Kontakt mit einer Substanz eine MH-Krise ausgelöst wird, ist immer noch nicht zur Gänze geklärt. Substanzen, die eine MH auslösen, werden Trigger genannt. Anerkannte Trigger sind volatile Inhalationsnarkotika wie Halothan, Enfluran, Isofluran, Desfluran, Sevofluran und depolarisierende Muskelrelaxantien. Von letzteren ist lediglich das Succinylcholin noch im klinischen Gebrauch.

Mit der histologischen und molekulargenetischen Beschreibung und dem biochemischen Verständnis der Funktionsweise des Skelettmuskels wurde auch die Pathophysiologie der MH zunehmend verstanden; für diese Erkenntnis waren Beobachtungen über erhöhten Muskelmetabolismus, unterschwellige Muskelkontrakturen und erhöhte Serumwerte der Creatinkinase (CK) im Blut von betroffenen Personen verantwortlich.

So kann man den Mechanismus, der dem klinischen Bild der MH zugrunde liegt, am Besten als einen Kontrollverlust der intrazellulären Calciumkonzentration beschreiben<sup>14</sup>. In Ruhe liegt die intrazelluläre Calciumkonzentration bei etwa  $1 \times 10^{-7}$  M. Ein Anstieg

der intrazellulären Calciumkonzentration auf etwa  $1 \times 10^{-5}$  M bewirkt die Bindung des Myosin-ADP-Komplexes auf Aktin und stimuliert dadurch die Muskelkontraktion. Jede Myofibrille ist von einem Netzwerk von Membranen umgeben, dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), einem intrazellulärem Calciumspeicher. Die Endplattenpotentiale werden bei ausreichender Dichte überschwellig und lösen ein Aktionspotential entlang der Muskelfaser aus, welches sich in die transversalen Tubuli fortsetzt und dort den spannungsabhängigen Dihydropyridinrezeptor besetzt. Dies führt zu einer Calciumfreisetzung entlang des Konzentrationsgradienten nach intrazellulär. Durch direkte Interaktion des Dihydropyridinrezeptors, wahrscheinlich auf mechanischem Weg, kommt es zu einer Öffnung des Ryanodinrezeptors (RyR<sub>1</sub>), eines Calcium freisetzenden Kanalproteins in der Membran des SR, und dadurch zur massiven Calciumfreisetzung mit anschließender Kontraktion der Faser.

Als wichtigster Transportmechanismus zur Elimination von Calcium aus dem Zytosol funktionieren die sarkoplasmatischen Calcium-ATPasen (SERCA), die nach initialer Calciumfreisetzung aus dem SR das Calcium wieder in das SR zurückpumpen und damit die Relaxation der Muskelfaser bedingen.

Ist die Calciumfreisetzung im Sinne einer MH gestört, bewegen sich die Calciumionen entlang ihres Konzentrationsgradienten aus dem SR in das Myoplasma. Dies wird bedingt durch eine Fehlfunktion des RyR<sub>1</sub>. Normalerweise wird der RyR<sub>1</sub> durch mikromolare Calciumkonzentrationen und millimolare Adenosin-Nucleotid-Konzentrationen aktiviert und durch Calcium- oder Magnesiumkonzentrationen im Millimolarbereich inaktiviert<sup>15</sup>. Wahrscheinlich bewirkt eine Triggersubstanz am RyR<sub>1</sub> eine verstärkte Leitfähigkeit für Calcium und führt folglich zu einer verstärkten Calciumfreisetzung. Calcium vermittelt als second messenger dann die Aktivierung der Aktin-Myosin-Interaktion mit ATP-Verbrauch unter Wärmebildung. Hieraus resultiert eine Steigerung des Muskelstoffwechsels mit erhöhtem O<sub>2</sub>-Verbrauch und CO<sub>2</sub>-Bildung. Zunehmender intrazellulärer ATP- und O<sub>2</sub>-Mangel führt zu anaerober Glykolyse mit Laktatbildung und Entwicklung einer metabolischen Azidose. In der Folge können die energieabhängigen Ionengradienten an den Zellmembranen nicht mehr aufrechterhalten werden, es kommt zur Rhabdomyolyse; klinische Äquivalente sind Anstieg der Serumkonzentrationen von Kalium und Myoglobin sowie Zunahme der CK<sup>9</sup>. Letztlich führt die Krise zum Zelltod.

## D. Klinik

Die MH kann sich in einem akuten und dramatischen Krankheitsbild äußern, oft aber ist der Beginn um Stunden verzögert und kann sich spät oder sogar erst während der Aufwachphase zeigen<sup>16</sup>. Auch die klinische Bandbreite ist sehr variabel, sie reicht von der klassischen fulminanten MH-Krise bis zu differentialdiagnostisch schwierigen, milden Episoden.

Frühzeichen einer MH können Sinustachykardie oder Muskelrigor sein, aber auch fleckige Rötung der Haut oder Abfall der O<sub>2</sub>-Sättigung können erste Hinweise sein. Das spezifischste Frühzeichen für eine MH-Triggerung ist der Anstieg des endexpiratorischen CO<sub>2</sub> in Verbindung mit einer metabolischen Azidose. Die Hyperthermie, ausschlaggebend für den Namen, ist immer ein Spätsymptom.<sup>1</sup> Andere Spätzeichen sind komplexe Arrhythmien, Zyanose, Hypoxämie, Hypotension, Elektrolytveränderungen und Rhabdomyolysen. Die abortive MH-Krise beschreibt eine Situation, die einen Masseterspasmus oder andere klinische Zeichen einer möglichen MH-Triggerung wie metabolische Azidose, Serum-CK-Anstieg, Arrhythmien oder Tachykardien zeigt. Diese müssen differentialdiagnostisch gegen andere hypermetabole oder auch respiratorische Ursachen wie Sepsis, Hyperthyreose und ähnliches abgegrenzt werden.

Die fulminante MH-Krise ist definiert als ein Symptomenkomplex, der unzweifelhaft die Diagnose MH zulässt. Als Folge von Hyperkaliämie, Azidose, Hypoxämie, Hyperthermie und endogener Katecholaminausschüttung zeigen sich nach den oben genannten Frühzeichen häufig komplexe Arrhythmien wie Bigeminus, ventrikuläre Extrasystolen und ventrikuläre Tachykardien. Im weiteren Verlauf entsteht dann eine Rhabdomyolyse, deren Schweregrad am Serum-CK- und Myoglobinverlauf abgelesen werden kann.

Die Diagnosestellung einer durch MH hervorgerufenen Komplikation kann durch einen verzögerten Beginn oder unspezifische Frühzeichen erheblich erschwert sein<sup>16</sup>.

## E. Therapie der MH

Die Therapie der MH beruht neben Sekundärmaßnahmen wie aktiver Kühlung, Pufferung und Vertiefung der Anästhesie durch Opiate, Benzodiazepine, Barbiturate oder Propofol vor allem auf sofortiger Beendigung der Triggerzufuhr sowie auf dem Antidot Dantrolen. Dantrolen hemmt die Freisetzung von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum und reduziert die freie myoplasmatische Calciumkonzentration. Dies

führt zur Abnahme der Muskelkontraktion beziehungsweise des Muskeltonus. Benutzt wurde Dantrolen als Antidot zum ersten Mal 1975 von Harrison am Schwein<sup>17</sup>, seitdem beruht darauf die Kausaltherapie der MH.

#### F. Diagnostik der MH

Obwohl der akute MH-Zwischenfall bei rechtzeitiger Diagnose oft therapiert werden kann, ist natürlich die Diagnosestellung vor dem Zwischenfall wünschenswert. Ende des letzten Jahrhunderts waren noch keine Möglichkeiten zur Diagnosefindung durch genetische Untersuchungen möglich<sup>18</sup>. Screeningversuche fanden noch Anfang 2005 bei 70 % der untersuchten MHS-Probanden eine Mutation<sup>19</sup>, allerdings waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht alle Mutationen einer RYR<sub>1</sub>-Veränderung zuzuordnen. Seit April 2005 bietet die Firma PreventionGenetics einen DNS-Test an, welcher die häufigsten Mutationen (Exons 2, 6, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 39, 40, 44, 45 und 46) einschließt und damit nach Angaben der Firma etwa 30-50 % Detektionsrate bietet. Ein negativer Test schließt jedoch eine MH-Disposition nicht sicher aus.

Der Goldstandard zur Diagnosefindung ist der In-Vitro-Kontraktur-Test (IVCT). Mittels dieses nach dem Protokoll der European Malignant Hyperthermia Group standardisiertem Testes<sup>20</sup>, der eine hohe Sensitivität und eine befriedigende Spezifität besitzt<sup>21</sup>, lassen sich biopsierte Muskelbündel bei MH-Verdacht testen. Dieser Verdacht besteht bei Personen, die schon einmal einen MH-Zwischenfall gezeigt haben, sowie deren Familienangehörigen. Einem in Größe und Länge definiertem Muskelbündel aus dem Oberschenkel des Probanden wird Koffein beziehungsweise Halothan in definierten Konzentrationen zugesetzt, über einen Spannungsmesser wird die Reaktion des Muskels gemessen. Hierzu wird der Muskel in einem Krebs-Ringer-Bad einem definiertem Stromreiz ausgesetzt, die Reaktion des Muskels lässt sich in Form der Kontraktionsamplitude (twitch) in mN und der Ruhespannung des Muskelbündels (baseline), also der Kontraktur, aufzeichnen. Definitionsgemäß wird der Patient als MH-positiv oder MHS( s steht für susceptible) eingestuft, wenn die Muskelprobe auf eine Halothankonzentration von 0,44 mmol/l oder weniger und einer Koffeinkonzentration von 2,0 mmol/l oder weniger mit einer Kontraktur von mindestens 2 mN reagiert. Werden höhere Konzentrationen benötigt, spricht man von MH-negativ oder MHN (n steht für normal). Allerdings gibt es auch Überschneidungen. Ein Patient, dessen Muskel auf den Halothantest positiv und auf den Koffeintest negativ reagiert, wird als

MHEc eingestuft (E steht für equivocal und h für Halothan), bei der umgekehrten Situation als MHEc (c steht für caffeine). Hier handelt es sich um eine diagnostische Grauzone von ca. 7-14 Prozent.<sup>9</sup> Die Probanden dieser Grauzone einer befriedigenden Diagnose zuzuführen, ist Gegenstand aktueller Forschung. In diesem Zusammenhang ist die Substanz Chlorocresol besonders hervorzuheben.

