

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

**Koffein, Halothan und Sevofluran als  
Triggersubstanzen in einem minimal-invasiven  
Test zur Maligne-Hyperthermie-Diagnostik**

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

vorgelegt von

Sabrina Negele  
aus Vohburg

Würzburg, November 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Anetseder  
Koreferent: Prof. Dr. med. Norbert Roewer  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2009

Die Promovendin ist Ärztin.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
G	Gauge
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IVKT	In-vitro-Kontrakturtest
HF	Herzfrequenz
i.S.	im Serum
MAP	mean arterial pressure
MH	Maligne Hyperthermie
MHE	Maligne Hyperthermie equivocal
MHN	Maligne Hyperthermie-nicht-suszeptibel
MHS	Maligne Hyperthermie-suszeptibel
NAD	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
min	Minuten
Nm	Newtonmeter
n	Versuchsanzahl
pH	Potentia Hydrogenii
RYR	Ryanodinrezeptor
VAS	Visuelle Analogskala

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Maligne Hyperthermie</b>	<b>1</b>
1.1.1. Definition der Malignen Hyperthermie	1
1.1.2. Geschichtliche Entwicklung und Epidemiologie	1
1.1.3. Genetik	2
1.1.4. Physiologie der Skelettmuskelkontraktion	2
1.1.5. Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie	3
1.1.6. Klinik der Malignen Hyperthermie	3
1.1.7. Therapie	4
1.1.8. Diagnose einer Disposition zur Malignen Hyperthermie	4
1.1.9. Pharmakologie von Koffein, Halothan, Sevofluran und Dantrolen	6
<b>1.2. Mikrodialyse</b>	<b>7</b>
1.2.1. Prinzip der Mikrodialyse	7
1.2.2. Funktionsprinzip der Mikrodialysesonde	8
1.2.3. Definition der <i>recovery</i>	9
1.2.4. Bestimmung der <i>relativen recovery</i> in-vitro und in-vivo	10
1.2.5. Einflussfaktoren der Mikrodialyse	10
<b>2. Fragestellung</b>	<b>12</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Methodik Probandenversuch</b>	<b>13</b>
3.1.1. Probanden	13
3.1.2. Mikrodialyse	13
3.1.3. Substanzen und Material	13
3.1.4. Geräte	15
3.1.5. Standardkurve Laktat	16
3.1.6. Laktatbestimmung	16
3.1.7. Versuchsprotokoll	17
3.1.8. Modifiziertes Versuchsprotokoll	19
3.1.9. Fragebogen	19

3.1.10. Statistik	19
<b>3.2. Methodik Tiermodell</b>	<b>20</b>
3.2.1. Versuchstiere	20
3.2.2. Mikrodialyse	20
3.2.3. Substanzen und Material	21
3.2.4. Geräte	21
3.2.5. Versuchsprotokoll	22
3.2.6. Statistik	23
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Probanden-Studie</b>	<b>24</b>
4.1.1. Biometrische Daten	24
4.1.2. Vitalparameter	24
4.1.3. Peripher-venöse Blutgasanalyse	26
4.1.4. Muskelenzyme	27
4.1.5. Mikrodialyse	28
4.1.6. Visuelle Analogskala	33
4.1.7. Fragebögen	34
<b>4.2. Tierversuchs-Studie</b>	<b>36</b>
4.2.1. Biometrische Daten und systemische hämodynamische Parameter	36
4.2.2. Muskelenzyme	38
4.2.3. Mikrodialyse	39
<b>5. Diskussion</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Entwicklung des Versuchsprotokolls/ Methodik der Probanden-Studie</b>	<b>43</b>
<b>5.2. Individuelle Ergebnisse der Probanden-Studie</b>	<b>44</b>
<b>5.3. Sensitivität und Spezifität des minimal-invasiven Tests</b>	<b>46</b>
<b>5.4. Systemische Nebenwirkungen</b>	<b>47</b>
<b>5.5. Lokale Nebenwirkungen</b>	<b>47</b>
<b>5.6. Akzeptanz des Verfahrens</b>	<b>49</b>

<b>5.7. Entwicklung des Versuchsprotokolls/ Methodik der Tierversuchs-Studie</b>	<b>49</b>
<b>5.8. Individuelle Ergebnisse der Tierversuchs-Studie</b>	<b>50</b>
<b>5.9. Dosis-Wirkungs-Beziehung</b>	<b>51</b>
<b>5.10. Bewertung des Verfahrens</b>	<b>52</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

