

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

**Untersuchung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung und regionalen Verteilung
von Laktat nach intramuskulärer Injektion von Halothan und Koffein bei
Schweinen mit Veranlagung zur Malignen Hyperthermie**

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

vorgelegt von

Hendrik Schöll
aus Ulm

Würzburg, Mai 2008

Referent:

Professor Dr. N. Roewer

Koreferent:

Priv.-Doz. Dr. M. Anetseder

Dekan:

Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

14.01.2009

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
Definition der Malignen Hyperthermie.....	1
Geschichte und Epidemiologie der MH.....	1
Pathophysiologie der MH.....	3
Klinik der MH.....	4
Therapie der MH.....	4
Diagnostik der MH-Veranlagung.....	6
<i>In-vitro-Kontrakturtest</i>	6
<i>Genetische Testung</i>	8
<i>Metabolischer Provokationstest</i>	8
Prinzip der Mikrodialyse.....	9
Fragestellungen.....	11
2. METHODIK	12
Versuchstiere	12
Verwendetes Material	12
Mikrodialyse.....	12
Injektionslösungen.....	13
Laktatreagenz.....	14
Spritzenpumpen.....	14
Ultraschallgerät.....	14
Versuchsdurchführung	15
Regionale Verteilung von Laktat nach Triggerapplikation.....	15
Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Triggerapplikation.....	18
Probenanalyse	19
Statistik	20

3. ERGEBNISSE	21
3.1 Regionale Effekte nach i.m. Injektion von Triggersubstanzen ...	21
3.1.1 Monitoring.....	21
Blutdruck, Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Rektaltemperatur....	21
Venöse Blutgasanalyse.....	24
pH-Wert, pCO ₂ -Wert.....	24
Laktat.....	25
Myoglobin.....	25
3.1.2 Mikrodialyse.....	26
Halothan.....	26
Koffein.....	27
3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung der MH	29
3.2.1 Monitoring.....	29
Blutdruck, Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Rektaltemperatur....	29
Venöse Blutgasanalyse.....	30
pH-Wert, pCO ₂ -Wert.....	30
Laktat.....	31
Myoglobin.....	31
3.1.2 Mikrodialyse.....	32
Halothan.....	32
Koffein.....	33
4. DISKUSSION	35
Mikrodialyse.....	35
Dosisabhängigkeit der Malignen Hyperthermie.....	36
Regionale Verteilung nach intramuskulärer Triggerapplikation.....	38
Laktatkonzentration im Muskel.....	40
Resümee.....	40
5. ZUSAMMENFASSUNG	41

6. LITERATURVERZEICHNIS.....	44
-------------------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
BGA	Blutgasanalyse
Ca ⁺⁺	Kalzium
CK	Kreatinkinase
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DHPR	Dihydropyridin Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm
EMHG	European Malignant Hyperthermia Group
EZR	Extrazellulärraum
GA	Gage
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IVCT	In-vitro Kontrakturtest
K ⁺	Kalium
M	Mittelwerte
M.	Musculus
MD	Mikrodialyse
MH	Maligne Hyperthermie
MHN	Maligne Hyperthermie negativ
MHS	Maligne Hyperthermie susceptible
n	Anzahl der Versuchstiere
O ₂	Sauerstoff
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
pH	Potentia hydrogenii
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
V.	Vena

1 EINLEITUNG

1.1 Definition der malignen Hyperthermie

Bei der malignen Hyperthermie (MH) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Störung des Kalziumstoffwechsels der Skelettmuskulatur. Durch volatile Inhalationsanästhetika und depolarisierende Muskelrelaxantien ausgelöst, kommt es bei dieser metabolischen Myopathie zu einer unkontrollierten intramuskulären Freisetzung von Kalzium. Diese kann sich innerhalb von Minuten bis Stunden zu einer lebensbedrohlichen Stoffwechselentgleisung entwickeln, der MH-Krise¹. Die frühzeitige Diagnose und die umgehende Therapie sind für die Abwendung von Folgeschäden und das weitere Überleben des Patienten entscheidend. Patienten mit dieser MH-Veranlagung zeigen im alltäglichen Leben keine Auffälligkeiten oder Einschränkungen.

1.2 Geschichte und Epidemiologie der MH

Erste Hinweise auf eine MH lassen sich seit der Einführung der Anästhesie im 19. Jahrhundert finden. John Snow, der wohl erste professionelle Anästhesist, berichtete schon früh über einen plötzlichen und unerwarteten Anstieg der Körpertemperatur während einer Narkose². Im November 1900 wurde auf einem Chirurgenkongress der New York Academy of Medicine über das manchmal unerwartet plötzliche auftretende Phänomen von „Hitzschlag“ als „postoperative Komplikation“ diskutiert.³ Sie führten damals aber die Symptome, wie erhöhte Körpertemperatur, Tachykardie, Nierenversagen, Delirium und auch Tod des Patienten auf eine schlechte Luftzirkulation bei heißem Wetter in den OP-Sälen zurück.

Ein Bericht in „Anesthesiology“ 1940 durch G.E. Burford⁴ zeigte zum ersten Mal eine Trias dieser Erkrankung auf. Er beschrieb das Auftreten von Hyperthermie,

Tachykardie und Tachypnoe. Burford führte dies auf die lange Dauer einer Ethernarkose bei diesem Patienten zurück. Resultat dieser Erkenntnis war lediglich eine allgemeine Empfehlung zur kontinuierlichen Temperaturmessung während der Narkose. Erst im Jahre 1960 wurde durch eine Beobachtung von M. Denborough und R.R.H. Lovell die Grundlage für eine weitere Erforschung der MH geschaffen.⁵ Die beiden australischen Anästhesisten berichteten über einen MH-Fall eines 21-jährigen jungen Mannes während einer Narkose. In seiner Familienanamnese ließen sich 10 ungeklärte Todesfälle, die während Narkosen auftraten, finden. Sie erkannten hier einen Zusammenhang zwischen Anästhesie und einer MH-Disposition. Seit diesem Zeitpunkt nun wurde diese Erkrankung als eigenständige pharmakogenetische Erkrankung angesehen.

L.W. Hall entdeckte Mitte der 60-iger Jahre bei Schweinen nach Gabe von Succinylcholin Anzeichen einer MH.⁶ Dies wurde in weiteren Untersuchungen für Halothanexpositionen ebenfalls validiert.⁷ Ein tierexperimentelles Modell zur weiteren Erforschung der MH war somit geschaffen. Die Entdeckung und der Nachweis von W.KALOW., B.A. BRITT und F.R. ELLIS^{8;9}, dass exzidierte Muskelbündel von MH-Veranlagten in-vitro nach Koffein- und Halothan-Exposition Kontraktionen aufweisen, war die Grundlage für ein neues Testverfahren. Der auf dieser Erkenntnis entstandene und 1983 eingeführte IVCT (In-vitro-Kontrakturtest) stellt die heute einzig validierte Methode zur Testung einer MH-Veranlagung dar.^{10;11} Die Entdeckung des Dantrolens 1975 durch G.G. Harrison¹², das bis zum heutigen Tag als einziges Antidot verwendet wird, war und ist ein wichtiger Fortschritt in der Behandlung der MH.

Die geschätzte genetische Prävalenz der MH-Disposition wird mit 1:10 000 angegeben. Die klinische Inzidenz einer MH-Krise liegt bei 1:20 000 bis 1:84 000 Allgemeinanästhesien.¹³ Die Inzidenz für das Auftreten einer fulminanten MH-Krise erhöht sich bei Verwendung von Succinylcholin und einem volatilen Inhalationsanästhetikum.¹⁴

1.3 Pathophysiologie der MH

Ein in der motorischen Endplatte einer Skelettmuskelfaser entstandenes Aktionspotential (AP) wird entlang der Muskelmembran über die T-Tubuli ins Innere der Muskulatur weitergeleitet. Die Muskelzellmembran (Sarkolemm) steht in enger Nachbarschaft mit dem intrazellulär gelegenen sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Ein im Sarkolemm gelegener spannungsabhängiger Ca^{++} -Kanal, der so genannte DHPR (Dihydropyridin-Rezeptor) erfährt durch das AP eine Konformationsänderung. Dadurch wird der im sarkoplasmatischen Retikulum gelegene Ca^{++} -Kanal, Ryanodinrezeptor genannt, geöffnet. Kalzium strömt entlang des Konzentrationsgefälles vom SR in das Zytosol. Eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration von 10^{-8} auf 10^{-5} mol/l führt zu einer Kontraktion der Muskulatur. Diese kommt durch Bindung des Kalziums an das Troponin zustande, welches zum Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente führt. Mit der aktiven Wiederaufnahme des Kalziums in das SR über die Ca^{++} -ATPase kommt es zu einer Relaxation des Muskels, dem Ende der Kontraktion.

Bei MH-Disposition in Kombination mit weiteren Faktoren¹³ (volatile Inhalationsanästhetika, Succinylcholin, Koffein, Halothan, Fieber, psychischer Stress) kommt es zu einer massiven Freisetzung von Kalzium aus dem SR. Die Kapazität der Ca^{++} -ATPase wird überschritten und es kommt unter Verbrauch energiereicher Phosphate zu einer Dauerkontraktion der Muskelfilamente. Ein Rigor, das heißt eine generalisierte Kontraktur der Skelettmuskulatur resultiert daraus. Um dem steigenden Energiebedarf gerecht zu werden wird in der Muskulatur gespeichertes Glykogen verstoffwechselt. Zuerst aerob, dann auf Grund des geringer werdenden intrazellulären Sauerstoffangebots auf anaerobe Glykolyse umgestellt. Die aus diesem Hypermetabolismus entstehenden Anstiege von Kohlendioxid, Laktat und der Wärmeproduktion führen in kurzer Zeit zu Hypoxie, Hyperkapnie, Laktatazidose und Hyperthermie. Den klassischen Zeichen der fulminanten MH-Krise. Folge der Kontraktur sind eingeschränkte Perfusion und damit Verschlimmerung der Symptome. Durch Zusammenbruch der Energieversorgung der Zelle und dem

daraus resultierenden Sistieren energieabhängiger Membranvorgänge, kommt es zum Muskelödem mit nachfolgender Rhabdomyolyse. Das Auftreten dieser ausgelösten Stoffwechselentgleisung in der gesamten quergestreiften Muskulatur führt zum klinischen Bild der malignen Hyperthermie.

1.4 Klinik der MH

Zum klassischen Bild der MH-Krise zählen die Symptome Tachykardie, Hyperthermie, Muskelrigidität, Hyperkapnie, Azidose, sowie Hypoxie. Die Ausprägung dieser Symptome ist in der MH-Krise jedoch sehr variabel. Fulminante Verlaufsformen sind eher selten, Masseterspasmus und Rhabdomyolyse als Zeichen einer MH sind dagegen ein häufigeres Symptom.¹⁵ Weitere diagnostische Maßnahmen, wie EKG, Blutdruck, Pulsoxymetrie, arteriell und zentralvenöse BGA, CK- und Elektrolytbestimmung (vor allem K⁺), Temperatur sowie Überwachung der Urinausscheidung müssen angeschlossen werden um die Diagnose zu verifizieren.

Der alleinige Verdacht auf eine MH rechtfertigt und erfordert eine sofortige Einleitung der Therapie.

Ausgelöst wird die MH durch volatile Inhalationsanästhetika (als klassischer Vertreter sei das Halothan genannt), sowie durch depolarisierende Muskelrelaxantien, wie Succinylcholin.¹ Einzelne Fallberichte weisen auf weitere mögliche Triggersubstanzen für die Auslösung einer MH hin. Genannt werden übermäßiger Alkoholkonsum^{16;17}, ausgeprägte Stresssituationen, Benzindämpfe, wie auch die Designerdroge Ecstasy im Schweinemodell.¹⁸ Xenon, ebenfalls ein volatiles Inhalationsanästhetikum scheint jedoch kein Trigger einer MH bei MHS-Schweinen zu sein.¹⁹

Bei der fulminanten MH-Krise kommt es rasch zu einer Entgleisung der Homöostase. Elektrolytverschiebungen, metabolisch-respiratorische Azidose, Anstieg des endexpiratorischen CO₂ werden begleitet von Sinustachykardie, generalisiertem Rigor und Hypoxie mit daraus resultierender Rhabdomyolyse. Diese führt durch den Anstieg der Kreatininkinase und des Myoglobins im

Serum in ein mögliches myoglobinurisches Nierenversagen. Hirnödem und eine disseminierte Koagulopathie sind weitere mögliche sekundäre Organkomplikationen. Kann die durch die Triggersubstanzen ausgelöste hypermetabole Stoffwechsellage nicht durchbrochen werden, so versterben die Patienten im Herz-Kreislaufversagen.²⁰ Die Hyperthermie mit rasantem Temperaturanstieg manifestiert sich erst als Spätsymptom dieser metabolischen Entgleisung.

Abortive, leichtere, Formen der MH-Krise sind sehr viel häufiger, aber durch die geringere Ausprägung ihrer Symptome schwieriger zu diagnostizieren. Der Masseterspasmus nach Triggerapplikation ist ein wichtiger Hinweis, wenn auch ein relativ unspezifisches Zeichen für eine vorliegende MH-Disposition. ROSENBERG et al. konnte jedoch bei der Hälfte dieser Patienten im IVTC eine MH-Veranlagung nachweisen.²¹

Auch hier kann es nach einem larvierten Beginn der Symptome zu einem protrahierten Verlauf der MH kommen. Vereinzelt auftreten von Tachykardie, Erythem, mäßiger metabolischer Azidose, geringer Hyperkapnie, sowie postoperativem Nachweis von Myoglobin im Harn lassen oft nur den Verdacht einer MH aufkommen. Auch hier ist eine sofortige Therapie vonnöten, da es innerhalb kurzer Zeit zu einem exazerbierten Verlauf kommen kann.