### G. Chlorocresol

Chlorocresol ist ein Phenolderivat, welches von den sechziger Jahren bis in die frühen Achtziger wie Phenol in der Schmerztherapie als intrathekal zu applizierendes Medikament benutzt wurde, hatte aber eine höhere Inzidenz an toxischen Nebenwirkungen als Phenol.<sup>22</sup> Heutzutage wird Chlorocresol als Wirkstoff oder als Konservierungsmittel in verschiedenen Produkten verwendet. Trotz der schon damals bekannt hohen Nebenwirkungen sowie dem Umstand, dass Chlorocresol schon seit mehreren Jahrzehnten in klinischer Verwendung ist, finden sich in der Literatur keine Daten bezüglich Pharmakokinetik und Bioverteilung.

Synonyme für Chlorocresol sind 3-Methyl-4-Chlorophenol, 4-Chloro-3-Hydroxytoluene oder 4-CmC. Es besitzt ein Molekulargewicht von 142,598 g/mol und die Strukturformel  $C_7H_7ClO$ . Da Chlorocresol in vitro sehr spezifisch den  $RYR_1$  aktiviert<sup>23 24</sup>, gilt es derzeit für die Forschung der Malignen Hyperthermie als äußerst interessantes Werkzeug zur möglicherweise exakteren Differenzierung von MH-Anlageträgern, als es bislang der Fall ist<sup>25</sup>.

Chlorocresol ist in folgenden Medikamenten als Wirkstoff enthalten:

- Bacillotox<sup>®</sup> Desinfektionskonzentrat; Chlorocresol 2g/100g
- Bomix<sup>®</sup> Desinfektionskonzentrat; Chlorocresol 8g/100g
- Goldgeist<sup>®</sup> forte ; Chlorocresol 0,9g/100g
- Grotanat<sup>®</sup> Flüssig- Desinfektionskonzentrat für Instrumente; Chlorocresol 8g/100g
- Helipur<sup>®</sup> Desinfektionslösung; Chlorocresol 8,5g/100g
- Ulcurilen; Chlorocresol 0,12g/100g

Chlorocresol ist in folgenden Medikamenten als Konservierungsstoff enthalten:

- Betnesol<sup>®</sup> Creme (Betamethason)
- Celestan<sup>®</sup> Creme/Salbe (Betamethason)
- Cordes Beta<sup>®</sup> Creme (Betamethason)
- Delonal<sup>®</sup> Creme (Alclomethason)
- Dermoxin<sup>®</sup> Creme (Clobetasol-17-propionat)
- Diprogenta<sup>®</sup> Creme/Salbe (Betamethason)
- Diprisone<sup>®</sup> Creme/Salbe (Betamethason)
- Emovate<sup>®</sup> Creme/Salbe (Clobetasonbutyrat)
- Gentamycin<sup>®</sup> Creme (Gentamicinsulfat)
- Liquemin<sup>®</sup> (Heparin-Natrium)
- Mestinon Inj<sup>®</sup> (Pyridostigminbromid)
- Recardin „N“<sup>®</sup> Suspension (Mazerat v. Bac. Firmus SA.C: 501)
- Sulmycin<sup>®</sup> Creme/Salbe (Gentamicinsulfat)
- Thrombophob<sup>®</sup> (Heparin-Natrium)
- Tonoftal<sup>®</sup> Crème (Tolnaftat)
- Utilin<sup>®</sup> Suspension (Mazerat von Bac. Subt. M.U.345)
- Varidase<sup>®</sup> Gel (Streptokinase)

Die Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, die Suchmöglichkeiten nach den Inhaltsstoffen verschiedener Medikamente sind leider teilweise deutlich eingeschränkt. Die Listen wurden mittels der Internetsuchfunktion der Roten Liste<sup>26</sup> erstellt.

## II. Fragestellung

Die Exposition einer Triggersubstanz führt bei einem MH-Anlageträger zu einer Fehlfunktion des RYR<sub>1</sub>, der eine zentrale Rolle bei der Calciumkonzentration im Skelettmuskel intra- und extrazellulär spielt. In der Folge kommt es zu Störungen der Ionengradienten und zum Zelltod. Chlorocresol wiederum aktiviert spezifisch den RYR<sub>1</sub>. Folglich stellt sich die Frage, ob durch die Aktivierung des RYR<sub>1</sub> durch Chlorocresol bei MH-positiven Muskelzellen ein Effekt ausgelöst werden kann, der sich signifikant von MH-negativen Muskelzellen unterscheidet. Klinische Relevanz gewinnt die Frage durch die Tatsache, dass Chlorocresol in verschiedenen Präparaten als Konservierungsstoff enthalten ist, zum Beispiel in den Heparinpräparaten Thrombophob<sup>®</sup> mit 1 mg/ml und Liquemin<sup>®</sup> mit 0,8 mg/ml. Diese Medikamente werden im klinischen Gebrauch häufig verwendet. Bei koronarchirurgischen Patienten wird zeitweise eine intravenöse therapeutische Heparinisierung angewandt, um die Gefahr einer Thrombose zu minimieren. Da im Heparinpräparat Liquemin<sup>®</sup> Chlorocresol in einer Konzentration von 0,8 mg/ml enthalten ist, erhält ein 70 kg schwerer Patient 35.000 IE Heparin, entsprechend 7 ml Liquemin<sup>®</sup>. Darin sind 5,6 mg Chlorocresol enthalten. Daraus ergibt sich die Frage, wie hoch die tatsächlich erreichte Konzentration im Serum bei solchen Patienten ist und ob diese Konzentration ausreicht, um eine Triggerung der MH auszulösen.

In vitro:

Welche Konzentrationen von Chlorocresol in klinisch gebräuchlichen Heparinpräparaten beziehungsweise als Reinsubstanz induzieren eine Kontraktur in isolierten Skelettmuskelbündeln von Patienten mit und ohne MH-Disposition?

In vivo:

Welche Serumkonzentrationen von Chlorocresol werden nach therapeutischer Heparinisierung mit dem chlorocresolhaltigem Medikament Liquemin<sup>®</sup> bei koronarchirurgischen Patienten erreicht?

Kann aus den Ergebnissen in vitro und in vivo das Gefährdungspotential durch chlorocresolhaltige Medikamente für MH-veranlagte Patienten besser eingeschätzt werden?



### III. Methodik

#### A. IVCT

Mit Genehmigung der örtlichen Ethikkommission und mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten wurden isolierte Skelettmuskeln mit beziehungsweise ohne MH-Disposition verschiedenen Chlorocresolkonzentrationen ausgesetzt. Dabei war die zu messende Größe die durch die verschiedenen Konzentrationen hervorgerufenen Kontraktur. Neben gelöstem Chlorocresol wurden den Muskeln auch Liquemin® in ansteigenden Konzentrationen beigefügt, als Kontrollgruppe zudem reines Heparin.

Als geeigneter Versuchsaufbau wurde der IVCT in üblicher Aufbauweise benutzt.

Es wurden 38 Patienten ausgewählt, die sich im Institut für Anästhesiologie der Universität Würzburg auf eine MH-Disposition testen ließen. Als Ausschlusskriterium galten neuromuskuläre Erkrankungen, Einschlusskriterium war der Verdacht auf MH-Disposition. Das Durchschnittsalter betrug 29,8 Jahre, 15 Patienten waren weiblich, die anderen männlich.

Allen Patienten wurde in Lokalanästhesie chirurgisch eine 20x10x5 mm große Muskelprobe aus dem Vastus lateralis des rechten Oberschenkels entnommen. Das Präparat wurde sofort in präoxygenierter Krebs-Ringer-Lösung gelagert und transportiert. Vor der Entnahme haben die Patienten Ihr Einverständnis gegeben, dass diese Muskelprobe zu Diagnostik und Forschung zu benutzen sei. Im Anschluss an die Diagnostik zur Klärung der MH-Disposition nach dem Protokoll der European Malignant Hyperthermia Group wurde der IVCT entsprechend unserer Versuchsanordnung durchgeführt. Dafür wurden überzählige Muskelbündel verwendet. Je nach Menge und Beschaffenheit des Restmuskels konnten noch 2 bis 3 frische Muskelbündel gewonnen werden. Diese mussten den Bedingungen entsprechend ca. 20 mm lang und 200 mg schwer sein. Abweichungen der Länge wurden mit  $\pm 5$  mm akzeptiert, Abweichungen des Gewichtes mit  $\pm 50$  mg. Diese Muskelbündel wurden in einem Bad von 20 ml Volumen eingespannt. Das Bad wurde bis zum Versuchsbeginn mit auf 37 Grad C temperierter Krebs-Ringer-Lösung perfundiert, welche mit einem O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-Gemisch (95%/5%) ständig belüftet wurde. Ein Muskelende wurde am Boden des Bades unbeweglich befestigt, das andere Ende wurde an einem isometrischen Kraftaufnehmer eingehakt, welcher Kraftveränderungen des Muskelbündels über eine Verstärkerbrücke zu einem Plotter weitergibt (Abbildung 1). Die Krebs-Ringer Lösung wurde bis zum eigentlichen Versuchsbeginn ständig ausgetauscht.

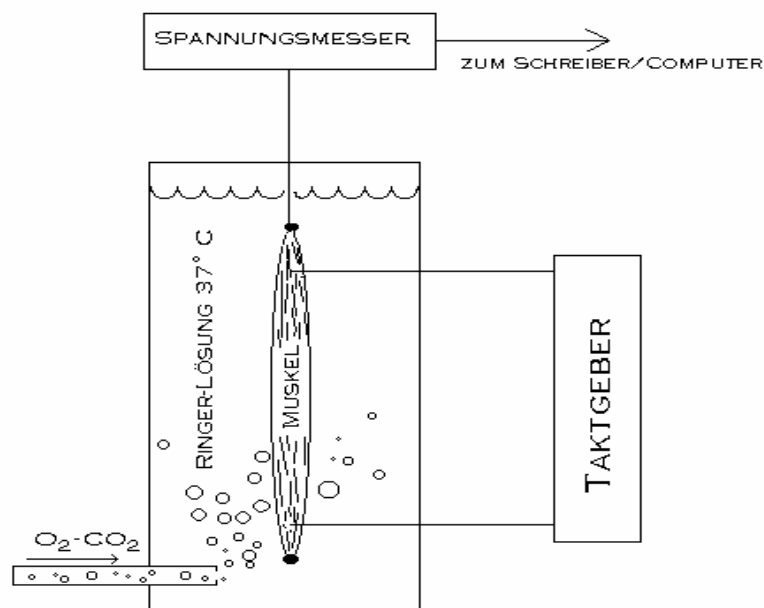


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des In-Vitro-Kontraktur-Testes

Das Muskelbündel wurde mittels eines Taktgebers einem Reiz durch Gleichstrom mit einer Dauer von 1 ms und einer Frequenz von 0,2 Hz und 10 Volt ausgesetzt. Damit zeigte der Muskel alle 5 Sekunden eine Kontraktion (twitch), die über den isometrischen Kraftaufnehmer vom Plotter aufgezeichnet wurde. Zwischen den Kontraktionen befindet sich der Muskel in einer Ruhespannung, die der Plotter als Linie (baseline) darstellt. Die baseline gilt als Maß für die Kontraktur. Eine Kontraktionsamplitude wurde als Auslenkung nach oben gezeichnet. Dabei entsprach 1 mm etwa 1 mN.