*Meinen Eltern*

*Meinem Bruder*

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Maligne Hyperthermie**

#### **1.1.1. Definition der Malignen Hyperthermie**

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine autosomal-dominant vererbte Myopathie, die durch die Verwendung volatiler Inhalationsanästhetika und depolarisierender Muskelrelaxantien getriggert werden kann und durch eine Dysregulation der Kalziumhomöostase im Skelettmuskel gekennzeichnet ist. Betroffene Patienten sind im täglichen Leben symptomfrei. Gerät jedoch eine zur MH veranlagte Person in Kontakt mit einer der Triggersubstanzen, kann der vererbte Defekt im Ryanodinrezeptor einen Hypermetabolismus der quergestreiften Skelettmuskulatur (so genannte MH-Krise) induzieren. Diese äußert sich in den Symptomen Hypoxie, Hyperkapnie, Temperaturerhöhung und Laktatazidose (1). Eine frühzeitige Diagnose und die Einleitung einer adäquaten Therapie sind entscheidend für das Überleben des Patienten.

#### **1.1.2. Geschichtliche Entwicklung und Epidemiologie**

Erstmalig wurde im Jahr 1900 von Gibson C. der „Hitzschlag“ als postoperative Komplikation beschrieben (2). Burford G. publizierte 1940 die spezifische Symptomtrias: Tachykardie, Tachypnoe und Hyperthermie. Diese Symptome waren bei der Durchführung von Äthernarkosen zu beobachten (3). 1960 berichteten die Australier Denborough und Lovell über den Fall eines Patienten, in dessen Familie zehn ungeklärte Todesfälle im Rahmen von Allgemeinanästhesien aufgetreten waren. Die Verteilung der Todesfälle innerhalb des Familienstammbaums des Patienten ließ die Autoren eine erbliche Genese der MH vermuten, die auf einem autosomal-dominanten Erbgang beruhen (4) und durch bestimmte pharmakologische Substanzen ausgelöst werden sollte. 1975 identifizierte Harrison in einer Untersuchung an MH-suszeptiblen Schweinen Dantrolen als kausales Therapeutikum dieser foudroyant verlaufenden Erkrankung (5). Durch Dantrolen wurde die Mortalität einer fulminanten MH von 80% in den 60iger Jahren auf < 10% in der Gegenwart gesenkt (6).

In einer dänischen Studie von 1985 wird die Inzidenz fulminanter MH-Krisen während Allgemeinanästhesien mit 1:250000 beschrieben (6). Werden Inhalationsanästhetika und Succinylcholin kombiniert eingesetzt, so steigt die Inzidenz fulminanter MH-Zwischenfälle auf 1:62000 (6). 1997 führten Hartung und Anetseder eine Studie in



Deutschland durch, in welcher eine regional unterschiedliche Verteilung der MH-Dispositions-Inzidenz nachgewiesen werden konnte. In Deutschland liegt demnach die MH-Dispositions-Inzidenz je nach Gebiet zwischen 1:60000 und 1:80000. Die Prävalenz einer MH-Disposition ist nicht genau bekannt. Sie wird auf 1:10000 unabhängig von Rasse, Geschlecht und Alter geschätzt (7).

### **1.1.3. Genetik**

In über 50% der betroffenen Familien kann eine autosomal-dominant vererbte MH-Suszeptibilität nachgewiesen werden. Über 100 verschiedene Punktmutationen des Ryanodinrezeptor kodierenden Gens auf Chromosom 19, die mit einer MH-Veranlagung einhergehen, wurden bisher gefunden (8). Auch genetische Veränderungen in der  $\alpha$  1s-Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors (DHPR) beim Menschen können eine MH-Suszeptibilität bedingen (9). Zu einem geringen Anteil wird die MH-Suszeptibilität durch Mutationen in anderen Proteinen, die eine entscheidende Rolle in der Erregungs-Kontraktions-Abfolge spielen, verursacht (10). Bei dem MH-veranlagten Schwein, welches nach wie vor in Studien zur Malignen Hyperthermie als Tiermodell eingesetzt wird, liegt nur eine Mutation vor (11). Hierbei handelt es sich um eine Basensubstitution im Gen des Ryanodinrezeptors auf Chromosom 6 (12).

### **1.1.4. Physiologie der Skelettmuskelkontraktion**

Die Skelettmuskelkontraktion wird durch die Übertragung des Transmitters Acetylcholin auf die postsynaptische Membran der motorischen Endplatte eingeleitet. Acetylcholin bindet an nicotinischen Acetylcholinrezeptoren und löst dadurch eine Depolarisation aus, auch Exzitatorisches Postsynaptisches Potential (EPSP) genannt. Diese aktiviert spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ (Dihydropyridinrezeptoren) an den Membranen des transversalen tubulären Systems. Die  $\alpha$  1s-Untereinheit ist eine von fünf Untereinheiten des Dihydropyridinrezeptors (DHPR) und steht in direktem Kontakt mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), dem Ryanodinrezeptor (RYR 1, skelettmuskelspezifisch: Isoform 1 (13)), welcher in der Folge aktiviert wird. Die Ryanodinrezeptoren bewirken nach Aktivierung eine Kalzium-Freisetzung aus dem SR, dem Kalziumreservoir des Skelettmuskels (14). Kalzium strömt entlang des Konzentrationsgefälles aus den Speichern ins Zytosol und bindet dort

an Troponin, was zu einem Ineinandergleiten der Aktin-Myosin-Filamente führt und eine Muskelkontraktion bewirkt. Der Skelettmuskel erschlafft, sobald das Kalzium aus dem Zytosol mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen in die intrazellulären Speicher zurückgepumpt wird (nach (15)).