1.5 Therapie der MH

Um Schaden des Patienten abzuwenden muss eine adäquate Therapie so früh und schnell wie möglich erfolgen. Harrison schaffte durch seine Entdeckung des Dantrolens 1975 am Schweinmodell, die heute noch gültige Grundlage und einzig kausale Therapie der MH.¹² Durch diese nun zur Verfügung stehende Therapie konnte die Letalitätsrate der MH von 70% auf unter 5% gesenkt werden.¹³

Tritt eine MH während einer Operation auf, so reicht die alleinige Gabe des intrazellulären Kalziumantagonisten Dantrolen nicht aus. Weitere Maßnahmen müssen zusätzlich ergriffen werden. Triggersubstanzen müssen sofort entfernt

und die Narkose auf eine triggerfreie Anästhesie umgestellt werden. Das baldige Beenden der Operation sollte angestrebt werden. Der Patient wird umgehend mit 100% Sauerstoff bei maximalem Frischgasfluss beatmet, die Narkose wird vertieft, um den O₂-Bedarf des Körpers weiter zu senken.

Regelmäßige Kontrollen der Blutgase, Elektrolyte, CK, des Myoglobins und Laktats müssen erfolgen. Die entstandene Azidose wird mittels Natriumbicarbonat behandelt. Zur Aufrechterhaltung der Kreislauffunktion wird Volumen substituiert, Katecholamine verabreicht und bei Bedarf eine antiarrhythmische Therapie eingeleitet. Eine postoperative intensivmedizinische Überwachung des Patienten sollte sich zur Prophylaxe und Therapie möglicher sekundärer Organkomplikationen anschließen.

1.6 Diagnostik der MH-Veranlagung

Ein Narkosezwischenfall mit MH-verdächtigen Symptomen, eine alleinige Rhabdomyolyse oder auch ein Masseterspasmus sollten Anlass für eine weiterführende MH-Diagnostik sein. Der Verdacht auf eine familiäre MH-Veranlagung, auf Grund von Narkosekomplikationen sowie ungeklärte persistierende CK-Erhöhungen, stellen weitere Indikationen dar.

1.6.1 In-vitro-Kontrakturtest

Bei dem In-vitro-Kontrakturtest (IVCT, In-vitro-contraction test) handelt es sich um das derzeitige Standardverfahren zur Diagnostik einer MH-Disposition. Als Grundlage dienen die Arbeiten von Kalow et al.⁸ und Ellis et al.⁹ aus den siebziger Jahren. Durchgeführt wird dieser Test nach dem Protokoll der europäischen MH Gruppe (EMHG, European malignant hyperthermia group).¹⁰ Diese hat es sich zur Aufgabe gemacht ein einheitliches und standardisiertes Verfahren zur Diagnostik der MH zu entwickeln und die Forschung auf dem Gebiet der malignen Hyperthermie weiterzubringen.

Für die Testung wird aus dem M. vastus lateralis eine Muskelbiopsie entnommen. Diese wird unter Laborbedingungen in einen Kraftaufnehmer eingespannt und elektrisch stimuliert. Dem Protokoll folgend wird nun dieses Muskelbündel mit unterschiedlichen Konzentrationen von Halothan und Koffein inkubiert. Eine Kontraktion unter diesen Triggersubstanzen erlaubt eine Aussage über die MH-Disposition. Dabei werden drei Gruppen unterschieden. Reagiert der Muskel sowohl auf die Stimulation mit Halothan und Koffein mit einer entsprechenden Kontraktion, so gilt dieser Patient als MH-gefährdet (MHS; MH-susceptible). Reagiert dieser jedoch normal so erhält dieser die Bezeichnung MHN (MH-nonsusceptible). Hier besteht kein erhöhtes Risiko einer MH gegenüber der restlichen Bevölkerung, für welche keine MH-Disposition nachgewiesen werden kann. Reagieren die Muskelbündel nur auf eine der beiden Testsubstanzen mit einer Kontraktion (MHE; MH-equivocal), wie das bei 10% der Patienten der Fall ist¹³, so gelten diese als MH-gefährdet. Grund hierfür ist eine derzeitige nicht klare wissenschaftliche Zuordnung dieser Patientengruppe.

Der Test verfügt über eine Sensitivität von 99% und einer Spezifität von 93,6%^{23;13} und stellt damit ein zwar sehr invasives und auch kostenintensives, aber zuverlässiges Verfahren dar. Es stehen stetig Bemühungen im Raum den IVTC weiter zu Verbessern um noch exaktere Aussagen treffen zu können. Dafür werden neue Triggersubstanzen der MH wie z.B. Ryanodin oder Sevoflurane⁶¹ getestet und mit etablierten Substanzen kombiniert. Diese Versuche zeigen bisher ein gutes und viel versprechendes Potential als erster Schritt einer kombinierten Testung mit dem Ziel einer noch besseren Aussagekraft der Ergebnisse.²⁴

1.6.2 Genetische Testung

Die genetische Testung auf eine MH-Disposition wird wohl auch in nächster Zukunft nicht für alle MH-Patienten zu einem aussagekräftigen Resultat führen. Grund hierfür ist die hohe genetische Heterogenität.^{25;26} Aus diesem Hintergrund heraus steht die derzeitige genetische Diagnose einer MH für weniger als 50 % der Merkmalsträger zur Verfügung. Deshalb werden bis heute alternative Methoden, insbesondere minimal-invasive Verfahren entwickelt um eine MH-Veranlagung aufzuspüren.^{27;28;29}

1.6.3 Metabolischer Provokationstest

Es gibt weitere experimentelle Ansätze zur Diagnostik einer MH-Disposition. Der Vorteil dieser Verfahren beruht auf einer minimalen Invasivität und damit geringern Belastung für den Patienten. Die Stimulation der Ca^{++} -Freisetzung in B-Lymphozyten, die über den gleichen Ryanodinrezeptor wie der Skelettmuskel verfügen, dient als Grundlage solch einer neuen Testung. Eine weitere und sehr viel versprechende Methode zum Screening einer MH-Disposition ist die metabolische Testung nach ANETSEDER et al..³⁰ Nach lokaler, intramuskulärer Injektion von Triggersubstanzen (Halothan und Koffein) wird die metabolische Stoffwechselantwort (Laktat und CO_2) gemessen. Nicht nur die Ergebnisse dieser Studie, sondern auch die geringere Invasivität gegenüber dem IVCT und die geringeren Kosten sprechen für ein zukunftsweisendes Verfahren.

1.7 Prinzip der Mikro dialyse

Mikrodialysesonden wurden erstmals durch Biot et al.^{31;32} beschrieben und stets weiterentwickelt.³³ Dadurch ist deren heutiger Einsatz, zu wissenschaftlichen Untersuchungen, in fast allen Organsystemen möglich.

Das Prinzip der Mikro dialyse (MD) besteht aus einem Stoffaustausch zwischen zwei Kompartimenten über eine semipermeable Membran (Abb.1). Als treibende Kraft dient das bestehende Konzentrationsgefälle zwischen den Medien im Sinne einer passiven Diffusion.^{34;35} In-vitro ist dies der EZR des Gewebes und die in der MD-Sonde befindliche Perfusionslösung. Somit kann eine Analyse der Extrazellulärflüssigkeit erfolgen und deren Verlauf kontinuierlich beobachtet werden. Je nach Durchlässigkeit der verwendeten Membran, dem sogenannten *cut-off*, können Moleküle bis zu einer Größe von 20.000 Da problemlos passieren.³⁶ Ebenso ist eine Applikation von Substanzen über die Perfusionslösung in das Gewebe möglich.³⁴

Da die Sonden sehr dünn sind wird durch deren Einführung nur ein geringes Gewebetrauma verursacht. Die Wiedereinstellung der Homöostase kann je nach Gewebeparameter unterschiedlich lang dauern.³⁷

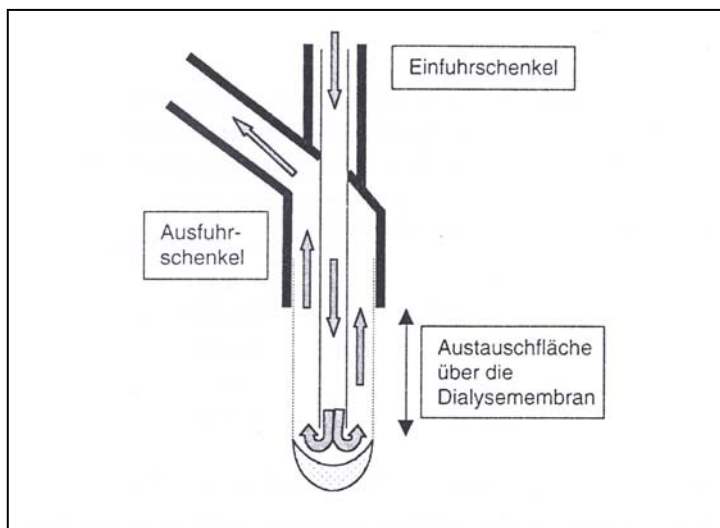


Abb.1 Aufbau einer Mikro dialysesonde.

Aus Klinische Anästhesie; „Methodik und Anwendung der Mikro dialyse“ ; S. 734

Zwischen den Konzentrationen der Metaboliten im EZR und im Perfusat stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein. Dieses Konzentrationsverhältnis wird als *recovery* (Wiederfindungsrate) bezeichnet. Zur quantitativen Bestimmung von Substanzen im EZR ist das Wissen um die Diffusionseigenschaft der zu untersuchenden Metaboliten durch die Membran von entscheidender Bedeutung. Hierzu dient die Bestimmung der „In-vitro-Recovery“. Diese errechnet sich aus dem Quotienten der Metabolitenkonzentration im Dialysat und der in der Sonde umgebenden wässrigen Lösung. Abhängig ist die Bestimmung der Recovery von der Länge und Eigenschaft der Membran, der Flussgeschwindigkeit der Perfusionslösung durch die Sonde sowie die Diffusionseigenschaften der Metabolite im Gewebe.³⁵

Unter *relativer recovery* versteht man den prozentualen Anteil einer Substanz im Dialysat zur Konzentration im untersuchten Medium. Die *absolute recovery* entspricht der Stoffmenge einer Substanz im Dialysat nach einer definierten Zeitspanne in mmol/l.³⁴

Um eine genaue Quantifizierung extrazellulärer Konzentrationen von Metaboliten in-vivo zu erhalten sind komplizierte und aufwändige Verfahren entwickelt worden. Hierbei wird die *in-vivo recovery* unter den jeweils aktuellen Versuchsbedingungen in einem „Steady state“-Zustand bestimmt.³⁵

1.8 Fragestellung

Voruntersuchungen zeigten, dass es mit Hilfe eines in-vivo-Testverfahrens ebenfalls möglich ist eine MH-Disposition festzustellen.³⁰ Bei diesem minimal-invasiven Provokationstest nach ANETSEDER et al. werden Triggersubstanzen der MH direkt in einen Muskel injiziert und die daraus resultierende, lokale hypermetabole Stoffwechselreaktion gemessen. Dies geschieht zum einen über eine intramuskuläre pCO₂- Messung nach Koffeinapplikation und zum anderen über Bestimmung von Laktat mittels Mikrodialysetechnik nach intramuskulärer Gabe von Halothan und Koffein. Die Messungen erfolgen jeweils am Ort der Triggerapplikation.

Weiter konnte Anetseder et al³⁸ zeigen, dass es nach intramuskulärer Applikation von Halothan bei MHS-Schweinen nicht zu einer generalisierten MH-Krise kommt.³⁹ Lediglich konnte an der Injektionsstelle eine Laktaterhöhung als Zeichen eines Hypermetabolismus mittels Mikrodialyse nachgewiesen werden. Unklar ist jedoch ob der Metabolismus im Skelettmuskel von MHS- und MHN-Individuen einer Dosis-Wirkungsbeziehung folgt. Ebenso unklar ist die Ausbreitung des Hypermetabolismus im Skelettmuskelgewebe nach lokaler Applikation von Triggersubstanzen der MH.

Ziel dieser Arbeit ist nun die Bestätigung folgender Hypothesen:

- Die lokale Halothan- und Koffeinapplikation erhöht dosisabhängig die intramuskuläre Laktatkonzentration in MHS- mehr als in MHN-Schweinen.
- Die Ausbreitung des Hypermetabolismus, ausgelöst durch intramuskuläre Koffein- und Halothaninjektion, ist nur auf ein kleines Areal um die Injektionsstelle begrenzt. Eine systemische MH-Krise wird nicht ausgelöst.

2 METHODIK

2.1 Versuchstiere

Mit Zustimmung der örtlichen Tierschutzkommission wurden 14 MHS und 13 MHN Pietrain-Schweine untersucht. Bei den MHS-Schweinen handelt es sich um Tiere mit homozygotem Erbgang für das „porcine stress syndrom“, welche mittels Blutanalyse problemlos identifiziert werden konnten. Bei den MHN-Schweinen handelt es sich um Nicht-Anlageträger-Tiere. Bezogen wurden die Tiere im Alter von 2 Monaten, bei einem durchschnittlichen Gewicht von 36,61 kg (28-46kg) 4 Tage vor Versuchsbeginn. Eine Eingewöhnung fand im Grosstierstall des Tierhauses der Universitätsklinik Würzburg statt.

2.2 Verwendetes Material

Mikrodialyse

Zur Untersuchung wurden flexible Mikrodialysesonden der Firma Microbiotech (MAB 7, Microbiotech/se AB Stockholm, Schweden) verwendet. Diese sind aus einem zuführenden (*inlet-tubing*) und einem von der Membran wegführenden (*outlet-tubing*) Schenkel aufgebaut. An einen 80 mm Schaft schließt sich eine 10 mm lange, semipermeable Membran aus Polyethylensulfon an, welche einen cut-off von 15,000 Da hatte. Aus Voruntersuchungen konnte ein Totraumvolumen der Sonde von 13,6 µl ermittelt werden. Ebenso konnte die *in-vitro recovery* der MD-Membran für Laktat bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 µl/min bei 70–80% gemessen werden. Die Sonden wurden direkt ab Werk verwendet.

Es erfolgte während der Laktatmessung am Versuchstier eine kontinuierliche Spülung der MD-Sonden mit Ringer-Lösung (Ringer-Infusionslösung, Braun, Melsungen, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 1µl/min.