Die Muskelbündel wurden auf das 1,5-fache der ursprünglichen Länge vorgedehnt und äquilibriert. Hierfür wurde mit dem Testbeginn solange gewartet, bis die Ruhespannung um weniger als 2 mN innerhalb von 10 min. abnahm bei einer Kontraktionsamplitude von mehr als 10 mN.

Anschließend wurde die Zufuhr der frischen Krebs-Ringer-Lösung gestoppt, so dass bei der folgenden Zumischung der Testsubstanzen keine Verdünnung erfolgte und bei neuerlicher Applikation der Substanz eine Akkumulation gegeben war .

In Abständen von 10 min. wurden dem Bad bestimmte Mengen einer der untersuchten Substanzen zugefügt. Als Ausgangssubstanz diente Liquemin®. Die erste Dosis betrug 25 µl. Damit wirkten 8,7 µM Chlorocresol auf den Muskel ein. Nach 10 min. wurde

dann kumulativ die nächste Dosis hinzugefügt. Bei einer Menge von 50 µl ergab sich eine Konzentration von 26,3 µM Chlorocresol. Weiter folgten 100 µl, 250 µl und 500 µl Liquemin<sup>®</sup>, entsprechend 61,4µM, 149,0 µM und 324,3 µM Chlorocresol, entsprechend der Tabelle 1.

Tabelle 1: Applizierte Dosen von Liquemin<sup>®</sup> sowie die sich daraus ergebende Gesamtstoffmenge an 4-CmC im IVCT

Zeit	Applizierte Dosis Liquemin <sup>®</sup>	Gesamtstoffmenge 4-CmC
0 min.	25 µl	8,7 µM
10 min.	50 µl	26,3 µM
20 min.	100 µl	61,4 µM
30 min.	250 µl	149,0 µM
40 min.	500 µl	324,3 µM

Diese Konzentrationen wurden auch bei den Versuchsreihen mit reinem Chlorocresol erreicht. Aus dem in Liquemin<sup>®</sup> vorgegebenen Mischungsverhältnis von Chlorocresol und Heparin ergab sich die Konzentration für die Heparinkontrollreihe. In Abbildung 2 ist zur Verdeutlichung der gewonnenen Daten exemplarisch eine mit diesem Test erzeugte Kurve dargestellt. Dabei handelt es sich um ein MH-positives Muskelbündel, welches kumulativen Dosen Chlorocresol entsprechend dem oben angeführten Protokoll ausgesetzt wurde.

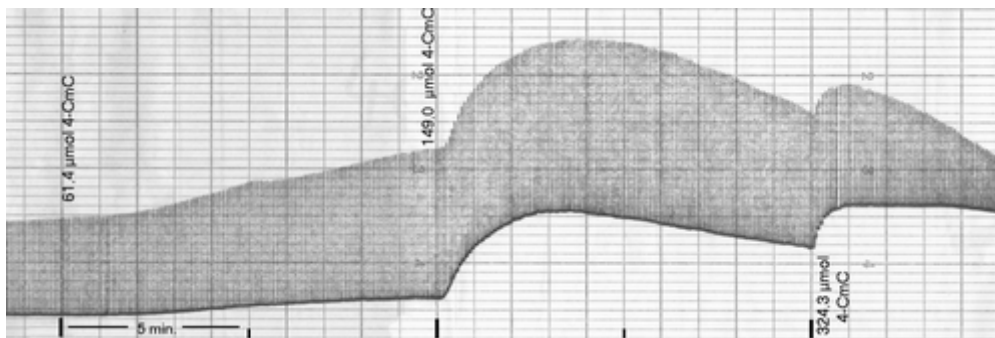


Abbildung 2: Plotterausdruck eines MH-Positiven Muskelbündels unter kumulativer Chlorocresolbelastung im IVCT

## B. HPLC

Als zweites untersuchten wir, welche Serumkonzentrationen von Chlorocresol bei koronarchirurgischen Patienten erreicht werden, die therapeutisch mit dem chlorocresolhaltigen Medikament Liquemin® heparinisiert werden.

Hierfür wählten wir Patienten der Klinik und Poliklinik für Herz, Thorax und thorakale Gefäßchirurgie der Universität Würzburg aus, die sich der Anlage eines aortocoronaren Venenbypasses unterzogen und vor Anschluss der extrakorporalen Zirkulation eine intravenöse Heparindosis von 500 IE pro kg Körpergewicht erhielten. Als Einschlusskriterien galten das Fehlen einer neuromuskulären Erkrankung, ebenso durfte keine MH-Disposition in der Familie bekannt sein. Bei diesen Patienten wurde im Anschluss an die Heparin-gabe nach verschiedenen Zeitpunkten eine venöse Blutabnahme durchgeführt. Die erste Blutentnahme erfolgte 1 Minute nach der Heparininjektion, die zweite zwischen 2 und 50 Minuten später und die dritte Entnahme zwischen 60 und 90 Minuten nach der Heparin-gabe. Das Blut wurde umgehend zentrifugiert und schockgefroren.

Um die Serumkonzentration von Chlorocresol in diesen Blutproben zu messen, mussten wir ein Verfahren entwickeln, welches für diese Fragestellung geeignet ist. Die bisherigen Messverfahren zur Detektion von Chlorocresol sind für die Detektion in chemischen Lösungen entwickelt worden, nicht zur Detektion im Serum, und waren deshalb auch nicht auf unsere Fragestellung übertragbar.<sup>27, 28, 29</sup> Wir entschieden uns zur Messung der Chlorocresolkonzentration für die „high pressure liquid chromatography“ (HPLC), die sich sehr gut zur Messung auch äußerst geringer Konzentrationen eines Stoffes eignet. Bei einer solchen Messung fließt eine Substanz durch eine mit Gel gefüllte Säule. Je nach Molekülgröße und Polarität fließt der Stoff langsamer oder schneller. Nach Durchquerung der Säule wird chromatographisch die Lichtauslöschung durch die Substanz gemessen. Die Extinktion entspricht dabei proportional der Menge der gemessenen Substanz. Die Flussgeschwindigkeit ist von Stoff zu Stoff verschieden, so dass bei verschiedenen Stoffen zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Extinktion gemessen werden kann. Die Messungen werden über einen Plotter als Zeit-Extinktions-Kurve ausgegeben, wobei die Extinktion durch eine Auslenkung der Kurve nach oben, als „peak“, dargestellt wird. Solche „peaks“ werden automatisch erkannt und das Integral des peaks als Zahlenwert ausgegeben. Der Aufbau unserer HPLC-Anlage ist in Abbildung 3 dargestellt.

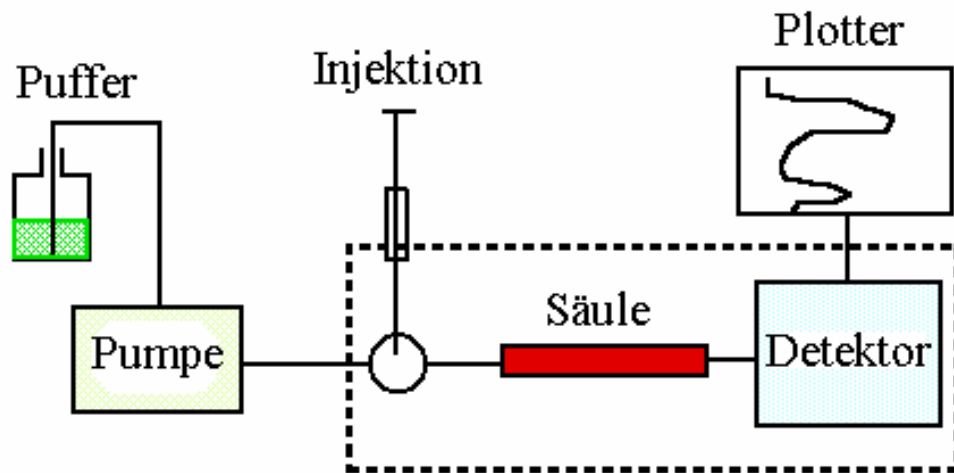


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der HPLC

Jeder Probe wurde ein interner Standard hinzugefügt. Dabei handelt es sich um einen Stoff, welcher zu einem bekannten Zeitpunkt einen der Konzentration entsprechenden peak auslöst. Damit lassen sich Messfehler durch Abweichungen in den jeweils injizierten Mengen berichtigen.

Um Referenzwerte für unseren Versuchsaufbau zu erlangen, wurde das Serum von zwei freiwilligen Versuchspersonen *in vitro* mit bekannten Mengen von Chlorocresol inkubiert, so dass sich Serumkonzentrationen von 2  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 100  $\mu\text{M}$  ergaben. Mit diesen Seren konnten dem Versuchsprotokoll entsprechend Referenzextinktionen erstellt und die untere Nachweisgrenze bestimmt werden.

Nach dem Auftauvorgang der Seren wurden 990  $\mu\text{l}$  Serum als interner Standard 10  $\mu\text{l}$  20 mM Parachresolmethylether (PCME), gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO), hinzugefügt. Anschließend wurde mit 1 M Salzsäure der pH auf 1 eingestellt und 1 g NaCl gelöst. Dann wurden 3 ml Ethylacetat hinzugefügt. Nach 10 min Schütteln der Lösung und anschließend 5 min. Zentrifugation bei 1500 U/min. wurden 10  $\mu\text{l}$  des Überstandes in die HPLC injiziert. Als Pufferlösung benutzten wir Ammoniumacetat und Acetonitril im Verhältnis 68:32, die Wellenlänge betrug  $\lambda = 228 \text{ nm}$ . Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Der an die HPLC angeschlossene Plotter druckte eine Extinktionskurve aus, zudem wurde das Integral jedes peaks bestimmt und als absolute Zahl ausgegeben. Durch Vergleich der Integralwerte der Extinktionspeaks der

Referenzseren mit denen der Versuchspersonen ließen sich die Konzentrationen von Chlorocresol und von PCME als internem Standard berechnen.