### **1.1.5. Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie**

Volatile Anästhetika und depolarisierende Muskelrelaxanzien können bei prädisponierten Patienten eine Dysregulation der Kalziumhomöostase auslösen und eine MH-Krise induzieren. Bei prädisponierten Patienten sind die Ryanodinrezeptoren durch eine längere Öffnungswahrscheinlichkeit charakterisiert (16). Werden Triggersubstanzen wie Succinylcholin oder volatile Inhalationsanästhetika bei MH-suszeptiblen Patienten eingesetzt, so kommt es zu einer massiven Freisetzung von Kalzium aus dem SR in das Zytoplasma. Das Kalzium führt als intrazellulärer Botenstoff zu einer lang anhaltenden Aktivierung der Aktin-Myosin-Filamente und zu einer hochgradigen Stimulation der zellulären Energieproduktion. Durch diese biochemischen Vorgänge entsteht das klinische Bild des Rigors, welcher durch eine ausgeprägte Erhöhung des Muskeltonus gekennzeichnet ist. Durch die anhaltende, maximale Kontraktion der Fasern steigt der Energiebedarf massiv an. Die zur Regeneration der verbrauchten energiereichen Phosphatverbindungen benötigten Sauerstoffmengen führen letztendlich zu einem intrazellulären Sauerstoffmangel. Der Organismus schaltet konsekutiv von aerober auf die anaerobe Glykolyse um, um trotz Sauerstoffmangel den Energiebedarf decken zu können. Es resultiert eine intramuskuläre Hypoxie, Hyperkapnie und Laktatazidose sowie Hyperthermie.

### **1.1.6. Klinik der Malignen Hyperthermie**

Häufiges Frühsymptom einer fulminanten MH-Krise ist eine Sinustachykardie (17), welche durch die starke Stoffwechselsteigerung und den damit verbundenen erhöhten peripheren Sauerstoffbedarf bedingt ist. Bei einem kontrolliert beatmeten Patienten kommt es zu einem steilen Anstieg des endexpiratorischen  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks, während sich in der Blutgasanalyse eine Hypoxie und gemischte Azidose zeigen. Die anhaltende Muskelkontraktion äußert sich oft primär als isolierter Masseterspasmus, der sich zu einem generalisierten Rigor entwickeln kann. Der übermäßige Verbrauch muskulärer

Energieträger vermindert letztendlich die Aktivität energieabhängiger Ionenpumpen und führt damit zur Rhabdomyolyse. Diese geht mit einem Anstieg von Kalium, Kreatinkinase und Myoglobin im Serum einher. Weitere Folgen der massiven Stoffwechselsteigerung sind ein exzessiver Anstieg der Körpertemperatur, myoglobinurisches Nierenversagen und letzten Endes Hirnödem und Multiorganversagen (18).

### **1.1.7. Therapie**

Die adäquate Therapie der MH umfasst zuallererst drei kausal wirksame Maßnahmen:

- Elimination des Triggers
- Sicherung von Oxygenierung und Perfusion
- Applikation von Dantrolen

Dantrolen ist sofort beim Verdacht einer MH-Krise in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KG zu applizieren. Neben diesen drei Eckpunkten der MH-Therapie sind noch weitere, allerdings symptomatische Maßnahmen angezeigt. Die Korrektur einer metabolischen Azidose ( $\text{pH} < 7,2$ ) mit Trispuffer oder Natriumhydrogenkarbonat erfolgt auf der Grundlage einer aktuellen Blutgasanalyse. Eine aktive Kühlung wird ab einer Temperatur  $> 38^\circ\text{C}$  erforderlich. Ferner ist nach der Stabilisierung der Stoffwechsellage eine intensivmedizinische Überwachung zur Therapie und Prophylaxe von Sekundärkomplikationen notwendig (19).