Das Dialysat der *outlet-tubings* wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgefangen. Die Proben wurden in Intervallen über 15 min gesammelt. Die Laktatkonzentration im Dialysat wurde direkt im Anschluss des Versuches photospektrometrisch bestimmt.

Zur Koffein- und Halothanapplikation an den MD-Sonden dienten je 30 cm lange Polyethylen-Mikroschläuche (Hartenstein Laborversand, Würzburg, Deutschland). Das Totraumvolumen lag unter 20 µl. Fixiert wurden diese zusammen mit der MD-Sonde an einem rotierenden hemostatischen Ventil (Guidant Europe NV, Belgium). Als Verbindung zwischen Mikroschlauch, Spritze und MD-Sonde wurden Schlauch-Adapter (CMA, Microdialysis AB, Solna, Schweden) verwendet.

Injektionslösungen

Zur intramuskulären Injektion von Halothan wurden verschiedene Konzentrationen hergestellt. Hierfür wurde Halothan (Fluothane, AstraZeneca, Wedel, Deutschland) in Sojaböhenöl (Intralipid, Baxter, Heidelberg, Deutschland) gelöst, in Konzentrationen von 1, 2.5, 5 und 10 Vol %. Dies wurden in einem gasdichten Glaskolben unter sterilen Bedingungen 30 min vor Applikation gemischt und unter stetigem Schütteln in Lösung gehalten.

Eine in unserer klinikinternen Apotheke hergestellte Koffeinlösung wurde für die Injektion verwendet. Dabei handelt es sich um 80 mM Koffein (Merck, Darmstadt, Germany) gelöst in Ringer-Lösung (Ringer-Infusionslösung, Braun, Melsungen, Deutschland), welche steril filtriert und in Einheiten zu 10 ml abgefüllt wurde. Daraus wurde vor Versuchsbeginn eine Verdünnungsreihe mit nachfolgenden Konzentrationen von 2, 10 und 40 mM Koffein erstellt.

Laktatreagenz

Um das im Dialysat über die MD-Sonden gewonnene Laktat photospektrometrisch zu bestimmen, wurde ein Laktatreagenz (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) in 10 ml *Aqua ad injectabilia* gelöst. Die Substanz enthält neben 400 U/l Laktoxidase, 2400 U/l Peroxidase, chromogenen Vorstufen, verschiedene Füllstoffe bei einem pH-Wert von 7.2.

Spritzenpumpen

Die MD-Sonden wurden über Spritzen an einer Micropumpe (PHD 2000–Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatures, Holliston, MA, USA) zur kontinuierlichen Spülung angeschlossen. Das Volumen der Spritzen betrug 1 ml pro Spritze (Pump Syringe, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Über gasdichte 1 ml Glasspritzen (CMA, Stockholm, Schweden) wurde das Halothan–Sojabohnenöl–Gemisch ebenfalls mit einer Spritzenpumpe (CMA/100, CMA, Stockholm, Schweden) kontinuierlich appliziert.

Eine modifizierte Spritzenpumpe (Braun, Melsungen, Deutschland) mit darauf befestigten 1 ml Spritzen (Omnifix-F, Braun, Melsungen, Deutschland) diente zur Applikation der Koffeinlösung. Zur Befestigung der MD-Sonde respektive des Katheters an den Spritzen wurden stumpfe 21 G Kanülen (Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet.

Ultraschallgerät

Die MD-Sonden wurden zusammen mit den Applikationskathetern über Venenkatheter in der Muskulatur platziert. Dies erfolgte unter ultraschallgesteuerter Kontrolle (SonoSite, U.S. Headquarters SonoSite, USA).

2.3 Versuchsdurchführung

Die Untersuchungen wurden im Großtier-Operationsaal der Experimentellen Chirurgie, Universitätsklinik Würzburg durchgeführt.

Die Tiere wurden vor Beginn des Versuches mit Midazolam (0,15 mg/kg; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und Fentanyl (2 µg/kg; Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) über einen 22 GA Venenkatheter im Ohr prämediziert. Nach endotrachealer Intubation (Endotrachealtubus, 6,5 mm Innendurchmesser, Rüschi, Kern, Deutschland) erfolgte eine mechanische Beatmung (Servo 900 D; Siemens, Erlangen, Deutschland) mit einem Gemisch aus 65 % Lachgas und 35% Sauerstoff. Ziel während der Vorbereitung und Versuchsdurchführung war eine Beatmung mit einem endexpiratorischen pCO₂ zwischen 33-37 mmHg (Beatmungsfrequenz 10-12/min; Tidalvolumen: 10–15 ml/kg; positiven endexpiratorischen Druck: 5 mmHg). Die Narkose wurde mittels Fentanyl-/Midazolam-Perfusor aufrechterhalten. Über die A. saphena erfolgte eine invasive Messung (Insite, 20 GA i.v.-Katheter, Vialon, Spanien) des Blutdruckes und der Blutgase während des gesamten Versuches. Weiterhin erfolgte eine kontinuierliche Überwachung der Vitalparameter in Form von EKG, Sauerstoffsättigung und Messung der Rektaltemperatur. Die Lagerung der Tiere erfolgte auf dem Rücken mit Fixierung der Läufe mittels Klettbandern an der Unterlage.

2.3.1. Regionale Verteilung von Laktat nach Triggerapplikation

Die Ausbreitung des Hypermetabolismus, ausgelöst durch intramuskuläre Koffein- und Halothaninjektion wurde an 7 MHS- und 6 MHN-Schweinen untersucht.

Über eine längsverlaufende Hautinzision wurden die Adduktoren an den Hinterläufen dargestellt. Auf eine großzügige Freilegung wurde verzichtet um ein Auskühlen der Muskulatur zu verhindern.

Unter ultraschall-gesteuerter Kontrolle wurden zweimal drei handelsübliche Venenverweilkanülen (Insyte GA 16 Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) als Einführkanülen in den M. gracilis jeder Seite eingebracht. Diese wurden im Abstand von 10 mm respektive 25 mm zur zentralen Verweilkanüle positioniert (s. Abb. 2).

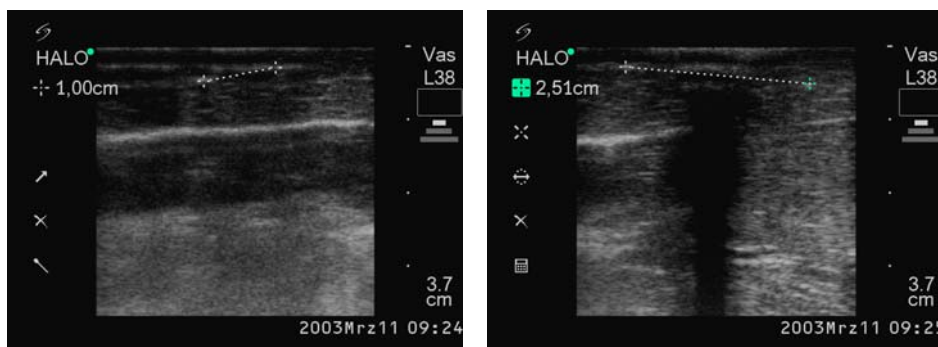


Abb. 2 Ultraschallgesteuertes Einbringen und Lagekontrolle der Mikrodialysesonden im M. gracilis

Die MD-Sonden wurden vor dem Einbringen in den Muskel langsam mit Ringer-Lösung über die inlet-tubings gefüllt um eine blasenfreie Befüllung zu gewährleisten.

In die jeweils zentrale Kanüle wurde eine MD-Sonde zusammen mit einem Mikrokatheter eingebracht. Dabei wurde der Polyethylen-Katheter so positioniert, dass seine Spitze 5 mm proximal der Spitze der MD-Sonde zu liegen kam. Fixiert wurde die Sonde mit dem Mikrokatheter in einem rotierenden hemostatischen Ventil, so dass eine Dislokation verhindert werden konnte. In die restlichen Verweilkanülen wurde dann jeweils eine MD-Sonde eingeführt. Die Positionierung einer zusätzlichen MD-Sonde im M. sartorius erfolgte zur Kontrollmessung. Die zuführenden Schenkel der MD-Sonden wurden nun über Adapter an die Spritzenpumpen angeschlossen und kontinuierlich mit Ringer-Lösung mit 1 µl/min perfundiert (Abb. 3).

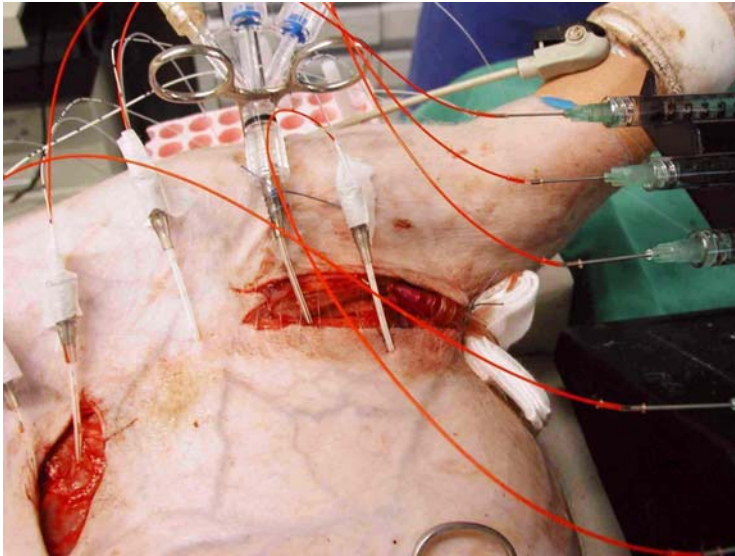


Abb. 3 Platzierung der Sonden im M. gracilis

Die erste Sammlung des Dialysates erfolgte nach 15 minütigem Spülen der MD-Sonde mit Ringer-Lösung mit 1µl/min.

Nach einer Äquilibrationszeit von 30 min wurde ein Bolus von 1000µl Koffein 80 mM an der einen, sowie ein Bolus von 200 µl Halothan 10 Vol% an der anderen zentralen Sonde im M. gracilis der jeweiligen Seite über den Mikrokatheter appliziert.

Die Sammlung der Dialysate aus den Halothan-, Koffeinsonden sowie der Kontrollsonde erfolgte in Intervallen zu 15 min über die gesamte Messzeit von 135 min. So konnten insgesamt 9 Proben pro Sonde ausgewertet werden. Die beiden ersten Dialysate dienten zur Bestimmung der basalen Laktatkonzentration.

Am Ende der Untersuchung wurden alle Katheter entfernt und das Tier gemäß Tierschutzverordnung in tiefer Narkose mit T613 intravenös, unter Überwachung durch EKG und endtidalem pCO₂, getötet.

2.3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Triggerapplikation

Im zweiten Versuchsansatz wurde der mögliche dosisabhängige Anstieg der intramuskulären Laktatkonzentration bei MHS-Schweinen mehr als bei MHN-Schweinen an jeweils 7 MHS- und 7 MHN-Tieren untersucht.

Insgesamt wurden 10 Venenverweilkanülen (Insyte GA 16 Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) Ultraschall-gesteuert platziert. Jeweils 3 in einem Abstand von 1,5 cm zueinander im M. gracilis auf jeder Seite, sowie jeweils ein Katheter im M. pectineus und je ein Katheter im M. sartorius der entsprechenden Seite.

Die MD-Sonden wurden wiederum vor Einbringen in den Muskel über die zuführenden Schenkel blasenfrei mit Ringer-Lösung befüllt. In jede Kanüle wurde nun eine MD-Sonde zusammen mit einem Mikrokatheter eingebracht. Dessen Spitze wurde so positioniert das diese ebenso wieder 5 mm proximal der Spitze der MD-Sonde zu liegen kam.

Nun erfolgte ein Spülen der MD-Sonde mit Ringer-Lösung mit 1µl/min über 15 Minuten. Anschließend erfolgte das Sammeln des Dialysates in Intervallen von je 15 Minuten über die gesamte Messzeit von 120 min. Nach einer Äquilibration von 30 min erfolgte die Applikation eines Bolus von 100µl Halothan in den Konzentrationen von 1, 2.5, 5 Vol% an je einer MD-Sonde im M. gracilis. Zusätzlich wurde ein Bolus von 150 µl Sojabohnenöl (Intralipid, Baxter) an der MD-Sonde im M. pectineus verabreicht und ein weiterer Bolus von 100 µl Halothan 10 Vol% im M. sartorius. Parallel dazu erfolgt eine Applikation von Koffein in den Konzentrationen von 2, 10, 40 mM in einem Volumen von 500 µl an je einer MD-Sonde im M. gracilis der anderen Seite. Koffein 80 mM wurde mit selbigem Volumen an die MD-Sonde im M. sartorius injiziert. 45 min nach Versuchsbeginn, also ein Messintervall später, wurde über den Polyethylenkatheter an der MD-Sonde im M. pectineus zur Kontrolle ein Volumen von 1000µl Ringer-Lösung verabreicht.

Am Ende des Versuches wurden alle Katheter entfernt und ein Exitus letalis des Versuchstieres in tiefer Narkose herbeigeführt.

Sammlung der Dialysate über den gesamten Untersuchungszeitraum, so dass am Ende 8 Proben je MD-Sonde photospektrometrisch untersucht werden konnten.

2.4 Probenanalyse

Der Laktatgehalt in den gewonnen Proben wurde mittels eines photospektrometrischen Verfahrens ausgewertet. Zur Analyse stand ein Photospektrometer des Typs HP 8453-UV-Visible (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland) zur Verfügung.

Vor jeder Laktatmessung wurde eine Eichkurve für Laktat erstellt. Damit sollte eine Genauigkeit jedes Messzyklus gewährleistet werden und somit eine zusätzliche Qualitätssicherung erfolgen. Dazu wurden jeweils 10 µl Laktatstandard (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) der Konzentrationen 4,44 mmol/l, 8,88 mmol/l, sowie 13,32 mmol/l mit 1 ml des Reagenz im dunkeln inkubiert und anschließend gegen das Reagenz als Referenzwert mehrmals gemessen.⁴⁰ Gemäß dem Gesetz von Lambert-Beer wurde daraus eine Eichkurve erstellt.