### C. Statistik

Eine Normalverteilung der Daten war nicht vorauszusetzen. Die Daten wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney auf signifikante Unterschiede untersucht. Der U-Test ist ein Test auf Verschiedenheit einer Variablen in zwei unabhängigen Kollektiven. Es wurden die Wahrscheinlichkeiten für diese Verschiedenheiten errechnet und mit  $p$  angegeben, Signifikanz wurde bei Werten von  $p < 0,05$  definiert.

### D. Methodik – Materialien

1. Chlorocresol: MERCK-Schuchardt, D-8011 Hohenbrunn, Art. Nr. 802295
2. m-Cresol: FLUKA Chemika, D-89231 Neu-Ulm, Analysis-Nr. 336699/1 1094
3. Liquemin<sup>®</sup>: 5 ml, N 25.000 IE Heparin, Immuno GmbH, D-69126 Heidelberg, Reg.Nr. 47197
4. Heparin: 250 mg, AppliChem, D-64291 Darmstadt, Art.Nr. A3004
5. Multi-Pen-Recorder: Rikadenki, Model R-64 No. Z 7110453
6. Stimulator: I Type 215/I, Hugo-Sachs-Elektronik, D-7806 March
7. Waters automated gradient controller Millipore, Serial No. 680-008628
8. Waters 510 HPLC pump Millipore, Serial No. 510-FR-3256
9. Waters 486 Tunable absorbance detector Millipore Serial No. 486-PRA961
10. Waters 746 Data module Millipore Serial No. 031/765-101437, Model No. 54076
11. Säule: Nova-Pak<sup>®</sup> C18, 3,9 x 150 mm, Serial No. T21201 P26
12. Ammoniumacetat: Omikron GmbH, D-74382 Neckarwestheim, Art. Nr. 10-0033
13. Acetonitril: Merck Darmstadt, Art. Nr. 1133582500

## IV. Ergebnisse

### A. IVCT

Von 34 getesteten Patienten wurden nach dem Protokoll der European Malignant Hyperthermia Group 15 Patienten als MHS und 19 als MHN klassifiziert. Beide diagnostischen Gruppen waren in Bezug auf Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht vergleichbar (Tabelle 2).

Tabelle 2: Demographische Charakteristika und Standardabweichungen der Patienten, mit deren Skelettmuskeln die Versuchsreihen im IVCT durchgeführt wurden

	MHS (n = 15)	MHN (n = 19)
Durchschnittsalter in Jahren	33,2 ± 9,0	27,9 ± 9,7
Männer/Frauen	10 / 5	10 / 9
Durchschnittsgröße in cm	172 ± 13	167 ± 14
Durchschnittsgewicht in kg	75,5 ± 16,3	68,6 ± 16,2

Ebenso waren die Skelettmuskelbündel, die für diese Untersuchung benutzt wurden, bezüglich Gewicht, Länge und Vordehnung vergleichbar (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mediane der Charakteristika der im IVCT untersuchten Skelettmuskelbündel (1.-3. Quartil)

	Liquemin®		4-CmC		Heparin	
	MHS	MHN	MHS	MHN	MHS	MHN
Anzahl n	6	9	7	6	6	10
Gewicht (mg)	250 (220-250)	230 (180-230)	240 (225-250)	215 (210-235)	230 (205-247,5)	200 (160-240)
Länge (mm)	18,5 (17,25-21,25)	19 (15-20)	17 (16-18)	20,5 (17,75-21,75)	18,5 (18-19)	18 (17-22)

Wie im diagnostischen IVCT wurde ein Anstieg der Ruhespannung als Äquivalent für die Kontraktorentwicklung aufgezeichnet. Aus diesem Grund wurde der niedrigste Punkt der Ruhespannung als Referenzpunkt gewählt. Damit lassen sich Veränderungen der Ruhespannung direkt vergleichen. Aus den aufgezeichneten Kurven wurden in 5-minütigen Abständen, beginnend beim Zeitpunkt der ersten Injektion (predrug), die Änderung der Kontraktur und die Kontraktionsamplitude abgelesen. Nach der oben angeführten Datenkonvertierung, bei der der niedrigste Wert der jeweiligen

Ruhspannung gleich Null gesetzt wurde, ließen sich die Tabellen 4 bis 6 sowie die Diagramme 1 bis 3 mit Medianen und 1.-3. Quartilen erstellen.



Tabelle 4: Mediane in mN, 1. und 3. Quartile der baseline von Liquemin® bei MHS- (n=6) und MHN-Muskelbündeln (n=9). Kumulative Gabe von Liquemin®, die angegebenen Konzentrationen entsprechen den jeweiligen Chlorocresolkonzentrationen. Predrug entspricht dabei dem auf Null gesetztem Wert der baseline vor der ersten Liqueminapplikation, die folgenden Werte ergeben sich aus den Änderungen der baseline in Bezug auf den predrug-Wert

Diagnose	MHS			MHN		
	Median(mN)	1. Quartil	3. Quartil	Median(mN)	1. Quartil	3. Quartil
Predrug	0	0	0	0	0	0
5 min., 8,7 µmol	0	0	1,875	0	0	0
10 min., 8,7 µmol	0	0	1,875	0	0	0
15 min., 26,3 µmol	0	0	3,75	0	0	0
20 min., 26,3 µmol	0	0	3,75	0	0	0
25 min., 61,4 µmol	7,25	1,75	11,25	0	0	0
30 min., 61,4 µmol	8	2,25	11,88	0	0	0
35 min., 149 µmol	19,25	13,75	26,25	4	0	10
40 min., 149 µmol	17	11,75	23,75	7	0	10
45 min., 324,3 µmol	24,75	22,5	27,38	18	15	18
50 min., 324,3 µmol	19,5	12,25	20	10	8	12

Diagramm 1: Vergleich von Medianen mit 1.-3. Quartilen von MHS- (n=6) und MHN-Muskelbündeln (n=9), die im IVCT kumulierten Konzentrationen von im Liquemin® enthaltendem Chlorocresol ausgesetzt wurden. Predrug entspricht dem Wert der baseline vor der ersten Gabe von Liquemin® und wurde gleich Null gesetzt. In Abständen von 10 Minuten wurden daraufhin bestimmte Mengen von Liquemin® zugesetzt, welche den angeführten Konzentrationen von Chlorocresol entsprachen. In Abständen von 5 Minuten wurde der Wert der baseline abgelesen und die Änderungen in Bezug auf den auf Null justierten predrug-Wert in das Diagramm eingefügt.

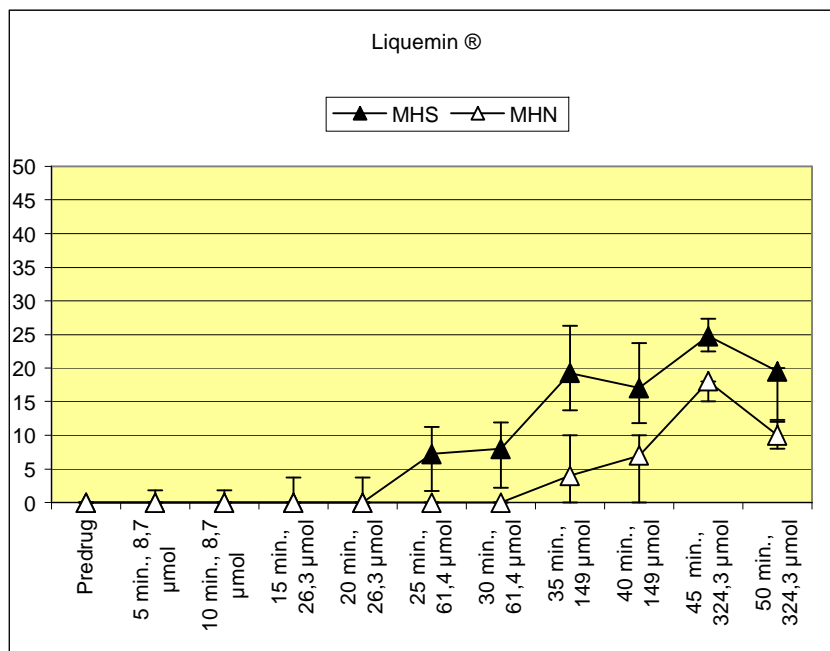


Tabelle 5: Mediane und 1.-3. Quartile der Baseline von nativem Heparin bei MHS- (n=6) und MHN-Muskelbündeln (n=10). Kumulative Gabe von Heparin in Dosen, die denjenigen von Liquemin® entsprechen. Zum besseren Vergleich wurden die Daten entsprechend den jeweiligen Chlorocresolkonzentrationen bei Liquemin® eingetragen. Predrug entspricht dabei dem auf Null gesetztem Wert der Baseline vor der ersten Heparinapplikation, die folgenden Werte ergeben sich aus den Änderungen der Baseline in Bezug auf den Predrug-Wert.

Diagnose	MHS			MHN		
	Median(mN)	1. Quartil	3. Quartil	Median(mN)	1. Quartil	3. Quartil
Predrug	0	0	0	0	0	0
5 min., 8,7 µmol	0	0	0	0	0	0
10 min., 8,7 µmol	0	0	0	0	0	0
15 min., 26,3 µmol	0	0	0	0	0	0
20 min., 26,3 µmol	0	0	0	0	0	0
25 min., 61,4 µmol	0	0	0	0	0	0
30 min., 61,4 µmol	0	0	0	0	0	0
35 min., 149 µmol	0	0	0	0	0	0
40 min., 149 µmol	0	0	0	0	0	0
45 min., 324,3 µmol	0	0	0	0	0	0
50 min., 324,3 µmol	0	0	0	0	0	0

Diagramm 2: Vergleich von Medianen mit 1.-3. Quartilen von MHS- (n=6) und MHN-Muskelbündeln (n=10), die im IVCT kumulierten Konzentrationen von nativem Heparin ausgesetzt wurden. Predrug entspricht dem Wert der baseline vor der ersten Heparin-gabe und wurde gleich Null gesetzt. In Abständen von 10 Minuten wurden daraufhin bestimmte Mengen von Heparin zugesetzt, entsprechend der jeweiligen Menge und damit Heparinkonzentration von Liquemin®. Zum besseren Vergleich sind die jeweils bei Liqueminapplikation auftretenden Chlorocresolkonzentrationen angegeben. In Abständen von 5 Minuten wurde der Wert der baseline abgelesen und die Änderungen in Bezug auf den auf Null justierten predrug-Wert in das Diagramm eingefügt.