### **1.1.8. Diagnose einer Disposition zur Malignen Hyperthermie**

Als Standarddiagnostik einer Disposition zur MH gilt der In-vitro-Kontrakturtest (IVKT). Es existiert ein Europäisches (seit 1984, (20)) und ein geringfügig abweichendes Nordamerikanisches Testprotokoll (seit 1987, (21)) mit Halothan und Koffein als Testsubstanzen. Entsprechend dem Testprotokoll wird aus dem *M. quadriceps femoris* eine Biopsie entnommen und im Labor in einer speziellen Messvorrichtung unter Zugabe von Halothan und Koffein auf seine Kontraktorentwicklung hin untersucht. Wird ein Wert von 2 mN überschritten, ist der Patient als MHS zu klassifizieren. Reagiert der Patient nur auf eine der beiden Substanzen positiv, wird er als MHE (*Malignant Hyperthermia equivocal*) diagnostiziert. In Abhängigkeit von der reaktionsauslösenden Substanz, wird die Diagnose mit dem Zusatz „h“ (Halothan) oder „c“ (Koffein) verse-

hen. Ein als MHE eingestufte Patient wird klinisch als MH-positiv behandelt. Liegt die Kraftentwicklung des Muskelbündels unter 2 mN, ist der Patient als MHN (*Malignant Hyperthermia non-susceptible*) einzustufen. Die Sensitivität des IVKT nach dem Europäischen Testprotokoll liegt bei 99%, die Spezifität bei 94% (22).

Diese Diagnostik gilt bis heute als Goldstandard. Aufgrund der Invasivität des Verfahrens und des hohen zeitlichen und apparativen Aufwandes wird verstärkt an der Entwicklung alternativer Untersuchungsmethoden geforscht, welche ein schnelleres und für den Patienten weniger belastendes Screening ermöglichen sollen. So wurden, um die Spezifität vor allem bezüglich der Einordnung von MHE-Patienten zu verbessern, IVKT-Versuche mit Ryanodin (23) und 4-Chloro-m-Cresol (24) entwickelt. Leider blieben die Ergebnisse hinter den Erwartungen zurück, so dass diese Verfahren keinen Eingang in die Klinik fanden (25). Ein weiterer Ansatz zur Erfassung von MHS-Patienten wurde von Textor et al. entwickelt. Die Arbeitsgruppe führte 31-Phosphor-Magnetresonanzspektrometrische Untersuchungen durch und bestimmte die Konzentrationsänderung von ATP, Kreatinphosphat und anorganischen Phosphaten vor und nach intramuskulärer Injektion von 500 µl 20 mM Koffein. Dabei gelang eine gute Unterscheidung zwischen der MHS- und der MHN-Gruppe. Bei den Ergebnissen bestanden allerdings große Überlappungen einzelner Individuen, was die Aussagekraft dieses Testverfahrens einschränkte (26). Auch der Serum-Kreatinkinase Spiegel wurde auf seine Tauglichkeit als Screeningparameter für die MH untersucht. In einer klinischen Studie wurde aber festgestellt, dass nur 70% der Patienten mit einer MH-Veranlagung erhöhte Werte der Kreatinkinase im Serum aufweisen. Deshalb erscheint auch diese Screeningmethode nicht sinnvoll (27). Biochemische Untersuchungen des ATP-Verbrauchs, der glykolytischen Aktivität, der cAMP-, Myophosphorylase- (28) und Adenylatzyklaseaktivität (29) erwiesen sich ebenfalls als ungeeignet. Histopathologische Veränderungen der Muskulatur werden nur in 10-20% der MH-Patienten beschrieben (30). Trotzdem ist die histopathologische Untersuchung bei Patienten mit MH-Verdacht sinnvoll, um etwaige andere Myopathien diagnostizieren zu können. Ein weiterer, eleganter Ansatz zur Identifizierung prädisponierter Patienten besteht darin, B-Lymphozyten, die den gleichen Ryanodinrezeptor wie Muskelzellen aufweisen, auf ihre Reaktion mit Koffein und 4-Chloro-m-Cresol zu untersuchen. Dies hat den Vorteil, dass die B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut gewonnen werden kön-

nen und dementsprechend keine Muskelbiopsie mehr nötig wäre. Dieser Test fällt jedoch ausschließlich bei Mutationen im Ryanodinrezeptor positiv aus, so dass der Teil der MH-suszeptiblen Patienten, welcher Mutationen in anderen Strukturen wie z.B. dem DHPR aufweist, nicht erfasst wird.

Während bisher keine biochemischen Tests oder bildgebenden Verfahren entwickelt werden konnten, welche in ihrer Aussagekraft dem IVKT entsprechen, wird heute in der Routinediagnostik in ausgewählten Fällen ein genetisches Screeningverfahren eingesetzt. So ist es möglich, die MH-Diagnose durch den positiven Nachweis einer von 33 kausalen Mutationen des Ryanodinrezeptors zu stellen, auch ohne dass ein IVKT durchgeführt wird. Die Diagnose gilt als sicher, wenn eine der 33 kausalen Mutationen für eine MH in einer MH-veranlagten Familie nachgewiesen wird. Im Würzburger MH-Patientengut liegt die Erfolgsrate, eine dieser kausalen Mutationen in einer Familie zu finden aber nur bei 40%. Wird keine Mutation gefunden, muss weiterhin der IVKT durchgeführt werden (31). Somit wird ein breites genetisches Screening als Standarddiagnostik aufgrund der vielen noch unbekanntenen Mutationen in naher Zukunft nicht zu erwarten sein (25).