Zur Vereinheitlichung der Messungen wurden alle Dialysate mit der gleichen Küvette analysiert. Diese wurde vor und nach jeder Messung mit *Aqua ad injectabilia* gründlich ausgespült.

Durch enzymatische Reaktionen mit dem in der Probe enthaltenen Laktat kommt es zu einer Oxidation der im Reagenz enthaltenen chromogenen Vorstufen und damit zu einem Farbniederschlag. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei 540 nm, so dass ein photospektrometrischer Nachweis des Laktats bei dieser Wellenlänge erfolgen kann. In Voruntersuchungen zeigte sich eine direkt-proportionale, lineare Beziehung

zwischen Farbniederschlag und Laktatkonzentration bis zu einer Konzentration von rund 13 mmol/l.

Unmittelbar nach Ende jedes Versuches wurden 10 µl des frischen Dialysates zu 1000µl Laktatreagenz pipettiert, gelöst und für 10 min in Dunkelheit inkubiert. Anschliessend erfolgte die photospektrometrische Messung des Laktats bei einer Wellenlänge von 540 nm. Zusätzlich wurden im Rahmen einer Qualitätssicherung der Messung bei jeder Auswertung drei Laktatstandards mitgemessen.

2.5 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Microsoft Excel und WinStat.

Die Daten der hämodynamischen und metabolischen Untersuchungen werden als Median und Streubreite (Range) angegeben.

Ob signifikante Unterschiede bezüglich der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen MHS und MHN Tieren bestehen wurde mit dem Mann–Whitney–U-Test untersucht. $P \leq 0,05$ wurde dabei als signifikanter Unterschied angenommen.

Der Wilcoxon-Test wurde herangezogen um zum einen Unterschiede zwischen der Koffein- und Halothan-Injektion in Bezug auf die Laktatkonzentration aufzuzeigen und zum anderen bestehende signifikante Unterschiede in 10 und 25 mm vom Applikationsort der Triggersubstanz darzustellen. Auch hier wurde eine statistische Signifikanz bei $p \leq 0.05$ zu Grunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Regionale Verteilung nach intramuskulärer Triggerapplikation

3.1.1. Monitoring

Blutdruck, Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Rektaltemperatur

Es zeigten sich weder zum Messbeginn (Abb.4) noch 60 min nach intramuskulärer Triggerapplikation (Abb.5) signifikante Unterschiede des mittleren arteriellen Blutdruckes zwischen MHS- und MHN-Tieren. Weiter konnte auch kein signifikanter Unterschied innerhalb der Tiergruppen zum Messbeginn und eine Stunde nach Triggeregabe gefunden werden (Abb.6, Abb.7).

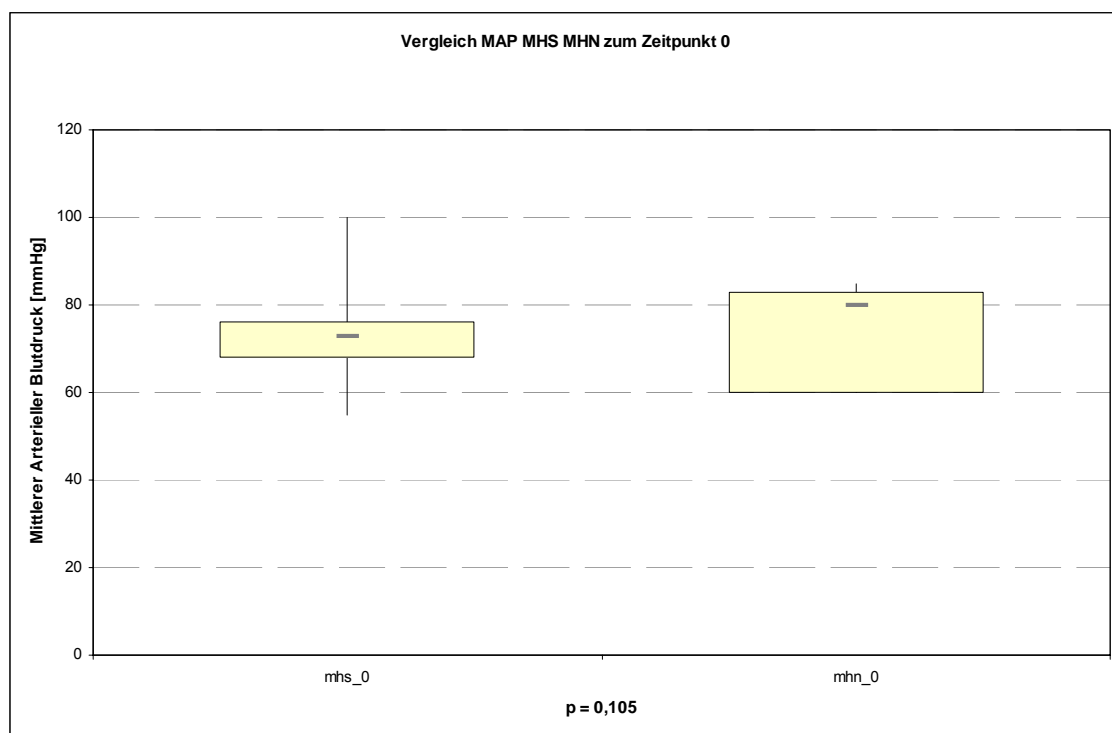


Abb. 4 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) zum Messbeginn (0) bei MHS und MHN

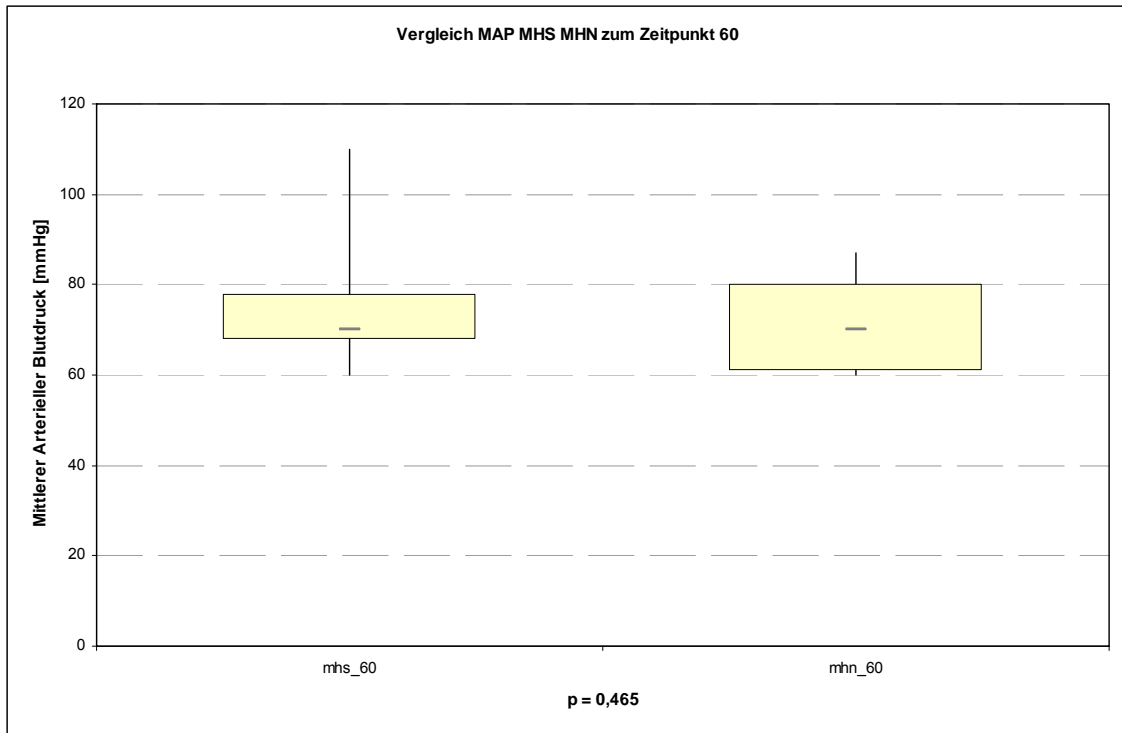


Abb.5 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) bei MHS und MHN 60 min (60) nach Triggeregabe

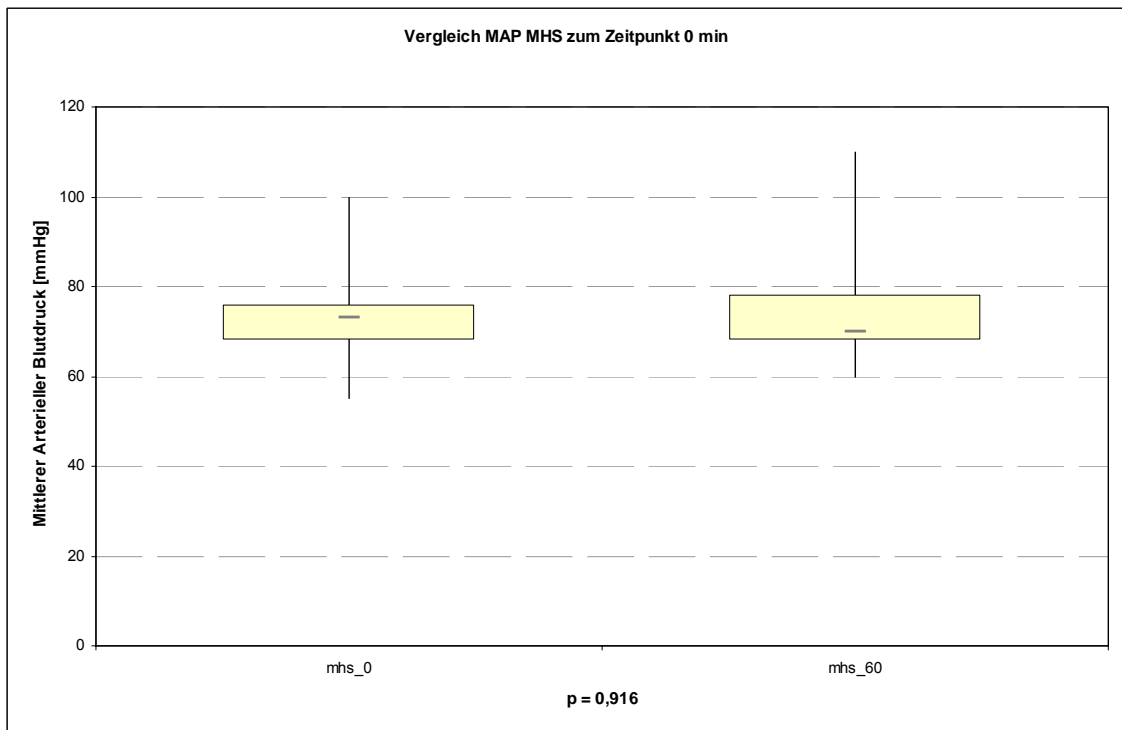


Abb.6 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) innerhalb MHS zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe.

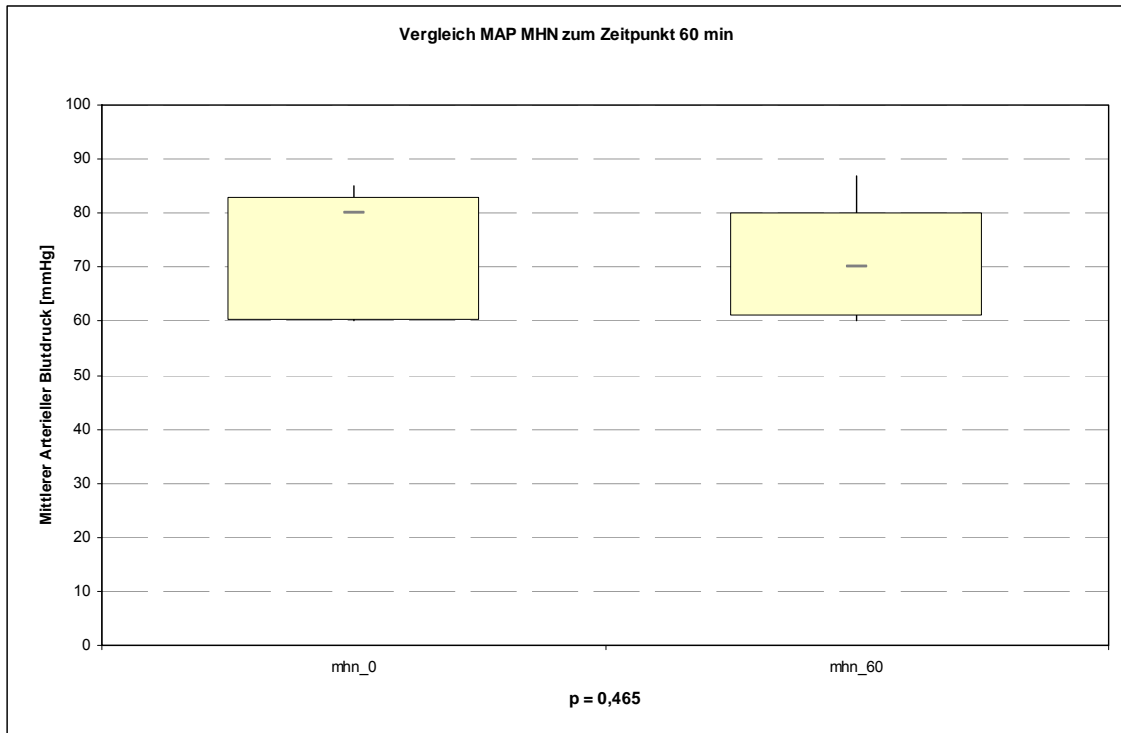


Abb.7 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) innerhalb MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe.

Ebenso zeigten sich keine Unterschiede zum Beginn der Messungen sowie eine Stunde nach Koffein- respektive Halothanapplikation in der ermittelten mittleren Herzfrequenz zwischen MHS- und MHN-Tieren (Tab.1). Die periphere Sauerstoffsättigung lag bei allen untersuchten Tieren zwischen 98 und 100% (Tab.2). Die gemessene Rektaltemperatur zeigte ebenfalls keine Signifikanz in den untersuchten Gruppen (Tab.3).