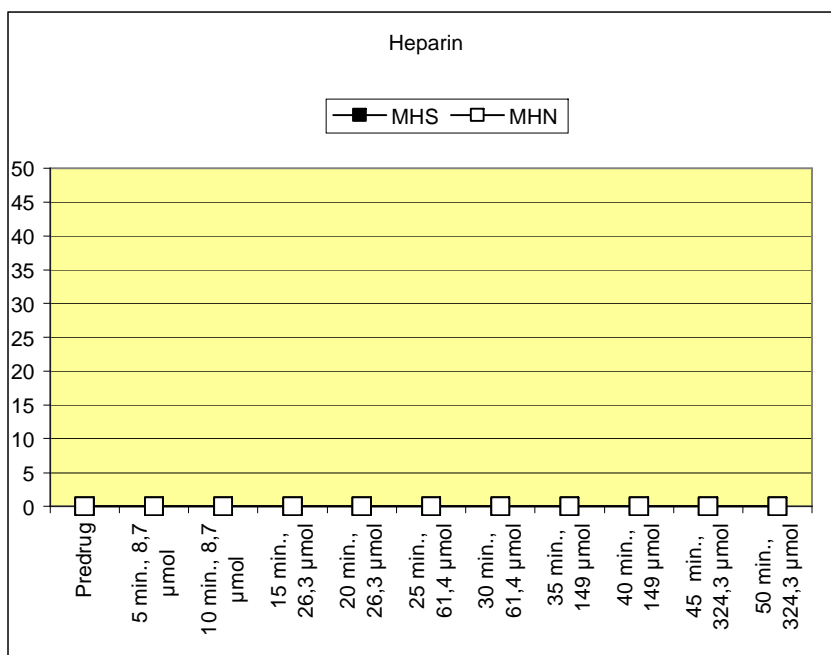
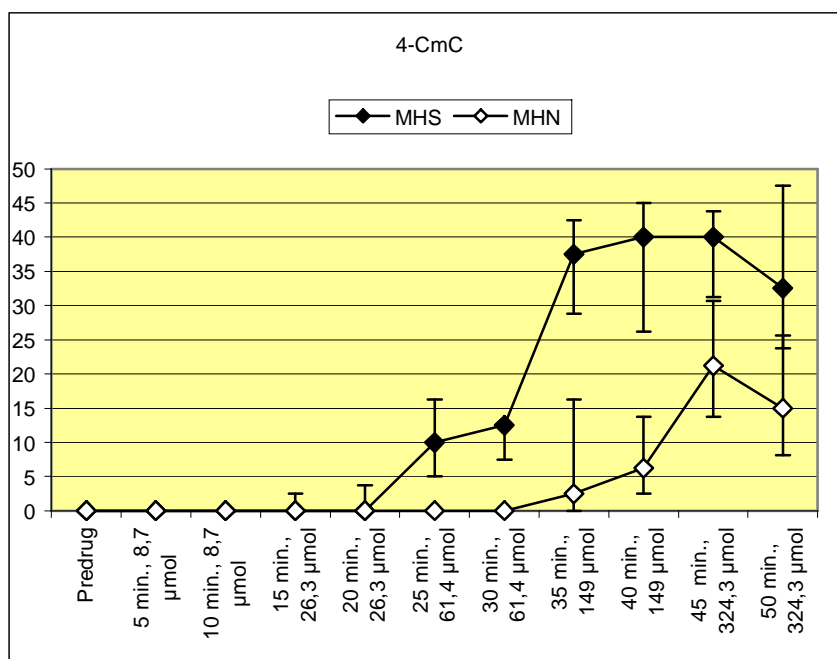


Tabelle 6: Mediane mit 1.-3. Quartilen der baseline von Chlorocresol bei MHS- (n=7) und MHN-Muskelbündeln (n=6). Kumulative Gabe von Chlorocresol. Predrug entspricht dabei dem auf Null gesetztem Wert der baseline vor der ersten Chlorocresol-Applikation, die folgenden Werte ergeben sich aus den Änderungen der baseline in Bezug auf den predrug-Wert.

Diagnose	MHS			MHN		
	Median(mN)	1. Quartil	3. Quartil	Median(mN)	1. Quartil	3. Quartil
Predrug	0	0	0	0	0	0
5 min., 8,7 µmol	0	0	0	0	0	0
10 min., 8,7 µmol	0	0	0	0	0	0
15 min., 26,3 µmol	0	0	2,5	0	0	0
20 min., 26,3 µmol	0	0	3,75	0	0	0
25 min., 61,4 µmol	10	5	16,25	0	0	0
30 min., 61,4 µmol	12,5	7,5	12,5	0	0	0
35 min., 149 µmol	37,5	28,75	42,5	2,5	0	16,25
40 min., 149 µmol	40	26,25	45	6,25	2,5	13,75
45 min., 324,3 µmol	40	31,25	43,75	21,25	13,75	30,63
50 min., 324,3 µmol	32,5	23,75	47,5	15	8,125	25,63

Diagramm 3: Vergleich von Medianen mit 1.-3. Quartilen von MHS- (n=7) und MHN-Muskelbündeln (n=6), die im IVCT kumulierten Konzentrationen von Chlorocresol ausgesetzt wurden. Predrug entspricht dem Wert der baseline vor der ersten Gabe von Chlorocresol und wurde gleich Null gesetzt. In Abständen von 10 Minuten wurden daraufhin bestimmte Mengen von Chlorocresol zugesetzt. In Abständen von 5 Minuten wurde der Wert der baseline abgelesen und die Änderungen in Bezug auf den auf Null justierten predrug-Wert in das Diagramm eingefügt.



In den folgenden Diagrammen werden nun die Ergebnisse für MHS- und MHN-Muskelbündel getrennt dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Kontraktur nur bei Liquemin® und bei reinem Chlorocresol zunimmt. Demgegenüber findet sich keine Kontrakturzunahme bei reinem Heparin. Folglich beruht der Effekt der Kontrakturzunahme auf der Wirkung von Chlorocresol. Zudem finden sich nicht nur bei MHS-Muskelbündeln, sondern auch bei MHN-Muskeln Kontrakturzunahmen unter Einwirkung von Chlorocresol. Dieses geschieht allerdings erst bei höheren Konzentrationen von Chlorocresol und in signifikant geringer ausgeprägtem Maß.

Diagramm4: baseline-Mittelwerte von MHS-Muskelbündeln unter Einwirkung verschiedener Medikamente/Substanzen in kumulativ steigenden Konzentrationen. Die Skalierung bezieht sich auf die Chlorocresol-Konzentration.

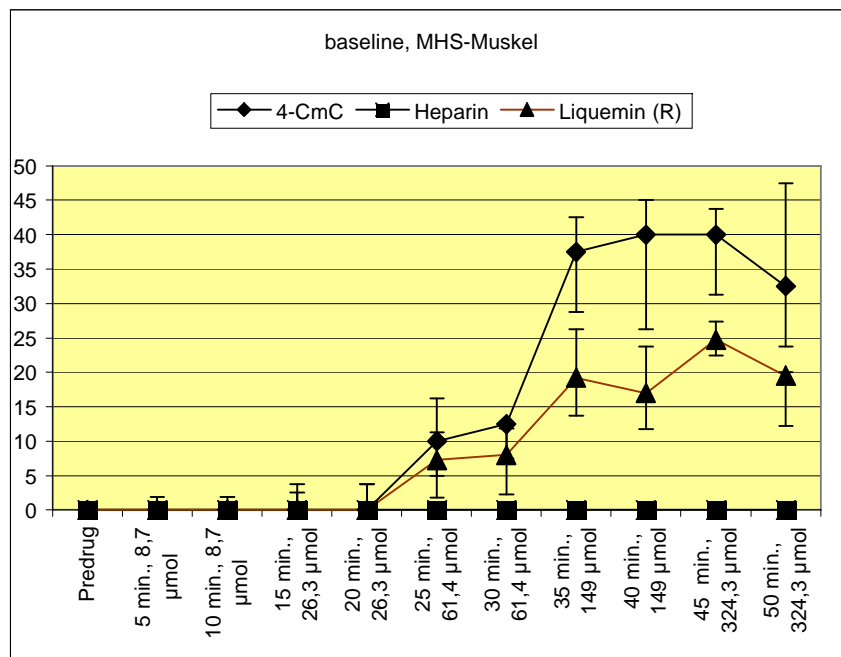
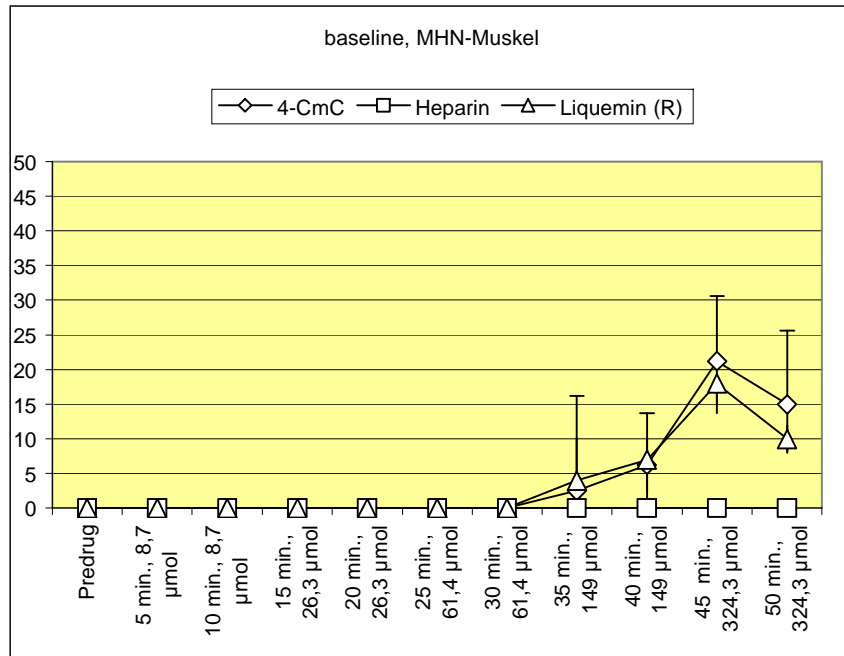


Diagramm 5: baseline-Mittelwerte von MHN-Muskelbündeln unter Einwirkung verschiedener Medikamente/Substanzen in kumulativ steigenden Konzentrationen. Die Skalierung der X-Achse bezieht sich auf die Chlorocresolkonzentration.



Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels U-Test nach Mann und Whitney. Mit diesem Test wird der Unterschied zwischen zwei unabhängigen Kollektiven hinsichtlich einer ordinal skalierten Variablen getestet. Der Vergleich der beiden Gruppen MHS und MHN für die jeweiligen Medikamente beziehungsweise Substanzen kommt zu den in Tabelle 7 dargestellten Ergebnissen.