#### **1.1.9. Pharmakologie von Koffein, Halothan, Sevofluran und Dantrolen**

Bei Koffein handelt es sich um ein Xanthin-Derivat, das als Antagonist an Adenosinrezeptoren wirkt. Der Neuromodulator Adenosin wirkt hemmend auf das ZNS. Adenosin-Rezeptoren (A<sub>1</sub>-Rezeptoren) erhöhen die Öffnungswahrscheinlichkeit neuronaler Kaliumkanäle im Gehirn durch Bindung an das inhibitorische G-Protein. Diese Wirkung wird durch eine Blockade der Adenosinrezeptoren mit Koffein aufgehoben. Weiterhin inhibiert Koffein die cAMP-spaltende Phosphodiesterase. Dies führt zu einer Erhöhung der Halbwertszeit des cAMP, eines kurzlebigen *second messenger*-Moleküls, welches sich somit in Anwesenheit von Koffein in der Zelle anreichert (32). Koffein zeigt auch eine hohe Affinität zum Ryanodinrezeptor und setzt die Schwelle für die sarkoplasmatische Kalzium-Freisetzung herab, so dass sich die zytosolische Kalziumkonzentration erhöht. Bei überhöhter Dosis führt dies zur Kontraktur der Skelettmuskulatur (33).

Der genaue Wirkungsmechanismus von volatilen Anästhetika ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Bekannt ist, dass Narkosegase Kalzium direkt aus dem SR des Ske-

lettmuskels freisetzen können (34). Auch ein direkter Einfluss auf die Aktin-Myosin-Wechselwirkung (35) und die Aktivität der SERCA (36) wird diskutiert. Alle volatilen Anästhetika aus der Gruppe der halogenierten Kohlenwasserstoffe sind in der Lage, eine MH-Krise auszulösen.

Halothan und Sevofluran sind flüssige Inhalationsanästhetika, die zur Applikation in einem Vapor verdampft werden. Halothan wirkt stark anästhetisch, flutet aber nur langsam an und ab. Der Blut-Gas-Verteilungskoeffizient liegt bei 2,4. Die Arzneimittelzulassung von Halothan ist inzwischen in Deutschland erloschen (37). In der klinischen Praxis werden nur noch neuere volatile Anästhetika verwendet.

Sevofluran ist eines der am häufigsten eingesetzten Inhalationsanästhetika in der Allgemeinanästhesie. Sein niedriger Blut-Gas-Verteilungskoeffizient (0,65) erlaubt eine schnelle Induktion und Ausleitung der Narkose (38). Sevofluran hat zwar eine geringere Potenz als Halothan, kann aber genauso eine MH triggern (39).

Dantrolen ist das kausale Therapeutikum einer MH-Krise. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus ergaben eine Hemmung der Kalzium-Freisetzung aus dem SR ins Myoplasma durch die Inhibierung der Signaltransduktion des DHPR sowie durch Bindung an den Ryanodinrezeptor. Die Folge ist eine elektromechanische Entkoppelung des Reiz-Kontraktions-Mechanismus. Die Kalziumwiederaufnahme wird nicht beeinflusst (40).