Tab. 1 Maximale Herzfrequenz (Schläge/min) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe

Herzfrequenz	[Schläge/min]
MHS ₀	80 (70-93)
MHN ₀	73 (66-79)
MHS ₆₀	80 (70-85)
MHN ₆₀	73 (65-80)

Tab. 2 Maximale Sauerstoffsättigung (%) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe

Sauerstoffsättigung	[%]
MHS ₀	99 (99-100)
MHN ₀	99 (99-99)
MHS ₆₀	99 (99-100)
MHN ₆₀	99 (98-99)

Tab. 3 Maximale Rektaltemperatur (°C) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe

Rektaltemperatur	[°C]
MHS ₀	35,8 (35,4-35,8)
MHN ₀	35,4 (34,7-25,6)
MHS ₆₀	35,8 (35,3-36)
MHN ₆₀	35,5 (34,5-35,7)

Venöse Blutgasanalyse

pH-Wert und pCO₂-Wert

In der vor Messbeginn und 90 min nach Triggeregabe durchgeführten venösen Blutgasanalyse zeigten sich in Bezug auf pH-Wert (Tab.4) und pCO₂-Wert (Tab.5) weder zwischen den untersuchten Tieren, noch nach Applikation der Triggersubstanz, signifikante Unterschiede zu den Werten vor Beginn und am Ende der Messungen. Zu keiner Zeit zeigten sich systemische Stoffwechselreaktionen.

Tab. 4 Maximaler venöser pH-Wert von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggeregabe

pH-Wert		p-Wert
MHS ₀	7,53 (7,51-7,53)	0,600
MHN ₀	7,52 (7,47-7,54)	
MHS ₉₀	7,49 (7,49-7,51)	0,554
MHN ₉₀	7,49 (7,44-7,51)	

Tab. 5 Maximaler venöser Kohlendioxid-Partialdruck (pCO₂) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggeregabe

pCO ₂	[mmHg]	p-Wert
MHS ₀	36,0 (31,7-36,3)	0,753
MHN ₀	35,6 (33,3-37,9)	
MHS ₉₀	36,8 (33,7-38,7)	0,248
MHN ₉₀	37,4 (35,6-46,4)	

Laktat

Das venöse bestimmte Laktat zeigte sowohl vor Beginn der Messung, als auch 90 Minuten nach Triggerapplikation sowohl für die Halothan wie auch Koffeingabe keine signifikanten Anstiege zwischen MHS- und MHN-Tieren (Tab.6).

Tab. 6 Maximaler venöser Laktat-Anstieg (mmol/l) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggeregabe

Laktat	[Mmol/l]	p-Wert
MHS ₀	1,3 (1,0-1,5)	0,892
MHN ₀	1,5 (1,1-1,5)	
MHS ₉₀	1,4 (1,1-1,8)	0,418
MHN ₉₀	1,0 (1,0-1,4)	

Myoglobin

Die Blutuntersuchung vor Messbeginn und 90 Minuten nach Triggeregabe wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Werte zwischen den Merkmalsträger bzw. nicht Merkmalsträger der MH auf (Tab.7).

Tab. 7 Maximales venöses Myoglobin (µg/l) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggeregabe

Myoglobin	[µg/l]	p-Wert
MHS ₀	21 (21-25)	0,108
MHN ₀	21 (21-21)	
MHS ₉₀	35 (27-38)	0,138
MHN ₉₀	21 (21-22)	

3.1.2 Mikrodialyse

Nach einer Äquilibrationszeit von 30 min nach Einbringen der MD-Sonden in den Muskel wurden in 15 minütigen Abständen die Laktatwerte im Dialysat gemessen. Die Ausgangswerte zu Beginn der Messung zeigten an der Injektionsstelle bei MHS-Tieren Laktatwerte von 1,3 (1,0-2,0) mM, in 10 mm Entfernung 1,3 (1,1-1,5) mM und in 25 mm Abstand 1,5 (1,1-2,0) mM. Bei MHN-Tieren lagen die basalen Laktatwerte am Injektionsort bei 1,1 (0,9-2,0) mM, in 10 mm Entfernung bei 1,4 (0,8-2,1) mM und in 25 mm Abstand zur Injektionsstelle bei 0,9 (0,6-1,2) mM. Damit unterschieden sich die Werte zu Beginn unter den MHS- und MHN-Tieren nicht signifikant.

Halothan

Nach Applikation von 200µl Halothan 10 Vol% kam es zu einer maximalen Laktatkonzentration am Injektionsort von 8,8 (6,9-9,8) mM bei MHS und einer maximalen Konzentration von 7,5 (4,2-9,0) mM bei MHN. In 10 mm Entfernung kam es zu einem Laktatanstieg bei MHS auf maximal 1,6 (1,4-2,0) mM, bei MHN auf 1,5 (1,3-2,2) mM und somit zu einem Ausbleiben der hypermetabolen Stoffwechselantwort. Hier zeigten sich somit signifikante Unterschiede zum Injektionsort des Triggers. Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Injektionsstelle in 25 mm Entfernung mit Laktatwerten von 2,0 (1,7-2,2) mM bei MHS und Werten von maximal 1,3 (1,0-1,6) bei MHN Tieren bei ebenfalls ausbleibender signifikanten Stoffwechselantwort (Abb. 8).

Eine parallel durchgeführte Kontrollmessung im M. sartorius ergab keine systemische Reaktion in Form eines Laktatanstieges. Damit zeigten sich auch hier signifikante Unterschiede in Bezug auf die Laktatanstiege im Vergleich zum Injektionsort.

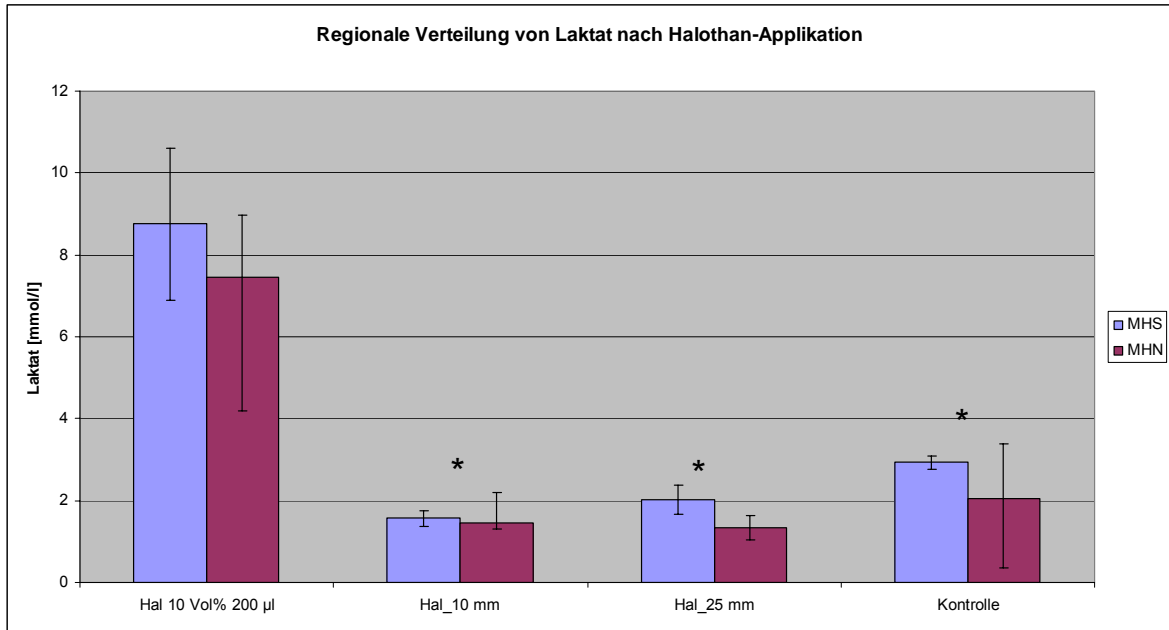


Abb. 8 Regionale Verteilung von Laktat nach intramuskulärer Applikation von 200 µl Halothan 10 Vol% in 10 mm (Hal_10mm) und 25 mm (Hal_25mm) vom Injektionsort

Koffein

Nach Applikation von 1000µl 80mM Koffein kam es bei MHS-Tieren zu einem Anstieg von 1,3 (1,3-1,5) mM auf maximal 5,0 (5,3-3,8) mM am Injektionsort. In 10 mm Entfernung stiegen die Laktatwerte auf maximal 1,94 (1,63-2,94) mM bei einer Ausgangskonzentration von 1,5 (1,3-1,6) mM. In 25 mm Entfernung vom Injektionsort zeigten sich Laktatanstiege von minimal 1,74 (1,0-2,0) mM auf maximal 1,8 (1,6-2,2) mM. Somit zeigte sich erneut ein signifikanter Unterschied im Abstand von 10 mm und 25 mm in Bezug auf den Injektionsort des Triggers.

Bei MHN-Tieren zeigte sich nach Applikation von 1000µl Koffein 80 mM ein Anstieg des Laktats am Injektionsort von basal 1,3 (0,8-1,5) mM auf maximal 3,7 (2,4-4,3) mM. Signifikante Unterschiede bestanden einerseits in 10 mm Entfernung mit Laktatwerten von 1,3 (0,8-1,4) mM auf maximal 1,7 (1,5-2,2) mM. Andererseits auch im Abstand von 25 mm mit Laktatanstiegen von 1,1 (0,9-1,3) mM auf 1,4 (1,3-1,5) mM vom Applikationsort des Triggers.

Die Kontrollmessungen zu Beginn der Gabe von Halothan und Koffein im M. sartorius von MHS-Tieren zeigte Ausgangswerte des Laktats von 1,7 (1,5-3,1) mM. Bei MHN-Tieren lagen die Laktatkonzentrationen vor Messbeginn bei Werten von minimal 1,6 (1,3-1,9) mM.

Nach Applikation des Triggers kam es somit an der Kontrollsonde zu einem nicht signifikanten Anstieg des Laktats. Bei MHS-Tieren fanden sich mit maximalen Werten auf 2,9 (2,3-3,1) mM, bei MHN-Tieren auf maximal 2,0 (1,9-2,4) mM ebenfalls keine signifikanten Anstiege des Laktats.

Eine systemische Reaktion in Form einer hypermetabolen Stoffwechsellage mit Laktatanstieg an der Kontrollsonde konnte somit nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).

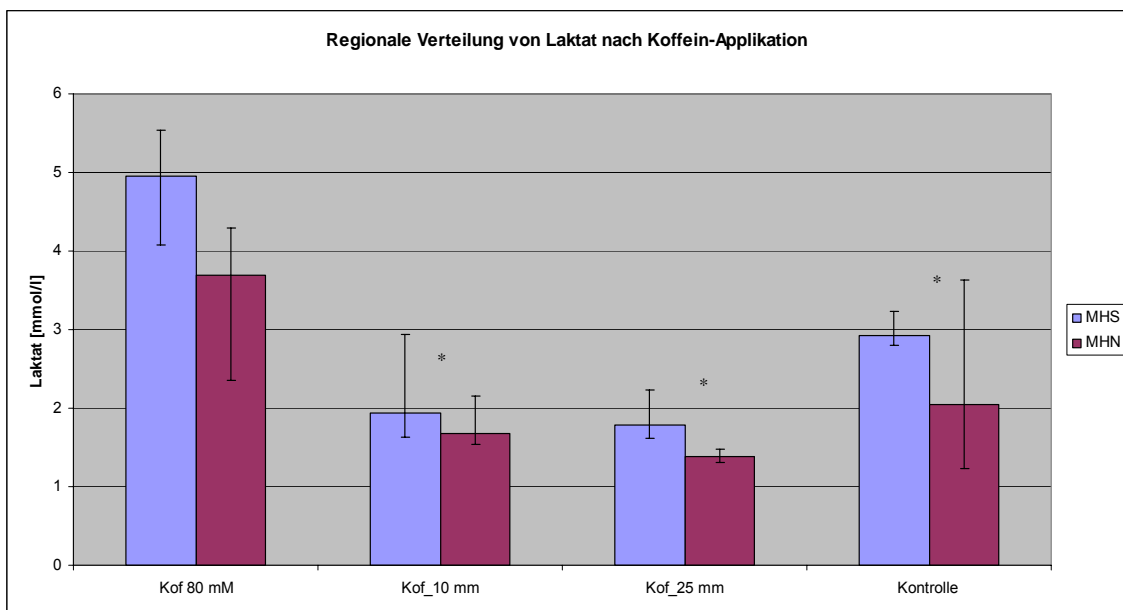


Abb. 9 Regionale Verteilung von Laktat nach intramuskulärer Applikation von 1000µl Koffein 80 mM.

3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung der MH

3.2.1. Monitoring

Blutdruck, Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Rektaltemperatur

Auch hier zeigten sich wie in dem Versuchsansatz zuvor keine signifikanten Unterschiede des mittleren arteriellen Blutdruckes (Tab.8), der Herzfrequenz (Tab.9), der Sauerstoffsättigung (Tab.10) sowie die Rektaltemperatur (Tab.11) betreffend, zu Beginn der Messung und 90 Minuten nach intramuskulärer Triggerapplikation bei MHN- und MHS-Tieren. Weiterhin bestanden auch keine signifikanten Unterschiede innerhalb der untersuchten Gruppen.