Tabelle 7: U-Test nach Mann und Whitney für die getesteten Substanzen / Medikamente, verglichen werden jeweils MHN und MHS-Muskelbündel, grau unterlegt und mit Sternchen versehen sind die signifikant unterschiedlichen Ergebnisse (für  $p < 0,05$ )

	Liquemin®	Heparin	Chlorocresol
Predrug	0,5	0,5	0,5
5 min. bei 8,7 $\mu\text{M}$	0,036	0,5	0,5
10 min. bei 8,7 $\mu\text{M}$	0,036	0,5	0,455
5 min. bei 26,3 $\mu\text{M}$	0,119	0,5	0,041 *
10 min. bei 26,3 $\mu\text{M}$	0,119	0,5	0,041 *
5 min. bei 61,4 $\mu\text{M}$	0,024 *	0,5	0,007 *
10 min. bei 61,4 $\mu\text{M}$	0,012 *	0,5	0,006 *
5 min. bei 149 $\mu\text{M}$	0,022 *	0,5	0,006 *
10 min. bei 149 $\mu\text{M}$	0,022 *	0,5	0,002 *
5 min. bei 324,3 $\mu\text{M}$	0,086	0,207	0,027 *
10 min. bei 324,3 $\mu\text{M}$	0,13	0,5	0,022 *

## B. HPLC

Der Zeitpunkt der Extinktion durch Chlorocresol lag in unserem Versuchsaufbau bei 5,51 min.  $\pm$  0,2 nach Injektion, derjenige des internen Standards PCME bei 10,03 min  $\pm$  0,4. Ein Plotterausdruck eines Testdurchlaufes mit 100  $\mu\text{M}$  Chlorocresol und 100  $\mu\text{M}$  PCME als internem Standard ist in Abbildung 4 dargestellt.

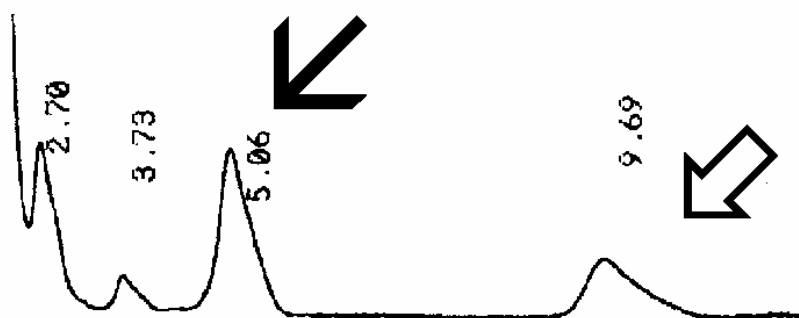


Abbildung 4: HPLC-Plotterausdruck eines Testserums mit 100  $\mu\text{M}$  Chlorocresol (schwarzer Pfeil) und 100  $\mu\text{M}$  PCME als internem Standard (weißer Pfeil)

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurden Seren mit 100  $\mu\text{M}$ , 19  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  und 800 nM Chlorocresol erstellt und nach dem oben angeführten Verfahren behandelt und in die HPLC injiziert. Dabei waren 4  $\mu\text{M}$  Chlorocresol und mehr reproduzierbar nachweisbar. Von 5 Messdurchgängen mit einer Serumkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  Chlorocresol wurde lediglich bei 3 Durchgängen ein peak gemessen, bei den anderen beiden war kein peak nachweisbar. Demnach lag unsere untere Nachweisgrenze für Chlorocresol bei 4  $\mu\text{M}$ .

Tabelle 8: Messdurchgänge zur Bestimmung der unteren Nachweiskonzentration von Chlorocresol im Blut mit der HPLC

Installierte Chlorocresolkonzentration in $\mu\text{M}$	Durchgänge n =	Davon ohne Peakdetektion
100	4	0
10	4	0
5	3	0
4	7	0
3	6	2
2	4	3
1	4	4
0,8	3	3

Zudem lässt sich mit dem Berechnungsprogramm der HPLC aus den gewonnenen Daten ein der Konzentration äquivalentes Integral berechnen. 100  $\mu\text{M}$  Chlorocresol entsprechen dabei 187497 Einheiten. 100  $\mu\text{M}$  PCME als interner Standard entsprechen 116472 Einheiten.

Es wurde das Blut von 12 Patienten untersucht, die demographischen Charakteristika sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Demographische Charakteristika mit Standardabweichungen der Patienten, in deren Seren die Chlorocresolkonzentration mittels HPLC gemessen wurde

Anzahl (n)	12
Durchschnittsalter in Jahren	64,9 ± 8
Männer / Frauen	8 / 4
Durchschnittliche Größe in cm	171,8 ± 12
Durchschnittliches Gewicht in kg	78,8 ± 15

Die von uns gewünschten Zielzeiten der Blutabnahmen, nämlich 1 Minute, 30 Minuten und 100 Minuten nach der Gabe von Liquemin®, ließen sich aufgrund der intraoperativen individuellen Situation nicht immer exakt einhalten, so dass wir deutlich voneinander abweichende Zeitpunkte erhalten haben. Es ergaben sich die in Tabelle 10 dargestellten Abnahmezeiten.

Tabelle 10: Durchschnittliche Zeitpunkte und Standardabweichungen der Blutabnahme nach intravenöser Applikation von 500 IE in Liquemin® enthaltenem Heparin pro kg Körpergewicht

Zeitpunkt der ersten Blutentnahme nach Gabe von Liquemin® in min.	1 ± 0
Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme nach Gabe von Liquemin® in min.	42 ± 25
Zeitpunkt der dritten Blutentnahme nach Gabe von Liquemin® in min.	108 ± 38

Es wurden jeweils drei Versuche pro Serumprobe durchgeführt. Wir suchten jeweils nach einem Peak zu einem für Chlorocresol spezifischen Zeitpunkt nach Injektion in die HPLC. In keiner der Serumproben fanden sich reproduzierbare Peaks. Lediglich vereinzelt wurden Extinktionen gemessen, diese waren allerdings nicht reproduzierbar und sind damit eher auf Verunreinigungen oder Ungenauigkeiten bei der Messung zurückzuführen. Die in Chlorocresolkonzentrationen umgerechneten Integrale dieser vereinzelt Extinktionen finden sich in Tabelle 11.



Tabelle 11: Anzahl der insgesamt entdeckten peaks zum für Chlorocresol spezifischen Zeitpunkt sowie deren theoretische durchschnittliche Chlorocresoläquivalenzdosis

	Anzahl aller Proben	Anzahl der entdeckten peaks	Äquivalenzkonzentration von Chlorocresol
Erste Blutabnahme	36	1	6,6 µM
Zweite Blutabnahme	36	5	1,6 µM
Dritte Blutabnahme	36	8	1,4 µM

## V. Diskussion

Die Diagnostik der Malignen Hyperthermie (MH) ist immer noch problematisch. Genetische Tests sind zwar billiger und weniger aufwändig als der In-Vitro-Kontraktur-Test (IVCT) allerdings lässt sich nur bei etwa 30-70 % der untersuchten Probanden bei gesicherter MH-Disposition ein bekannter genetischer Defekt nachweisen.<sup>19</sup> Der IVCT als Goldstandard ist zwar unangefochten, allerdings lassen sich immerhin 7-14 % des untersuchten Kollektivs nicht eindeutig in MHS und MHN, also Probanden mit oder ohne MH-Disposition, einteilen<sup>9</sup>. Bei Probanden dieser Grauzone fällt entweder der Koffein- oder der Halothantest negativ aus, während der jeweils andere positiv ausfällt. Sie werden dementsprechend in MHEc (positiver Koffeintest) oder MHEh (positiver Halothantest) eingeteilt. Bei diesen Probanden lässt sich also eine MH weder ausschließen noch nachweisen. Die daraus resultierende Notwendigkeit einer Verbesserung der derzeitigen Diagnostik ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In diesem Zusammenhang wird in letzter Zeit die Substanz Chlorocresol diskutiert. Bei der MH ist die Calciumfreisetzung aufgrund einer Fehlfunktion des Ryanodinrezeptors (R<sub>YR</sub><sub>1</sub>) in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) gestört. Chlorocresol wiederum aktiviert spezifisch den R<sub>YR</sub><sub>1</sub> in vitro. Daraus ergeben sich in weiterer Folge Fragen über eine mögliche Triggerung der MH durch Chlorocresol, aber auch über Gefahren durch den alltäglichen Gebrauch von Chlorocresol, welches in verschiedenen klinisch gebräuchlichen Medikamenten als Konservierungsstoff enthalten ist. Ziel dieser Arbeit war einerseits zu klären, ob mittels Chlorocresol eine genauere Diagnostik der MH möglich ist, andererseits sollte die klinische Relevanz der MH-Triggerung durch Chlorocresol geklärt werden.

Wie schon in einigen Arbeiten gezeigt wurde, könnte man Chlorocresol als weiteres Werkzeug im IVCT mit Halothan und Koffein einsetzen, eventuell diese sogar ersetzen. In einer europäischen Multicenterstudie, bei der zusätzlich zum standardisierten IVCT mit Halothan und Koffein ein IVCT mit einer Bolusgabe von 75µM 4-CmC durchgeführt wurde, zeigten 16 von 43 MHE-Muskelbündel eine signifikante Kontraktur. Bei hoher Sensitivität (96,1%) und Spezifität (99%) könnte auch laut dieser Studie der Gebrauch von 4-CmC die Zuverlässigkeit der Tests steigern.<sup>30</sup>

Auch in unserer Arbeit zeigt sich, dass sich der Effekt, den Chlorocresol auf MHS-Muskelbündel ausübt, signifikant von dem Effekt unterscheidet, der auf MHN-Muskelbündel ausgeübt wird.