## **1.2. Mikrodialyse**

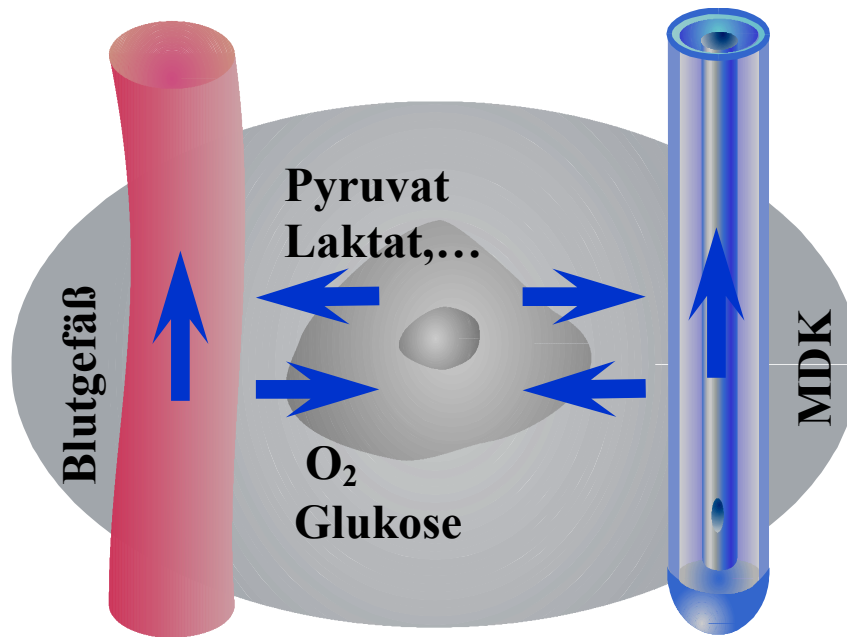
### **1.2.1. Prinzip der Mikrodialyse**

In der Klinik werden die Spiegel von Stoffwechselprodukte üblicherweise bestimmt, indem die Konzentration der jeweiligen Substanz im Blutplasma ermittelt wird. Die gemessenen Plasmakonzentrationen können sich allerdings von den Konzentrationen der extrazellulären Flüssigkeit unterscheiden. Begründet wird dies durch die vermutlich völlig anderen kinetischen Eigenschaften des Plasmas im Vergleich zum Extrazellulärraum. Im Plasma werden im Gegensatz zur extrazellulären Flüssigkeit viele Moleküle an Proteine gebunden transportiert. Auch kapilläre Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke bedingen unterschiedliche Konzentrationen in Blut und Liquor. Daraus folgt, dass eine differenzierte Aussage über die aktuelle zelluläre Stoffwechsellage durch die Bestimmung der Stoffwechselprodukte im Blutplasma nicht möglich ist (41, 42).

Die Technik der Mikrodialyse wird eingesetzt, um die interstitiellen Konzentrationen von Substanzen im peripheren Gewebe zu messen. Sie beruht auf dem Prinzip der Diffusion von Molekülen zwischen zwei Kompartimenten, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind. Das eine Kompartiment entspricht dem Extrazellulärraum, welcher Nährstoffe, Hormone und metabolische Abfallprodukten enthält. Das andere Kompartiment wird durch die Mikrodialysesonde dargestellt und enthält die der Perfusionsflüssigkeit zugesetzten Substanzen. Zwischen diesen beiden Kompartimenten findet der Stoffaustausch entlang eines Konzentrationsgefälles über die Dialysemembran statt. Das abfließende Dialysat wird in einem Auffanggefäß gesammelt und im Labor analysiert. Mit Hilfe der Mikrodialyse kann ein Monitoring des Interstitiums über einen längeren Zeitraum stattfinden ohne die Gefahr von Infektionen, wie sie bei mehrfachen Blutentnahmen besteht, einzugehen.

### **1.2.2. Funktionsprinzip der Mikrodialysesonde**

Die Mikrodialysesonde ist aus einer Röhre aufgebaut. In ihrem Inneren mündet am distalen Ende der zuführende Mikrodialyseschenkel mit der Perfusionsflüssigkeit (physiologische Kochsalzlösung). Über eine kleine Öffnung tritt die Perfusionsflüssigkeit in den Raum zwischen dem zuführenden Schenkel und der äußeren Dialysemembran. Die Flussrichtung kehrt sich in Richtung des proximalen Endes der Mikrodialysesonde um. Auf diesem Weg findet der Stoffaustausch über die semipermeable Dialysemembran nach dem Prinzip der Diffusion statt. Moleküle bis zu einer Größe von 20000 Dalton können die Membran passieren (*cut-off*). Nach kurzer Zeit enthält die Lösung eine repräsentative Menge der im Gewebe vorherrschenden Moleküle. Über den abführenden Schenkel wird das Dialysat in ein Auffanggefäß geleitet und im Labor bezüglich Laktat,- Glukose- und Pyruvatgehalt mittels Spektrophotometer ausgewertet.



**Abbildung 1: Funktionsprinzip des Mikrodialysekatheters (MDK); (nach Lena Kehr, CMA/Microdialysis AB, Solna, Schweden).**

### 1.2.3. Definition der *recovery*

Das Konzentrationsverhältnis zwischen der Substanz im Extrazellulärraum und der Substanz im Dialysat bezeichnet man als *recovery*. Die Kompartimente befinden sich in einem dynamischen Gleichgewichtszustand. Man unterscheidet die *relative* und *absolute recovery*.

Die *relative recovery* beschreibt die Konzentration einer bestimmten Substanz im Perfusat nach dem Verlassen der Sonde. Sie wird als Prozentsatz der Konzentration in dem sie umgebenden Medium ausgedrückt (Konzentrationsausbeute).

Die *absolute recovery* gibt die gesamte, gewonnene Stoffmenge einer Substanz über einen definierten Zeitraum an (Mengenausbeute).