Tab. 8 Maximaler Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe

MAP	[mmHg]
MHS Beginn	75 (70-88)
MHN Beginn	80 (69-80)
MHS 60 min	73 (66-83)
MHN 60 min	68 (65-78)

Tab. 9 Maximale Herzfrequenz (Schläge/min) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe

Herzfrequenz	[Schläge/min]
MHS ₀	83 (73-89)
MHN ₀	85 (68-95)
MHS ₆₀	80 (73-84)
MHN ₆₀	73 (70-83)

Tab. 10 Maximale Sauerstoffsättigung (%) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggeregabe

Sauerstoffsättigung	[%]
MHS ₀	99 (99-100)
MHN ₀	99 (99-100)
MHS ₆₀	99 (99-100)
MHN ₆₀	99 (99-100)

Tab. 11 Maximale Rektaltemperatur (°C) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 60 min (60) nach Triggergabe

Rektaltemperatur	[°C]
MHS ₀	35,6 (34,9-35,8)
MHN ₀	35,5 (35,5-35,7)
MHS ₆₀	35,5 (34,9-35,7)
MHN ₆₀	35,3 (35,2-35,5)

Venöse Blutgasanalyse

pH-Wert und pCO₂-Wert

Signifikante Unterschiede hinsichtlich des pH-Wertes (Tab.12) oder des pCO₂-Wertes (Tab.13) in der vor und nach Triggerapplikation untersuchten venösen Blutprobe zwischen MHN und MHS, wie auch innerhalb der MH veranlagten und nicht veranlagter Tiere wurden nicht gefunden.

Tab. 12 Maximaler venöser pH-Wert von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggergabe

pH-Wert		p-Wert
MHS ₀	7,53 (7,53-7,54)	0,600
MHN ₀	7,58 (7,51-7,60)	
MHS ₉₀	7,52 (7,50-7,53)	0,554
MHN ₉₀	7,53 (7,51-7,54)	

Tab. 13 Maximaler venöser Kohlendioxid-Partialdruck (pCO₂) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggergabe

pCO ₂	[mmHg]	p-Wert
MHS ₀	33,7 (31,4-35,3)	0,799
MHN ₀	34,6 (30,8-38,5)	
MHS ₉₀	35,2 (31,3-36,7)	0,865
MHN ₉₀	34,0 (33,4-36,1)	

Laktat

Die in der venösen Blutgasanalyse bestimmten Laktatwerte zeigten sich ebenfalls mit einem Ausgangswert von 1,2 (1,0-1,7) mM bei MHS und 1,1 (0,9-1,3) mM bei MHN und einem maximalen Wert nach Triggerapplikation, bei MHS-Tieren von 1,0 (0,8-1,0) und MHN Tieren 0,8 (0,8-1,1) mM, nicht signifikant unterschiedlich (Tab.14).

Tab. 14 Maximaler venöser Laktat-Anstieg (mmol/l) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggeregabe

Laktat	[Mmol/l]	p-Wert
MHS ₀	1,2 (1,0-1,7)	0,310
MHN ₀	1,1 (0,9-1,3)	
MHS ₉₀	1,0 (0,8-1,0)	0,248
MHN ₉₀	0,8 (0,8-1,1)	

Myoglobin

Systemische Reaktionen konnten während den Messungen nicht nachgewiesen werden. So zeigte sich auch das vor und nach Messbeginn im venösen Blut bestimmten Myoglobins kein signifikanter Unterschied zwischen MHN- und MHS-Tieren (Tab.15).

Tab. 15 Maximales venöses Myoglobin (µg/l) von MHS und MHN zum Messbeginn (0) und 90 min (90) nach Triggeregabe

Myoglobin	[µg/l]	p-Wert
MHS ₀	21 (21-24)	0,179
MHN ₀	21 (21-21)	
MHS ₉₀	22 (21-33)	0,067
MHN ₉₀	21 (21-21)	

3.2.2 Mikrodialyse

Im zweiten Versuchsansatz wurden wiederum nach einer Äquilibrationszeit von 30 min nach Einbringen der MD-Sonden in 15 minütigen Abständen die Laktatwerte im Dialysat photospektrometrisch bestimmt.

Auch hier zeigten sich die basalen Laktatwerte vor den Injektionen der einzelnen Substanzen und somit zum Beginn der Messung unter MHN- und MHS-Tieren nicht signifikant unterschiedlich.

Halothan

Es erfolgte die Applikation eines Bolus von 100µl Halothan in den Konzentrationen von 1, 2,5, 5 Vol% an je einer MD-Sonde im *M. gracilis*. Die Laktatkonzentrationen an der Injektionsstelle von Halothan 1 Vol% zeigten einen Anstieg auf maximal 3,3 (1,8-3,8) mM bei MHS und 1,4 (1,1-1,8) mM bei MHN. Bei $p=0,064$ zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren.

Maximale Laktatkonzentrationen von 3,1 (1,8-3,8) mM bei MHS und 1,4 (1,0-1,6) mM bei MHN nach Applikation von Halothan 2,5 Vol% wiesen bei $p=0,025$ einen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren auf. Ebenso signifikant unterschiedlich zeigten sich bei $p=0,035$ die untersuchten Gruppen nach einer Bolusgabe Halothan 5 Vol% mit maximalen Laktatwerten bei MHS von 5,3 (5,1-10,4) mM und 1,5 (1,4-2,7)mM bei MHN

Nach Applikation von 100µl Halothan 10 Vol% konnte bei Werten von 9,4 (6,9-14,3) mM bei MHS und maximalen Laktatkonzentrationen von 8,6 (6,6-9,5) mM bei MHN kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($p=0,482$).

Das mit einem Volumen von 150µl intramuskulär verabreichte Sojabohnenöl (Intralipid), als Trägersubstanz des Halothans, zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der maximalen Laktatkonzentrationen zwischen MHS- und MHN-Tieren (MHS 1,6 (1,4-1,9) mM; MHN 1,2 (1,1-2,3) mM).

Auch nach Applikation von 1000µl Ringer-Lösung an der MD-Sonde im M. pectineus zeigte sich ein Ausbleiben einer signifikanten Stoffwechselantwort. Die maximalen Laktatkonzentrationen betragen bei MHS 1,4 (1,2-1,8) mM und bei MHN 1,3 (1,2-1,8) mM ($p= 0,886$).

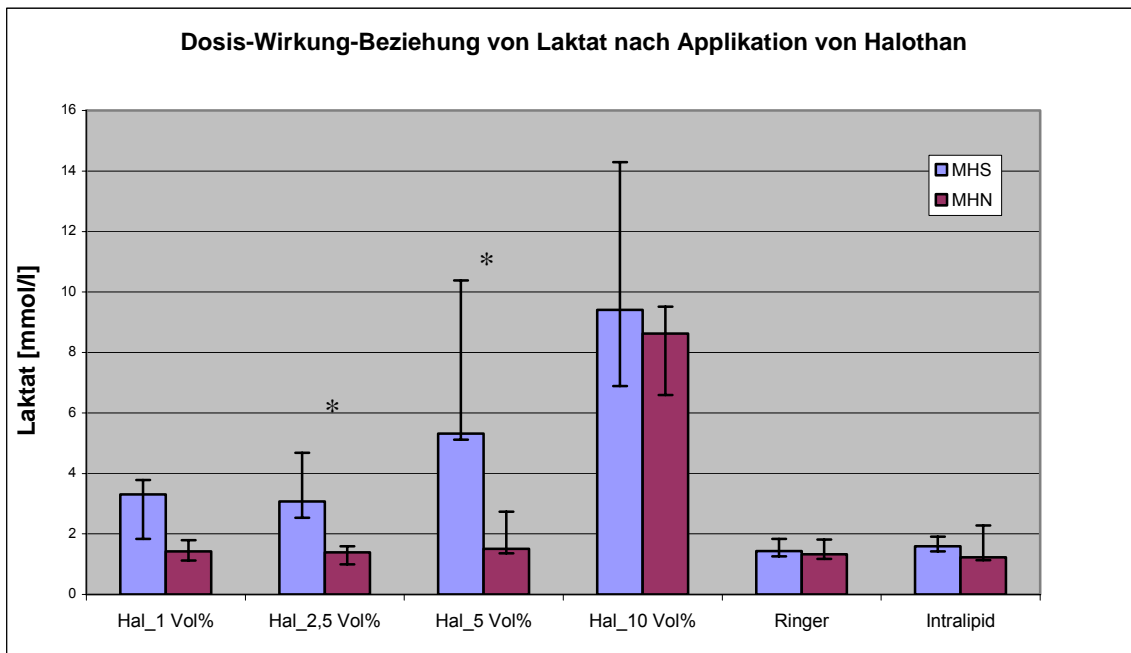


Abb. 10 Dosis-Wirkungsbeziehung von Laktat nach Applikation von 100 µl Halothan in den Konzentrationen 1, 2.5, 5 und 10 Vol%.

Koffein

Nach Koffeinapplikation von 500µl in einer Konzentration von 2 mM kam es zu einem maximalen Laktatanstieg bei MHS auf 1,8 (1,4-2,5) mM und bei MHN auf 1,4 (1,1-1,5). Bei einem p -Wert von 0,116 zeigte sich auch hier keine Signifikanz zwischen den Gruppen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den maximalen Laktatkonzentrationen bei MHS und MHN konnte jedoch nach der Applikation von Koffein 10 mM mit einem p -Wert von 0,004 gefunden werden (MHS 2,7 (2,3-4,1) mM; MHN 1,4 (1,3-1,5) mM).

Ebenfalls stellten wir bei maximalen Laktatwerten von 4,7 (4,4-4,7) mM bei MHS- und 1,35 (1,0-1,9) mM bei MHN-Tieren einen signifikanten Unterschied nach Verabreichung von Koffein der Konzentration 40 mM fest ($p= 0,003$).

Bei höheren Konzentrationen, in unserem Fall 80 mM Koffein, konnte eine lokale, hypermetabole Stoffwechselreaktion sowohl bei MHS- wie auch bei MHN-Tieren gefunden werden. Ein signifikanter Unterschied bei maximalen Laktatkonzentrationen von 4,6 (4,4 -4,9) mM bei MHS und 2,8 (2,0- 4,4) mM bei MHN lag bei $p= 0,150$ somit nicht vor.

Die Kontrolluntersuchung im *M. pectineus* nach Applikation von 1000 μ l Ringer-Lösung ergab bei einem p-Wert von 0,886 und maximalen Laktatkonzentrationen von 1,4 (1,2-1,8) mM bei MHS und 1,3 (1,2-1,8) mM bei MHN wiederum keinen signifikanten Unterschied zwischen Merkmalsträgern und nicht-Merkmalsträger für die MH.

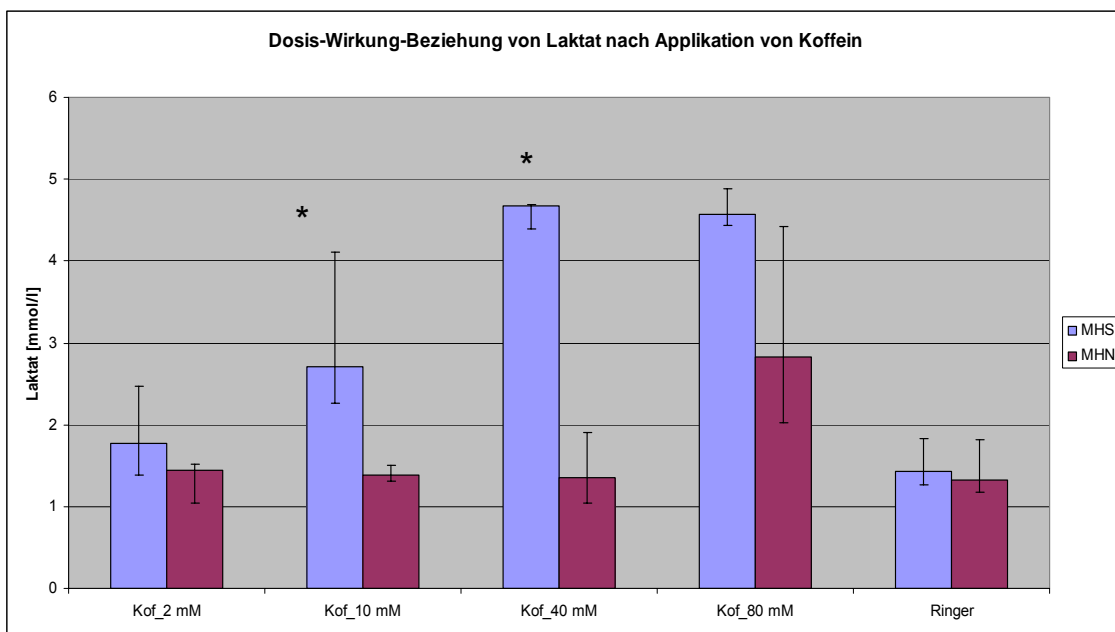


Abb. 11 Dosis-Wirkungsbeziehung von Laktat nach Applikation von 500 μ l Koffein in den Konzentrationen 2, 10, 40 und 80 mM.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass (a) die interstitielle Laktatkonzentration durch die intramuskuläre Injektion von Sojabohnenöl und Ringerlösung nicht verändert wird, (b) die verwendeten Dosierungen zu keiner schwerwiegenden systemischen oder lokalen Reaktion führten, (c) es nach Applikation von Halothan und Koffein zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Laktat bei MHS-Schweinen kommt und (d) die Ausbreitung des Hypermetabolismus gemessen an Laktat nach Applikation von Triggersubstanzen auf ein Areal < 10 mm um die Injektionsstelle begrenzt ist.

4.1 Mikrodialyse

Die Technik der Mikrodialyse zur in-vivo Untersuchung von Medikamentenkonzentrationen, deren Konzentrations-Zeit-Verläufe⁴¹, Konzentrationsmessungen diverser interstitieller Metaboliten in Experimenten, wie auch in der klinischen Anwendung hat sich sehr gut etabliert.⁴²⁻⁴⁸

Basierend auf einer passiven Diffusion an einer semipermeablen Membran kommt es zu einem Konzentrationsaustausch zwischen den Kompartimenten ins Perfusat.³⁴ 1997 wurde in einer Publikation an Freiwilligen erstmals gezeigt, dass der zelluläre Metabolismus durch, über Mikrodialyse-Katheter zugeführte Substanzen, beeinflusst werden kann und diese Veränderungen anhand eines Metaboliten im Dialysat messbar sind.^{49;50}

Diese Möglichkeit der Untersuchung erlaubt Aussagen über den lokalen Skelettmuskelmetabolismus ermitteln zu können, unabhängig der variablen systemischen Effekte.