Wir führten mittels IVCT verschiedene Testreihen durch. Aus der Vielzahl der chlorocresolhaltigen Medikamente wurde als Vertreter Liquemin® ausgewählt, um eine möglichst praxisnahe Relevanz der Ergebnisse aufzuweisen. Verglichen wurden die möglichen Effekte durch Kontrolltestreihen mit den jeweiligen Wirkstoffen Heparin und Chlorocresol in äquipotenten Konzentrationen. Dadurch lässt sich nachweisen, ob Effekte durch Heparin, Chlorocresol oder eine dritte Substanz beziehungsweise eine Kombination verschiedener Stoffe ausgelöst wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Liquemin® einen Effekt sowohl auf die Ruhespannung als auch auf die Kontraktionsamplitude der getesteten Skelettmuskelbündel haben. Bei allen Muskeln zeigte sich ein Anstieg der Ruhespannung als Maß für die Kontraktur, sowohl bei MHS- als auch bei MHN-Skelettmuskelbündeln. Für unsere Fragestellung interessant waren nun Unterschiede zwischen den beiden Gruppen MHS und MHN. Hier zeigten sich wie erwartet signifikante Unterschiede bei Konzentrationen über 26,3 µM Chlorocresol. Bei MHS-Muskelbündeln konnte nach 5 Minuten ein Anstieg der Ruhespannung ab dieser Chlorocresolkonzentration gemessen werden, der sich signifikant vom Anstieg der Ruhespannung bei MHN-Muskeln unterschied. Im Einzelfall lässt sich auch schon bei geringeren Konzentrationen ein Anstieg der Ruhespannung messen, teilweise sogar schon bei unserer geringsten Dosis von 8,7 µM Chlorocresol. Ein signifikanter Unterschied lässt sich allerdings nicht nachweisen. Wahrscheinlich beruhen solche vereinzelt Anstiege auf Messungenauigkeiten, sie könnten allerdings auch auf individuell unterschiedlich ausgeprägter Sensibilität der Muskelbündel auf Chlorocresol zurückzuführen sein.

Ein qualitativ und quantitativ entsprechender Effekt findet sich nach Analyse der Testreihen nur bei Chlorocresol, nicht aber bei Heparin. Folglich ist die Kontrakturzunahme, die bei MHS-Muskeln schon bei geringeren Konzentrationen als bei MHN-Muskeln nachzuweisen ist, auf den Anteil an Chlorocresol in den Medikamenten zurückzuführen. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich folgern, dass neben Halothan und Koffein auch Chlorocresol ein geeignetes Werkzeug darstellt, um im IVCT signifikante Unterschiede zwischen MHS- und MHN-Muskelbündeln zu zeigen

und damit eventuell in Ergänzung zu Koffein und Halothan im IVCT eine genauere Diagnostik der MH-Disposition zu ermöglichen.

Da offensichtlich Chlorocresol ein MH-Trigger ist, ergeben sich daraus nicht nur Möglichkeiten in der Diagnostik der MH. Chlorocresol ist in einer Vielzahl von Medikamenten als Konservierungsstoff enthalten. Daraus ergeben sich verschiedene offene Fragen. So wurde bislang nicht untersucht, ob Chlorocresol in vivo ebenfalls eine MH triggern kann, und, sollte das der Fall sein, in welchen Konzentrationen.

In unserer Arbeit wurde die Chlorocresolkonzentration in Patientenserum, welche vorher vorbereitend zur Coronarchirurgie eine Heparinisierung mit chlorocresolhaltigem Liquemin® erhalten haben, mittels HPLC gemessen. Hierfür wurde eine Vorbehandlungsmethode erstellt, nach der die Chlorocresolkonzentration im Serum quantitativ zu messen ist. Die untere Nachweisgrenze für Chlorocresol in unserer Versuchsanordnung lag bei 4 µM Chlorocresol. In Abbildung 5 ist unter Punkt a) ein Plotterausdruck eines Testserums mit 100 µM Chlorocresol dargestellt, unter Punkt b) der eines Testserums mit 2 µM Chlorocresol. Insgesamt wurde Serum von 12 Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten entnommen, dem Protokoll entsprechend vorbehandelt und mit der HPLC die Chlorocresolkonzentration gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass in diesen Messungen keine Probe reproduzierbar Chlorocresolkonzentrationen über unserer unteren Messgrenze aufwies. Ein solcher Ausdruck ist exemplarisch in Abbildung 5 unter dem Punkt c) dargestellt. Lediglich in vereinzelt Proben zeigten sich Extinktionen, welche zum selben Zeitpunkt wie derjenige von Chlorocresol auftraten. Diese Extinktionen waren allerdings nicht reproduzierbar und sprechen demnach für Ungenauigkeiten in dem äußerst empfindlich justierten Messaufbau oder Verunreinigungen der Testserum. Die Höchste dieser Extinktionen entsprach einer Äquivalenzkonzentration von 6,6 µM Chlorocresol. Die Serumchlorocresolkonzentration von Patienten, welche mit Liquemin® in üblicher Dosierung vollheparinisiert wurden, liegt demnach unter 4 µM.

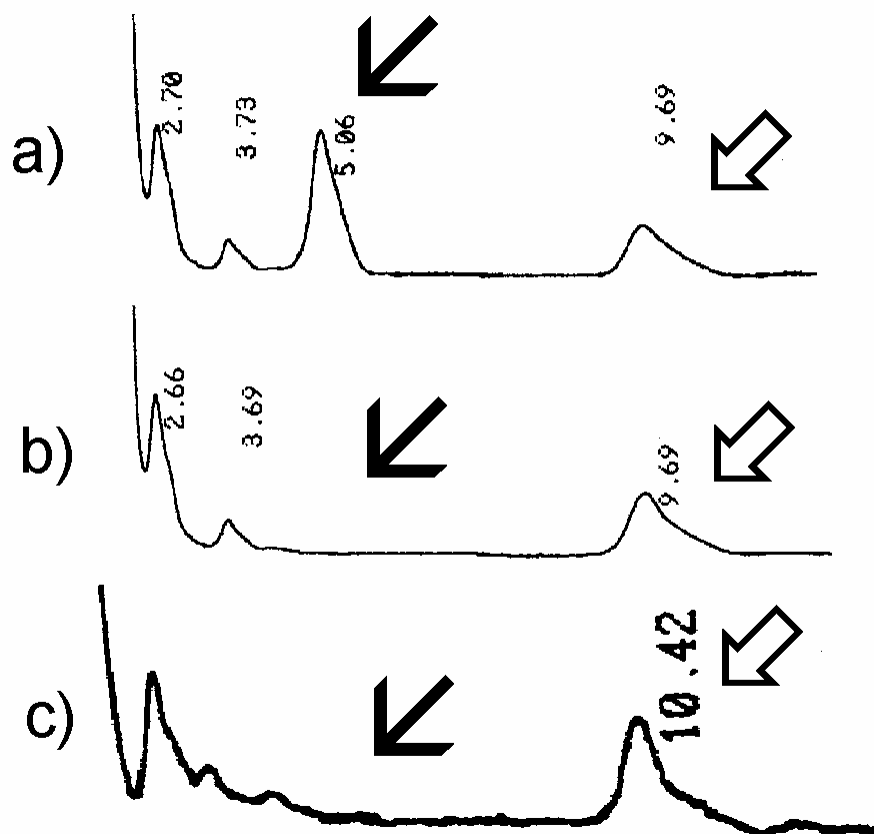


Abbildung 5: HPLC-Plotterausdrücke, der schwarze Pfeil weist auf erwarteten Zeitpunkt der Extinktion durch Chlorocresol, der weiße Pfeil auf denjenigen durch den internen Standard PCME.

a): Testserum mit 100  $\mu\text{M}$  Chlorocresol und 100  $\mu\text{M}$  PCME

b): Testserum mit 2  $\mu\text{M}$  Chlorocresol und 100  $\mu\text{M}$  PCME

c): Patientenserum mit 100  $\mu\text{M}$  PCME, keine Extinktion zum erwarteten Zeitpunkt durch Chlorocresol

Zur Einschätzung der Gefährlichkeit von Chlorocresol im klinischen Alltag verglichen wir nun die Messwerte in vitro mit denen in vivo. In vitro konnten wir einen signifikanten Anstieg der Kontraktur ab einer Chlorocresolkonzentration von 26,3  $\mu\text{M}$  nachweisen. Keine der Serumproben der Patienten zeigte reproduzierbar eine Konzentration größer als 4  $\mu\text{M}$  Chlorocresol, unserer unteren Nachweisgrenze. Lediglich vereinzelt haben wir Extinktionen gefunden, die größte entsprach umgerechnet 6,6  $\mu\text{M}$  Chlorocresol. Daraus lässt sich folgern, dass bei Patienten, welche einen Bolus eines chlorocresolhaltigen Heparinpräparates erhalten, die maximale

Chlorocresolkonzentration mindestens  $1/6$  unterhalb der Chlorocresolkonzentration liegt, welche in vitro signifikant eine Kontraktur auslöst. Angenommen, die höchste bei uns gemessene Extinktion sei durch Chlorocresol ausgelöst worden, so ergäbe sich dennoch eine Chlorocresolkonzentration, welche  $1/4$  unterhalb der kontrakturauslösenden Chlorocresolkonzentration liegt. Interessanterweise induziert Chlorocresol bekanntermaßen eine MH-Krise beim MHS-Schwein, jedoch nur in 100 bis 150fach höherer Konzentration als in vitro<sup>31,32</sup>. Die Belastung unseres Patientengutes mit dem chlorocresolhaltigem Medikament Liquemin® ist aufgrund der Bolusgabe als eine maximale Belastung mit Chlorocresol zu verstehen. Durch diese Bolusgabe wird eine maximale Konzentration erreicht, welche im weiteren Verlauf umverteilt wird. Die genauen Mechanismen bezüglich Bioverteilung, Abbau und Ausscheidung sind trotz des jahrelangen Umganges mit Chlorocresol nicht bekannt. So könnte Chlorocresol theoretisch bei wiederholten Gaben chlorocresolhaltiger Medikamente akkumulieren. Vor allem bei leber- oder nierengeschädigten Patienten wäre hier eventuell eine Gefahr zu sehen. Da bisher allerdings noch keine diesbezüglichen Fälle berichtet wurden, halten wir diese Möglichkeit für äußerst unwahrscheinlich.

Unseren Ergebnissen zufolge schätzen wir die Gefahr sehr niedrig ein, durch die Gabe von chlorocresolhaltigen Medikamenten in üblichen Dosen einen MH-Zwischenfall auszulösen.

Chlorocresol ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit ein potentes Werkzeug, um die Diagnostik der MH im IVCT zu erweitern, zudem konnte gezeigt werden, dass das chlorocresolhaltige Heparinpräparat Liquemin® in klinisch gebräuchlichen Dosierungen keine MH-Krise auslösen kann.