Die *recovery* ist abhängig von der Länge der Dialysemembran, Fluss der Perfusionsflüssigkeit, Diffusionsgeschwindigkeit der Substanz durch die extrazelluläre Flüssigkeit und Membraneigenschaften. In in-vitro-Experimenten sinkt bei steigendem Perfusionsfluss die *relative recovery*, während die *absolute recovery* ansteigt. Dies geschieht, weil mit einem höheren Dialysatvolumen vermehrt Substrat aus dem interstitiellen Raum entfernt wird. Es zeigt sich ein Plateau für beide Werte, wenn die Diffusionsgeschwindigkeit durch das sie umgebende Medium ein Maximum erreicht. In in-vivo-



Experimenten wurde gezeigt, dass bei unveränderten Perfusionsbedingungen die *relative recovery* gleich bleibt. (43).

#### **1.2.4. Bestimmung der *relativen recovery* in-vitro und in-vivo**

Mit der Bestimmung der *in-vitro-recovery* können die Diffusionseigenschaften der Metabolite über die Membran ermittelt werden. Die Mikrodialysesonde wird in eine Lösung mit einer bestimmten Konzentration eingebracht und perfundiert. Es wird das Verhältnis zwischen der im Dialysat gemessenen Substanz und der Ausgangskonzentration gebildet.

*relative recovery*: Konzentration im Dialysat /Ausgangskonzentration \* 100

Die *in-vivo-recovery* wird zur Quantifizierung extrazellulärer Konzentrationen verwendet und kann mittels mehrerer Verfahren bestimmt werden. Beim *zero flow*-Verfahren wird die konstante Konzentration im Dialysat bei verschiedenen Perfusionsraten bestimmt. Durch eine grafische oder rechnerische Extrapolation hin zu einer Flussrate von Null geht man von einer *recovery* von 100% aus. Dies entspricht dann der extrazellulären Flüssigkeitskonzentration (44).

#### **1.2.5. Einflussfaktoren der Mikrodialyse**

Die Mikrodialyse stellt ein minimal-invasives Verfahren dar. Trotzdem entsteht beim Einführen der Sonde über die Führungskanüle ein Gewebetrauma. In histologischen Studien wurde gezeigt, dass bis zu zwölf Stunden nach der Implantation keine Blutungen oder Ödeme auftraten (45,46). Bei einer Untersuchung an Rattengehirnen entstand selbst nach zehnstündiger Mikrodialyse in der Umgebung der Sonde nur ein geringfügiges Gewebetrauma (47). Im Muskel kommt es zu einem kurzfristigen Anstieg der Metabolite Glukose und Laktat. Im menschlichen M. quadriceps femoris werden jedoch schon nach 15 minütiger Äquilibrationszeit stabile Werte für Glukose und Laktat gemessen (48).

Eine entscheidende Bedeutung haben Porengröße und Material der Mikrodialysesonde, weil sie die Diffusionseigenschaften der Membran beeinflussen. Bei einer lipophilen Membran wird die Diffusion hydrophiler Moleküle erschwert, während umgekehrt bei einer negativ geladenen Außenseite der Membran lipophile Substanzen passierunfähig sind. Die Porengröße der Membran bestimmt die Durchlässigkeit für Substanzen. Klei-

ne Moleküle wie Glukose und Laktat, Glycerol, Adenosin, Prostaglandine und Methylxanthin können bis zu einem *cut-off* von 3000-20000 Dalton passieren (49).

Weiterhin wurde der Transport von Makromolekülen mit einem Molekulargewicht zwischen 10000 und 70000 Dalton über eine 100000 Dalton Polyethersulfon-Membran analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Diffusion durch den sich bietenden Widerstand der Membran massiv beeinträchtigt wurde. Die Technik der Mikrodialyse scheint nach den Ergebnissen dieser Untersuchung besser für niedermolekulare Substanzen geeignet zu sein (50).

Die Perfusionsflüssigkeit sollte dem physiologischen Milieu des zu untersuchenden Extrazellarraums möglichst entsprechen, um schon geringfügige Veränderungen feststellen zu können. Auswirkungen des Perfusats auf den Gewebemetabolismus werden so vermieden. Nicht relevant ist der Einfluss der Temperatur der Perfusatflüssigkeit auf die Untersuchungsergebnisse (45).

Verschiedene Perfusatgeschwindigkeiten haben Veränderungen der *relativen recovery* (51) sowie des zu untersuchenden Gewebes zur Folge. Bei einer hohen Geschwindigkeit steigt der Konzentrationsunterschied zwischen Dialysat und Interstitium an. Eine Filtration der Perfusionsflüssigkeit in das umgebende Gewebe wird ermöglicht und hat Auswirkungen auf das lokale physiologische Milieu. Die Folge sind veränderte Untersuchungsergebnisse.