In der vorliegenden Arbeit wurden interstitielle metabolische Veränderungen nach Verabreichung intramuskulärer Triggersubstanzen der MH an Schweinen untersucht und gemessen.

Als Pathomechanismus auf zellulärer Ebene gilt bei MHS-Individuen eine Mutation am sarkoplasmatischen Ryanodinrezeptor der Skelettmuskulatur als gesichert.^{51,52} Hierbei kommt es nach Triggerapplikation zu einer unkontrollierten Freisetzung von Calcium. Der dadurch in einer MH-Krise ausgelöste systemische Hypermetabolismus resultiert in einer Hypoxie, Hyperkapnie, Laktatazidose und Wärmeproduktion mit Anstieg der Körpertemperatur.⁵³ Als Zeichen einer im Verlauf der MH-Krise auftretenden anaeroben Stoffwechsellaage zeigt sich ein erhöhter venöser Ausstrom von Laktat aus den Muskelzellen.⁵⁰ Im Hinblick dieser gesicherten Erkenntnisse scheint die intramuskuläre Messung von Laktat mittels MD-Sonden eine brauchbare Methode zu sein um den entstehenden Hypermetabolismus *in vivo* untersuchen zu können.

4.2. Dosisabhängigkeit der Malignen Hyperthermie

Abgesehen von der klinischen Manifestation der MH konnte in der Testung mit dem IVCT, bei MH-veranlagten Patienten, eine intraindividuelle Variabilität der Kontraktionsantworten untersuchter Muskulatur gefunden werden.⁵⁶ Dabei ist es unklar, weshalb es bei manchen Patienten nach Triggerapplikation zu einer fulminanten MH-Krise, wiederum bei anderen nur zu abortiven Verlaufsformen oder lediglich zu einer Rhabdomyolyse oder eines Masseterspasmus kommt. In Tierversuchen Mitte der achtziger Jahre konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Durch eine durch Inhalation von Halothan ausgelöste Muskelrigidität bei Schweinen, im sogenannten *Barnyard Test*, wurde eine MH-Veranlagung diagnostiziert.⁵⁷ Nach Wegnahme des volatilen Anästhetikums erholten sich die Tiere prompt.⁵⁸

Schon in vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es mittels Injektion kleiner Mengen von Halothan oder Koffein in die Muskulatur von MH-Patienten zu einer lokalen hypermetabolen Stoffwechselreaktion am Applikationsort kommt.³⁰ Es zeigten sich der Pathophysiologie der MH ableitende Symptome mit Laktat- und CO₂-Anstiegen als Antwort einer

gesteigerten Glykolyse. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass höhere Dosierung von Halothan auch bei nicht MH-veranlagten Patienten zu einer vermehrten Stoffwechselantwort führten, ja sogar einmalig ein gleiches Erscheinungsbild wie bei MH-veranlagten Patienten auftrat.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun unterschiedliche Konzentrationen an Halothan und Koffein intramuskulär injiziert. Dabei zeigte sich je nach Konzentration der Triggersubstanz eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für Laktat im Vergleich von MHS- und MHN-veranlagten Tieren. Annahme hierfür ist einer, durch die Substanzen ausgelöster Hypermetabolismus und gesteigerte anaerobe Glykolyse im Muskel.

Bei Halothankonzentrationen von 2,5 und 5 Vol% zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen MHN- und MHS-Tieren. Bei Applikation von höheren Konzentrationen, in unserem Fall von 10 Vol%, konnten keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse mehr festgestellt werden.

Bei Applikation von Koffein ließen sich ähnliche Beobachtungen machen. Auch hier zeigte sich bei Konzentrationen von 10 und 40 mM eine Signifikanz zwischen den Gruppen, welche nach weiterer Dosissteigerung nicht festgestellt werden konnte. Es kam auch bei MHN-Tieren zu einer der MH-ähnlichen Reaktion, wie dies schon bei geringeren Konzentrationen bei MHS-Tieren gefunden werden konnte.

Somit lässt dies eine gewisse Dosisabhängigkeit der Malignen Hyperthermie vermuten.

Ob es nun einen definierbaren Schwellenwert zur Auslösung einer MH bei nicht veranlagten Tieren gibt bleibt offen und kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Vielmehr bleibt es Gegenstand weitere Untersuchungen. Dabei gilt folgendes zu beachten: Hartung et al konnte zeigen, dass Koffein in einer Konzentration von mehr als 32 mM eine maximale Skelettmuskelkontraktur *in vitro* auslöst.⁶¹ In der hier beschriebenen Studie wurde Koffein in unterschiedlicher Dosierung verwendet. Unter anderem auch 40 mM, womit ein Unterschied zwischen den Gruppen noch nachgewiesen werden konnte. Allerdings muss man hier annehmen, dass die Koffeinkonzentration nach

Applikation in den Muskel durch Verdünnung mit interstitieller Flüssigkeit relevant abnimmt. Die genaue Konzentration im Muskel bleibt somit unbekannt. Halothan, intravenös appliziert, verursacht ausgeprägte zelluläre Schädigungen.⁵⁹ Aus diesem Grund wurde ein lipidlösliches Gemisch mit Sojabohnenöl hergestellt, um die schädigende Wirkung zu eliminieren.⁶⁰ Nach Injektion des Substanzgemisches an den Applikationsort kann Halothan an die Muskelzellen diffundieren. Wie hoch allerdings die dort erreichte Konzentration ist bleibt wiederum unbekannt und ist, wie auch beim Koffein, wohl von Tier zu Tier unterschiedlich.

Abgesehen davon kann, aus den empirisch ermittelten Konzentrationen für Halothan und Koffein, in der vorliegenden Arbeit eine sich zeigende Dosis-Wirkungsbeziehung für Laktat abgeleitet werden.

4.3. Regionale Effekte nach intramuskulärer Triggerapplikation

In Voruntersuchungen konnte ANETSEDER et al. zeigen, dass es durch die lokale Applikation von Triggersubstanzen bei MHS-Patienten zu keiner generalisierten MH-Krise kommt.³⁰ Ebenfalls konnten nach Injektion von Halothan und Koffein am Skelettmuskel in Tierversuchen bei der anschließenden histologischen Aufarbeitung der Muskelpräparate keine schwerwiegenden Gewebsschädigungen um die Applikationssonde nachgewiesen werden.^{38;39}

DE LANGE et al. konnten in Ihrer Arbeit zeigen, dass es um die MD-Sonde zu einem starken Konzentrationsabfall der applizierten Substanzen in einem Abstand von wenigen Millimetern kommt.⁵⁴ Dieses Modell ist für die Halothan- und Koffeinapplikation nicht validiert, jedoch konnten ähnliche Beobachtungen nach Injektion dieser Trigger mit ausbleibendem signifikanten Laktat- und Kohlendioxid-Partialdruck-Anstieges in der umgebenden Muskulatur bei MHS-Patienten gemacht werden.³⁰

Ebenfalls konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass das Ergebnis von unterschiedlichsten Faktoren abhängig ist. So breitete sich eine

Substanz in einer senkrecht im Muskel platzierten Sonde in kranio-kaudaler Richtung entlang der Muskelfasern aus. Auch führt ein zu hoher Injektionsdruck bei der Applikation der Triggersubstanzen zu einer Ausbreitung der Substanz in von der Messsonde entfernte Muskelareale, welches kernspintomographisch nachgewiesen werden konnte. Die applizierten Dosierungen und Konzentrationen sind nicht abschließend bekannt und definiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen richteten sich an die im Tierversuch⁵⁷ und bei Probanden bisher ermittelten Werte.³⁰

Um diese externen Faktoren so klein wie möglich zu halten wurden zum einen die Mess- und Applikationssonden Ultraschall-gesteuert in der Muskulatur platziert. Zum anderen wurden die Triggersubstanzen kontinuierlich über eine Spritzenpumpe verabreicht um einen gleich bleibenden Druck zu gewährleisten. Wir konnten beobachten, dass nach kontinuierlicher Injektion von 200µl Halothan 10 Vol% und 1000µl 80 mM Koffein es sowohl bei MHN- wie auch bei MHS-Tieren lediglich am Applikationsort zu einem Anstieg der Laktatkonzentration kam. Keine Anstiege der Laktatkonzentrationen wurden in 10 mm und 25 mm vom Applikationsort gemessen. Hier zeigte sich eine Signifikanz in Bezug auf die Injektionsstelle der Triggersubstanzen.

Ebenso konnten keine Laktatanstiege, an der in einem anderen Muskel eingebrachten Kontrollsonde, als Hinweis einer generalisierten Reaktion auf die Triggersubstanzen und somit einer hypermetabolen Stoffwechselantwort verzeichnet werden.

Weiter stellten wir fest, dass durch die intramuskuläre Injektion von Sojabohnenöl und Ringer-Lösung es zu keiner Modulation der Laktatwerte im Muskel kommt.

Die aufgezeichneten hämodynamischen und metabolischen Parameter, insbesondere der pH-Wert, die Laktatkonzentration und das pCO₂, zeigten sich sowohl vor Messbeginn, wie auch 60 min nach Applikation der Triggersubstanzen sowohl bei MHN- und MHS-Tieren ohne signifikanten Unterschied in den einzelnen Gruppen sowie zueinander. Somit kann auch hier

auf eine nur lokal ausgelöste Stoffwechselantwort nach Triggeregabe, nicht jedoch auf eine systemisch ausgelöste Reaktion, geschlossen werden.

In wie fern andere, respektive noch höhere Dosierungen und Konzentration der Triggersubstanzen Auswirkungen auf die regionale Ausbreitung der Stoffwechselreaktion haben, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden und muss an anderer Stelle überprüft werden.

4.4 Laktatkonzentration im Muskel

Wie bereits schon erwähnt kann keine genaue Aussage über die tatsächliche Konzentration der Triggersubstanzen am Muskel getroffen werden. So auch nicht über die im Muskel absolut vorhandene Laktatkonzentration nach Triggeregabe. Ebenfalls abhängig von der Perfusionsgeschwindigkeit und der verwendeten Mikrodialysemembranen zeigen sich auch die im Dialysat nachweisbaren Laktatkonzentrationen.

Die hier gemachten Ergebnisse decken sich jedoch mit den Beobachtungen der in-vivo Messungen³⁰ und den vorangegangenen Untersuchungen am Tiermodell.

4.5. Resümee

In der vorliegenden Arbeit kann ein, durch Halothan- und Koffeinapplikation ausgelöster, dosisabhängiger Laktatanstieg in MHN- und MHS-Tieren klar gezeigt werden. Die lokale Applikation von Triggersubstanzen zeigt sich auf ein Gebiet von < 10 mm um den Injektionsort begrenzt. Eine systemische MH-Reaktion wird nicht ausgelöst.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, insbesondere zur Dosis- und Konzentrationsfindung der Triggersubstanzen um einen definierten Schwellenwert zur Auslösung einer MH-Reaktion zu erhalten. Somit kann möglicherweise die Sensitivität und Spezifität der in-vivo-Messung verbessert

und damit ein vielversprechendes, minimal-invasives Verfahren weiter verbessert und zur Routinediagnostik in der klinischen Anwendung etabliert werden.

5. Zusammenfassung

Die erbliche, autosomal-dominante Veranlagung zur Malignen Hyperthermie kann unter Exposition mit so genannten Triggersubstanzen, wie volatilen Inhalationsanästhetika und depolarisierenden Muskelrelaxantien, beim Menschen zu einem fulminanten Krankheitsbild mit Rigor, zellulärer Hypoxie, Hyperkapnie, Hypermetabolismus, Rhabdomyolyse und Tod führen. Auf zellulärer Ebene gilt eine Störung des Kalzium-Kanals am sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskulatur als gesichert. Die Inzidenz einer MH-Krise wird auf 1:60 000 geschätzt, die Prävalenz wird um ein Vielfaches höher angenommen. Die unmittelbare Diagnose im klinischen Alltag kann aufgrund der vielen Differentialdiagnosen oft schwer zu stellen sein. Wird eine MH-Krise jedoch nicht unmittelbar adäquat behandelt, geht diese mit einer Mortalitätsrate von ca. 5 % einher.¹⁵

Der In-vitro Kontrakturtest (IVCT),¹⁰ mit einer Sensitivität von 99% und einer Spezifität von 93% ist der bisheriger Goldstandard in der MH-Diagnostik. Allerdings liegen seine Nachteile in seiner Invasivität, der hohen Belastung für den Patienten, so wie seinem finanziellen und zeitlichen Aufwand.^{23;55}

In vorangegangenen Untersuchungen zeigte Anetseder et al. an Ratten, MH-veranlagten Schweinen, in zwei Studien an MH-veranlagten und MH-nicht-veranlagten Patienten sowie an gesunden Probanden³⁰ erstmals, dass mit Hilfe der Mikrodialyse, unter Applikation von MH-Triggersubstanzen, eine gute Differenzierung zwischen veranlagten und gesunden Probanden möglich ist.^{30;38}

In wie weit sich dieser ausgelöste Hypermetabolismus auf die lokale

Applikationsstelle begrenzt und ob es eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen MHS- und MHN-Merkmalsträgern gibt war bisher noch unklar.

Wir nahmen aus den gemachten Voruntersuchungen an, dass eine intramuskuläre Injektion von Halothan und Koffein zu einem dosisabhängigen Anstieg der lokalen Laktatkonzentration in MHS- und MHN-Schweinen führt und der lokale Hypermetabolismus auf ein kleines Areal um die Applikationsstelle begrenzt ist.

Mit Zustimmung der örtlichen Tierschutzkommission wurden bei 7 MHS- und 7 MHN-Schweinen in Allgemeinanästhesie Mikrodialysesonden in die Hinterläufe platziert und mit Ringer-Lösung (1 μ l/min) kontinuierlich perfundiert. Nach Äquilibration wurden aufsteigende Konzentrationen von Halothan gelöst in Sojabohnenöl (1, 2.5, 5 und 10 Vol%) und Koffein (2, 10, 40, 80 mM) als Bolus an die Spitze der MD-Sonde appliziert.