## VI. Zusammenfassung

Bei der Malignen Hyperthermie (MH) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit variabler Penetranz und Expressivität. Es kommt zu einem übermäßigen Calciumeinstrom in die Skelettmuskelzelle nach Triggerexposition aufgrund einer Fehlfunktion des verantwortlichen Ryanodinrezeptors (RYR<sub>1</sub>). Bei den bekannten Triggern handelt es sich um depolarisierende Muskelrelaxantien und volatile Anästhetika wie Halothan, aber auch andere Stoffe können diese Triggerfunktion ausüben. Das Phenolderivat Chlorocresol, ein in vielen Medikamenten gebräuchliches Konservierungsmittel, wird als fragliche Triggersubstanz bezüglich ihres Effektes auf die Skelettmuskulatur von MHS gegenüber MHN-Patienten im In-Vitro-Kontraktur-Test (IVCT) getestet. Zudem wurden mit der high pressure liquid chromatography (HPLC) die Serumkonzentrationen an Chlorocresol von Patienten gemessen, welche vor einer Bypassoperation eine definierte Menge eines chlorocresolhaltigen Heparinpräparates erhalten haben.

Chlorocresol zeigt im IVCT eine signifikante Differenz zwischen MHN- und MHS-Patienten. Somit ließe sich dieser Stoff auch in der Diagnostik der MH einsetzen. Die Serumwerte von Chlorocresol bei Patienten, die eine definierte Dosis an chlorocresolhaltigen Heparin erhalten haben, lagen unter der Nachweisgrenze, welche wiederum deutlich unter der im IVCT gefundenen für eine Muskelkontraktur erforderlichen Mindestkonzentration an Chlorocresol lag. Folglich scheint keine Gefahr für MH-Träger, durch Gaben von üblichen Mengen an chlorocresolhaltigen Medikamenten eine MH-Krise auszulösen.

## LITERATURVERZEICHNIS

- 
- <sup>1</sup> Urwyler A, Hartung E: Die Maligne Hyperthermie, *Anaesthesist*. 43:557-569, 1994
  - <sup>2</sup> Ombredanne L: De l'influence de l'anesthétique –employé dans la genèse des accidents post-operatoires de paleurs-hyperthermie observes chez nourrissons ; *Revue Médicale Française*. 10:617, 1929
  - <sup>3</sup> Denborough MA, Lovell RRH; Anaesthetics deaths in family; *Lancet*. 2:45, 1960
  - <sup>4</sup> Denborough MA, Froster JFA, Lovell RRH et al.: Anaesthetics death in a family; *Br J Anaesth*. 34:395, 1962
  - <sup>5</sup> Hall LW, Woolf N, Bradley JWP et al.: Unusual reaction to suxamethonium chloride; *Br Med J*. 2:1305, 1966
  - <sup>6</sup> Topel DG, Bicknell EJ, Preston KS et al.: porcine stress syndrome; *modern verterinary practice*. 49:40, 1968
  - <sup>7</sup> Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, Mac Lennan DH: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associates with malignant hyperthermia; *Science*. 1991 Jul 26; 253(5018):448-451
  - <sup>8</sup> MacKenzie AE, Korneluk RG, Zorzato F, Fujii J, Phillips, Iles D, Wieringa B, Leblond S, Bailly J, Willard HF et al.: the human ryanodine receptor gene: its mapping to 19q13.1, placement in a chromosome 19 linkage group, and exclusion as the gene causing myotonic dystrophy; *Am J Hum Genet*.1990 Jun; 46(6):1082-9



- 
- <sup>9</sup> Schulte-Sasse U, Eberlein H-J: Maligne Hyperthermie und anästhetikainduzierte Rgabdomyolysen in Doenicke A, Kettler D et al.: Anästhesiologie 7. Auflage, Springer Verlag, 1995
- <sup>10</sup> Fagerlund TH, Islander G, Ranklev T, Twetman E, Berg K: Malignant hyperthermia susceptibility, an autosomal dominant disorder ?; Clin Genet. 1997 Jun; 51(6):365-9
- <sup>11</sup> Keating KE, Quane KA, Manning BM, Lehane M, Hartung E, Censier K, Urwyler A, Klausnitzer M, Muller CR, Heffron JJ et al.: Detection of a novel RYR<sub>1</sub> mutation in four malignant hyperthermia pedigrees; Hum Mol Genet. 1994 Oct; 3(10):1855-8
- <sup>12</sup> Robinson RL, Monnier N, Wolz W, Jung M, Reis A, Nuernberg G, Curran JL, Monsieurs K, Stieglitz P, Heytens L, Fricker R, van Broeckhoven C, Deufel T, Hopkins PM, Lunardi J, Mueller CR: A genome wide search for susceptibility loci in three European malignant hyperthermia pedigrees; Hum Mol Genet. 1997 Jun; 6(6):953-61
- <sup>13</sup> Quane KA, Ording H, Keating KE, Manning BM, Heine R, Bendixen D, Berg K, Krisovic-Horber R, Lehmann-Horn F, Fagerlund T, McCarthy TV: Detection of a novel mutation at amino acid position 614 in the ryanodine receptor in Malignant Hyperthermia; Br J Anaesth. 1997 Sep; 79(3) :332-7
- <sup>14</sup> Gravenstein, Kirby et al.: Complications in anaesthesiology 2<sup>nd</sup> edition, Lippincott-Raven, 1996
- <sup>15</sup> Mickelson JR, Louis CF: Malignant Hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca<sup>2+</sup> release channel, and cell Ca<sup>2+</sup> regulation defects; Physiol Rev. 1996 Apr; 76(2):537-92

- 
- <sup>16</sup> Larach MG, Rosenberg H, Larach DR, Broennle AM: Prediction of Malignant Hyperthermia susceptibility by clinical signs; *Anaesthesiology*. 1987 Apr; 66(4):547-50
- <sup>17</sup> Harrison GG: Control of the hyperpyrexia syndrome in MHS swine by Dantrolene sodium; *Br J Anaesth*. 1975 Jan; 47(1):62-5
- <sup>18</sup> Snoeck MM, Gielen MJ, Sengers RC, Padberg GW, Iles DE, Booij LH: Malignant Hyperthermia as a complication of anaesthesia: predisposition is hereditary; *Ned-Tijdschr Geneesk*. 1997 Mar 29; 141(13):616-19
- <sup>19</sup> Sambuughin N, Holley H, Muldoon S, Brandom BW, de Bantel AM, Tobin JR, Nelson TE, Goldfarb LG: Screening of the entire ryanodine receptor type 1 coding region for sequence variants associated with the malignant hyperthermia susceptibility in the north American population; *Anesthesiology*. 2005 Mar; 102(3):515-21
- <sup>20</sup> European Malignant Hyperpyrexia Group: A protocol for the investigation of malignant hyperthermia (MH) susceptibility; *Br J Anaesth*. 1984 Nov; 65(11):1267-9
- <sup>21</sup> Ording H, Brancadoro V, Cozzolino S, Ellis FR, Glauber V, Gonano EF, Halsall PJ, Hartung E, Heffron JJ, Heytens L, Kozak-Ribbens G, Kress H, Krivosic-Horber R, Lehmann-Horn F, Mortier W, Nivoche M, Ranklev-Twetman E, Sigurdsson S, Snoeck M, Stieglitz P, Tegazzin V, Urwyler A, Wappler F: In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: result of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects; *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997 Sep; 41(8):955-66

- 
- <sup>22</sup> Orkin FK, Cooperman LH: Complications in anaesthesiology, Lippincott company 1983
- <sup>23</sup> Zorzato F, Scutari E, Tegazzin V, Clementi E und Trever S: Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release; Mol Pharmacol. 1993 Dec; 44(6):1192-201
- <sup>24</sup> Herrmann-Frank A, Richter M, Lehmann-Horn F: 4-chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor; Biochem-Biophys-Acta. 1996 Feb 9; 1289(1):31-40
- <sup>25</sup> Gilly H, Musat I, Fricker R, Bittner RE, Steinbeeithner K, Kress HG: classification of malignant hyperthermia-equivocal patients by 4-chloro-m-cresol; Anaesth Analg. 1997 Jul; 85(1):149-54
- <sup>26</sup> <http://www.srz.berlin.de/RoteListe/>
- <sup>27</sup> Gatti H, Roveri P, Bonazzi D, Cavrini V: HPLC-fluorescence determination of chlorocresol und chloroxylenol in pharmaceuticals; J Pharm Biomed Anal. 1997 Nov; 16(3):405-12
- <sup>28</sup> Di-Pietra AM, Andrisano V, Gotti R, Cavrini V: Online postcolumn photochemical derivatization in liquid chromatographic-diode-array detection analysis of binary drug mixtures; J Pharm Biomed Anal. 1996 Jun; 14(8-10):1191-9
- <sup>29</sup> Hewala II: Gas-liquid chromatographic and difference spectrophotometric techniques for the determination of benzaldehyde in benzyl alcohol; J Pharm Biomed Anal. 1994 Jan; 12(1):73-9
- <sup>30</sup> Wappler F, Anetseder M, Baur CP, Censier K, Doetsch S, Felleiter P, Fiege M, Fricker R, Halsall PJ, Hartung E, Heffron JJ, Heytens L,

---

Hopkins PM, Klingler W, Lehmann-Horn F, Nivoche Y, Tegazzin V, Tzanova I, Urwyler A, Weisshorn R, Schulte am Esch J: Multicentre evaluation of in vitro contracture testing with bolus administration of 4-chloro-m-cresol for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility; Eur J Anaesthesiol. 2003 Jul; 20(7):528-36

- <sup>31</sup> Iazzo PA, Johnson BA, Nagao K, Gallagher WJ: 4-chloro-m-cresol triggers malignant hyperthermia in susceptible swine at doses greatly exceeding those found in drug preparations; Anesthesiology 1999 Jun; 90(6):1723-32
- <sup>32</sup> Wappler F, Scholz J, Fiege M, Kolodzie K, Kudlik C, Weißhorn, Schulte am Esch J: 4-chloro-m-cresol is a trigger of malignant hyperthermia in susceptible swine; Anesthesiology 1999 Jun; 90(6):1733-40

## Lutz Ritter

---

### Persönliche Informationen

- Familienstand: Verheiratet
- Nationalität: Deutsch
- Geburtstag: 17.09.1970
- Geburtsort: Mainz

### Schule

- 1976-1977 Grundschule Mainz-Mombach
- 1977-1980 Grundschule am Mönchsberg
- 1980-1982 Orientierungsstufe Schule am Steinkamp
- 1982-1989 Altes Gymnasium zu Bremen

### Zivildienst

- 1990-1991 Integrationsschule am Wasser, Bremen Vegesack

### Studium

- 1991-1993 Vorklinik Christian-Albrechts-Universität Kiel
- 1993-1998 Klinische Abschnitte Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### Berufliche Tätigkeiten

- 1998-2000 Arzt im Praktikum Gefäßchirurgie und Unfallchirurgie, Kreiskrankenhaus Traunstein
- Seit 2000 Sekundararzt an der Universitätsklinik für Neurochirurgie, Christian-Doppler-Klinik, Salzburg



Lutz Ritter