Im zweiten Versuchsansatz wurden bei 7 MHS- und 6 MHN-Schweinen wiederum Mikrodialysesonden diesmal im Abstand von 10 und 25 mm Ultraschall-gesteuert platziert und kontinuierlich mit Ringerlösung mit 1 μ l/min perfundiert. Nach Erreichen eines Steady-states wurden an die Spitzen der zentralen Sonden 100 μ l Halothan 10 Vol%, gelöst in Sojabohnenöl, und 1000 μ l Koffein 80mM injiziert. Im aufgefangenen Dialysat wurde Laktat jeweils photospektrometrisch bestimmt.

Systemische metabolische und hämodynamische Parameter wurden kontinuierlich erfasst.

Bei gleichen Ausgangswerten konnte bei lokaler Applikation von Halothan und Koffein in steigenden Dosierungen ein signifikant höherer dosisabhängiger intramuskulärer Laktatanstieg bei MHS- im Gegensatz zu MHN-Schweinen gezeigt werden.

Signifikante intramuskuläre Laktatanstiege nach Applikation von Halothan und Koffein zeigten sich jeweils nur am Applikationsort, nicht jedoch in 10 und 25 mm Abstand.

Die systemischen hämodynamischen und metabolischen Parameter blieben bei allen untersuchten Tieren im Normbereich. Es zeigte sich keine signifikante Erhöhung des Serum-Myoglobins und des Serumlaktates als Hinweis auf eine abgelaufene systemische Stoffwechselreaktion.

Somit konnte gezeigt werden, dass es nach lokaler Applikation der Triggersubstanzen Koffein und Halothan bei MHS-Schweinen zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für intramuskuläres Laktat kommt und die Ausbreitung des Hypermetabolismus gemessen an Laktat nach Applikation von Koffein und Halothan auf ein kleines Areal um die Injektionsstelle begrenzt ist. Eine systemische MH-Krise wird nicht ausgelöst.

6. Literaturverzeichnis

1. Gronert GA, Antognini JF, Pessah IN: Malignant Hyperthermia, Anesthesia. Edited by Miller RD (ed). Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, pp 1033-52
2. Rushman GB(1998) A short History of Anaesthesia – The first 150 years. Butterworth, Heinemann
3. Gibson C et al. (1900) Meeting of the surgical Section of the New York Academy of Medicine. JAMA: 1685
4. Burford GE (1940) Hyperprexia following anaesthesia. A consideration of control of body temperature during anaesthesia. Anaesthesiology 1: 208-215
5. Denborough MA, Lovell RRH: Anaesthetic deaths in a family. Lancet 1960; 2: 45-50
6. Hall LW, Woolf N, Bradley JW, Jolly DW: Unusual reaction to suxamethonium chloride. Br.Med.J. 1966; 2: 1305
7. Berman MC, Harrison GG, Dutoit P, Bull JE, Keuch JE : Halothan induced hyperprexia in landrace pigs. S Afr Med J, 1969, 43: 545-546

8. Kalow W, Britt BA, Terraue ME, Haist C: Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet* 1970, ii: 895-898

9. Ellis FR, Harriman DGF, Keaney NP, Kyei-Mensah K, Tyrell JH: Halothane induced muscle contracture as a cause of hyperprexia. *Br J Anaest*, 1971, 43: 721 -722

10. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. The European Malignant Hyperpyrexia Group. *Br.J.Anaesth.* 1984; 56: 1267-9

11. Larach M.G.for the North American Malignant Hyperthermia Group: Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. *Anesth Analg* 1989; 69: 511-5

12. Harrison GG: Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br.J.Anaesth.* 1975; 47: 62-65

13. Anetseder M, Roewer N: Maligne Hyperthermie, *Die Anästhesiologie*. Edited by Rossaint WZ. Springer, 2004, pp 1318-26

14. Halliday NJ: Malignant hyperthermia. *J Craniofac Surg*, 2003, Sep; 14(5): 800-2

15. Ording H: Incidence of malignant hyperthermia in Denmark. *Anesth.Analg.* 1985; 64: 700-4

16. Loghmanee F, Tobak M: Fatal malignant hyperthermia associated with recreational cocaine and ethanol abuse. *Am.J.Forensic Med.Pathol.* 1986; 7: 246-8

17. Olthoff D, Vonderlind C: [Anesthesia unrelated triggering of a fatal malignant hyperthermia crisis]. *Anaesthesist* 1997; 46: 1076-80

18. Fiege W, Wappler F, Weisshorn R, Gerbershagen MU, Menge M, Schulte am Esch J: Induction of malignant hyperthermia in susceptible swine by methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Anaesthesiology*, 2003, Nov;99(5):1132-6

19. Froeba G, Marx T, Pazhur J, Baur C, Baeder S, Calzia E, Eichinger HM, Radermacher P, Georgieff M: Xenon does not trigger malignant hyperthermia in susceptible swine. *Anaesthesiology*, 1999, Oct;91(4): 1047-52

20. Roewer N, Anetseder M: Cardiovascular Alterations in Malignant Hyperthermia, *Malignant Hyperthermia*. Edited by Schulte am Esch JS, Scholz J, Wappler F. Lengerich, Pabst Science Publishers, 2000, pp 134-41

21. Rosenberg H, Reed S: In vitro contracture tests for susceptibility to malignant hyperthermia. *Anesth.Analg.* 1983; 62: 415-20
23. 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 Y, 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: results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. The European Malignant Hyperthermia Group. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1997; 41: 955-66
24. Bendahan D, Guis S, Monnier N, Kozak-Ribbens G, Lundardi J, Ghattas B, Mattei J-P, Cozzone P.J: Comparative analysis of in vitro contracture tests with ryanodine and a combination of ryanodine with either halothane or caffeine: a comparative investigation in malignant hyperthermia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004; 48:1019—1027
25. Robinson R, Hopkins P, Carsana A et al.:Several interacting genes influence the malignant hyperthermia phenotype. *Hum Genet* 2003; 112: 217—8.
26. Robinson RL, Curran JL, Ellis FR, Halsall PJ, Hall WJ, Hopkins PM, Iles DE, West SP, Shaw MA: Multiple interacting gene products may influence susceptibility to malignant hyperthermia. *Ann Hum Genet* 2000; 64: 307—20.

27. Sei Y, Brandom BW, Bina S, et al. Patients with malignant hyperthermia demonstrate an altered calcium control mechanism in B lymphocytes. *Anesthesiology* 2002;97:1045–6.
28. Anetseder M, Hager M, Müller CR, Roewer N. Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test. *Lancet* 2002;359:1579–80.
29. Giard T, Treves S, Voronkov E, Siegemund M, Urwyler A: Molecular genetic testing for malignant hyperthermia susceptibility. *Anaesthesiology*, 2004, May;100(5):1076-80
30. Anetseder M, Hager M, Muller-Reible C, Roewer N: Regional lactate and carbon dioxide concentrations in a metabolic test for malignant hyperthermia. *Lancet* 2003; 362: 494
31. Biot L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N: The concentration of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain and blood plasma of the dog. *J neurochem*, 1966, 13:1057-67
32. Benveniste H, Huttermeier P.C: Microdialysis: theory and application. *Prog Neurobiol*, 1990;35:195-215
33. Ungerstedt U: Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. In: *Mesaurement of neurotransmitter Release In Vivo*. Hrsg. CA Marsden, Wiley Nex York, 1984, 1-13

34. Ungerstedt U.: Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. *J.Int.Med.* 1991; 230: 365-73

35. Korth U, Klein J: Methodik und Anwendung der Mikrodiälyse. *Anästhesie&Intensivmedizin*, 2001, 42:732-39

36. Jacobson I, Sandberg M, Hamberger A: Mass transfer in brain dialysis devices--a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration. *J.Neurosci.Methods* 1985; 15: 263-8

37. Korth U, Merkel G, Fernandez FF, Jandewerth O, Dogan G, Koch T, van Ackern K, Weichel O, Klein J: Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anaesthesiology*, 2000, 93:1407-1412

38. Anetseder M, Sachs M, Hoyer A, Hartung E, Roewer N: Local intramuscular application of halothane in MH-susceptible pigs without systemic effects. *Anesthesiology* 2000; 93: U209

39. Anetseder M, Sachs M, Hoyer A, Hartung E, Roewer N: Intramuscular halothane and caffeine application induces local hypermetabolism in MH-susceptible pigs but not in normal pigs. *Anesthesiology* 2000; 93: U209

40. Lactate (Procedure No. 735) Operating instructions; Sigma Diagnostics, Deisenhofen, Germany.

41. Elmquist WF, Sawchuk RJ: Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res*, 1994, 14:267-88
42. Müller M: Microdialysis in clinical drug delivery studies. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000;45:355-69
43. Brunner M, Pernerstorfer T, Mayer BX, Eicher HG, Müller M: Surgery and intensive care procedures affect the target site distribution of piperacillin. *Crit Care Med*, 2000, 28:1754-59
44. Delgado JMR, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM: Dialytrode for long term intercerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn*, 1972, 198:9-21
45. Felländer G, Nordenström J, Tjäder I, Bolinder J, Arner P: Lipolysis during abdominal surgery. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78:150-55
46. Ernberg M, Hedenberg-Magnusson B, Alstergren P, Kopp S: The level of serotonin in the superficial masseter muscle in relation to local pain and allodynia. *Life Sci*, 1999, 65:313-25
47. Ernberg MM, Alstergren PJ: Microdialysis of neuropeptide Y in human muscle tissue. *J Neurosci Methods*, 2004, 30;132(2):185-90
48. Petersen LJ, Church MK, Skov PS: Platelet-activating factor induces histamine release from human skin mast cells in vivo, which is reduced by local nerve blockade. *Clin Exp Allergy*, 1997, 27;284-95
49. Müller M, Burgdorff T, Jansen B et al.: In vivo drug-response measurements in target tissues by microdialysis. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62:165-70

50. Müller M, Fasching P et al.: Inhibition of paracrine angiotensin-converting enzyme in vivo: Effects of interstitial glucose and lactate concentrations in human skeletal muscle. *Europ J Clin Investig* 1997; 27: 825-830
51. Hermann-Frank A, Richter M, Lehmann-Horn F. 4-chloro-m-cresol: a specific tool to distinguish between malignant hyperthermia-susceptible and normal muscle. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 149-155
52. MacLennan DH, Phillips MS. The Role of the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) in Malignant Hyperthermia and Central Core Disease. In: *Ion Channels and Genetic Diseases 1995* by The Rockefeller University Press
53. Urwyler A, Hartung E: Die Maligne Hyperthermie. *Anaesthesist*, 1994, 43:557-69
54. De Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD: Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1997; 25: 27-49
55. Mueller R, Anetseder M, Hoyer A, Hartung E, Roewer N: Outcome evaluation of patients after muscle biopsy for malignant hyperthermia testing. *Anesthesiology* 2000; 93: U210
56. Fiege M, Wappler F, Weisshorn R, et al.: Results of contracture test with halothan, caffeine, and ryanodine depend on different malignant-

hyperthermia-associated ryanodin receptor gene mutations.
Anaesthesiologie, 2002, 97;345-50

57. McGrath CJ, Lee JC, Rempel WE: Halothan testing for malignant hyperthermia in swine: dose-response effects. Am J Vet Res, 1984, 45;1734-6
58. Fletcher JE, Conti PA, Rosenberg H: Comparison of North American and European malignant hyperthermia group halothane contracture testing protocols in swine. Acta Anaesthesiol.Scand. 1991; 35: 483-7
59. Hartung E, Anetseder M: The Standard In-Vitro Contracture Test, Malignant Hyperthermia. Edited by Schulte am Esch JS, Scholz J, Wappler F. Lengerich, Pabst Science Publishers, 2000, pp 251-61
60. Musser JB, Fontana JL, Mongan PD: The anesthetic and physiologic effects of an intravenous administration of a halothane lipid emulsion (5% vol/vol). Anesth Analg 1999; 88: 671-5
61. Frank Schuster , Thomas Metterlein , Sabrina Negele , Annegret Gardill , Ulrich Schwemmer , Norbert Roewer , Martin Anetseder: Intramuscular Injection of Sevoflurane Detects Malignant Hyperthermia Predisposition in Susceptible Pigs. Anesthesiology. 2007 Oct ;107 (4):616-620

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hendrik Schöll
Geburtsort	Ulm
Geburtsdatum	20.06.1978
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1984 - 1988	Riedlen Grundschule Ulm
1988 - 1994	Realschule Ulm-Wiblingen
1994	Mittlere Reife
1994 - 1997	Valckenburg-Gymnasium Ulm
1997	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1997-1998	Chirurgischer OP Universitätsklinik Ulm
1998-1999	Rettungssanitäterausbildung, Nürnberg

Hochschulausbildung

1999-2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
-----------	--

Famulaturen

08/2001	Mezam Poliklinik Bamenda, Kamerun, West-Afrika Chirurgie, Tropenmedizin, Gynäkologie, Pädiatrie
09/2002	Städtisches Krankenhaus Stralsund, Anästhesie
07/2003	Universitätsklinikum Ulm, Pädiatrie
08/2003	Kreuzfahrtschiff MS Astoria, Allgemeinmedizin
04/2004	Kreuzfahrtschiff MS Astor, Allgemeinmedizin

Praktisches Jahr

08/2004	Kantons- und Regionalspital Chur, Anästhesie
12/2004	Missionsärztliche Klinik Würzburg, Innere Medizin – Onkologie
04/2005	Kantons- und Regionalspital Chur, Chirurgie

Berufliche Tätigkeit

11/2005 – 07/2007
Seit 08/2007

Kantonsspital Graubünden, Schweiz, Chirurgie
Universitätsklinik Ulm, Chirurgie

Würzburg im Mai 2008

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. N. Roewer, Direktor der Klinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg, für die freundliche Überlassung des Themas.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Anetseder, Chefarzt Anästhesie Krankenhaus Landshut-Achdorf, für seine stetige Unterstützung, engagierte und ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit. Ohne Ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Danke an alle Mitarbeiter des MH-Labors der Universität Würzburg für die vielen gemeinsamen und abwechslungsreichen Stunden sowie Anregungen zu dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, deren Unterstützung in vielerlei Hinsicht für die Verfassung dieser Arbeit unersetzlich war.