## 2. FRAGESTELLUNG

Bis heute stellt der IVKT die zuverlässigste Methode zur Diagnostik einer MH-Disposition dar. Ein genetisches Screening ist nur eingeschränkt einsetzbar. Die Durchführung des IVKT erfordert jedoch einen operativen Eingriff, der aufwendig und zudem kostenintensiv ist. Für den Patienten bedeutet dies eine physische und psychische Belastung, die zusätzlich mit Risiken wie Infektion, Blutung, Schmerzen, Nervenverletzung, Wundheilungsstörung und Rekonvaleszenz verbunden ist. Die Einführung eines minimal-invasiven Testverfahrens wäre wünschenswert.

In dieser Untersuchung werden die Triggersubstanzen Koffein und Halothan lokal in den Oberschenkelmuskel des Menschen appliziert (52) und deren Wirkung auf den lokalen intramuskulären Metabolismus getestet. Gemessen wird die intramuskuläre Laktatkonzentration mit Hilfe der Mikrodialysetechnik.

Es stellt sich weiterhin die Frage nach einem potentiellen Ersatz für Halothan im minimal-invasiven Test. Da Anfang 2006 die Zulassung für dieses Medikament in Deutschland abgelaufen ist (37), besteht die Möglichkeit, dass es in Zukunft kommerziell nicht mehr erhältlich sein könnte. Sevofluran stellt eine mögliche Alternative für Halothan dar.

In der vorliegenden Studie werden folgende Hypothesen zur Weiterentwicklung des minimal-invasiven Verfahrens überprüft:

1. Ein metabolischer Test mit intramuskulärer Injektion von Halothan 6 und 4 Vol% induziert einen höheren intramuskulären Laktatanstieg bei MH-veranlagten als bei MH-nicht veranlagten Probanden.
2. Die lokale intramuskuläre Applikation von Sevofluran erhöht den lokalen Laktatspiegel bei MHS-Tieren stärker als bei MHN-Tieren. Ziel ist die Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Methodik Probandenversuch**

##### **3.1.1. Probanden**

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Würzburg und nach schriftlicher Einverständniserklärung wurden 17 männliche und 6 weibliche Probanden (ASA I und II) im Alter von 18 bis 65 Jahren in die Studie eingeschlossen. Alle MHS- und MHN-Probanden wiesen eine persönliche oder familiäre MH-Anamnese auf und waren in der Vergangenheit mittels IVKT nach dem Europäischen MH-Protokoll eindeutig diagnostiziert worden. Zudem bestand eine familiär gesicherte MH-Mutation, die mit dem Ergebnis des IVKT übereinstimmte. Neun Studienteilnehmer waren MH-suszeptibel und sieben MH-nicht suszeptibel. Als Kontrollgruppe wurden sieben gesunde Probanden ohne persönliche und familiäre MH-Veranlagung untersucht. Patienten mit dem Verdacht auf oder einer schon nachgewiesenen Myopathie wurden ebenso aus der Studie ausgeschlossen, wie solche mit einem BMI größer als  $35 \text{ kg/m}^2$ . Probanden mit einem Laktatwert  $> 2 \text{ mM}$  im peripher-venösen Blut unmittelbar vor der Untersuchung wurden ebenfalls ausgeschlossen.

##### **3.1.2. Mikrodialyse**

Für die Messungen wurden flexible, sterile Mikrodialysesonden (CMA 70 Microdialysis Bolt Catheter, CMA, Solna Schweden) mit einer Durchlässigkeit für Moleküle der Größe 20000 Dalton verwendet. Die Membran hatte eine Länge von 10 mm, einen Außendurchmesser von 0,6 mm und bestand aus Polyamid. Das Totraumvolumen der Katheterspitze und des abführenden Schenkels betrug  $6,84 \mu\text{l}$ . Das Reaktionsgefäß wurde entfernt und stattdessen ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zum Auffangen der Dialysatflüssigkeit verwendet. (siehe Abbildung 2)

##### **3.1.3. Substanzen und Material**

Die 80 mM Koffeinlösung wurde von der Klinikapotheke der Universität Würzburg hergestellt und in 10 ml große, abgedunkelte Glasampullen abgefüllt.

Die weiteren Triggerlösungen bestanden aus einem Halothan-Sojabohnenöl-Gemisch (Halothan: Sigma-Aldrich, München, Deutschland; Lipofundin 20%, Fresenius, Bad Homburg v.d.H., Deutschland). Die Substanzen wurden unter sterilen Bedingungen in

sterilen, gasdichten 50 ml Glaskolben ca. 20 Minuten vor der Applikation gemischt, mit einem Glaspfropf verschlossen und durch kontinuierliches Schütteln in Lösung gehalten.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Halothan-Sojabohnenöl-Lösung 6 Vol%**

	Menge Halothan	Menge Sojabohnenöl
Konzentration 6 Vol%	1,5 ml	23,5 ml

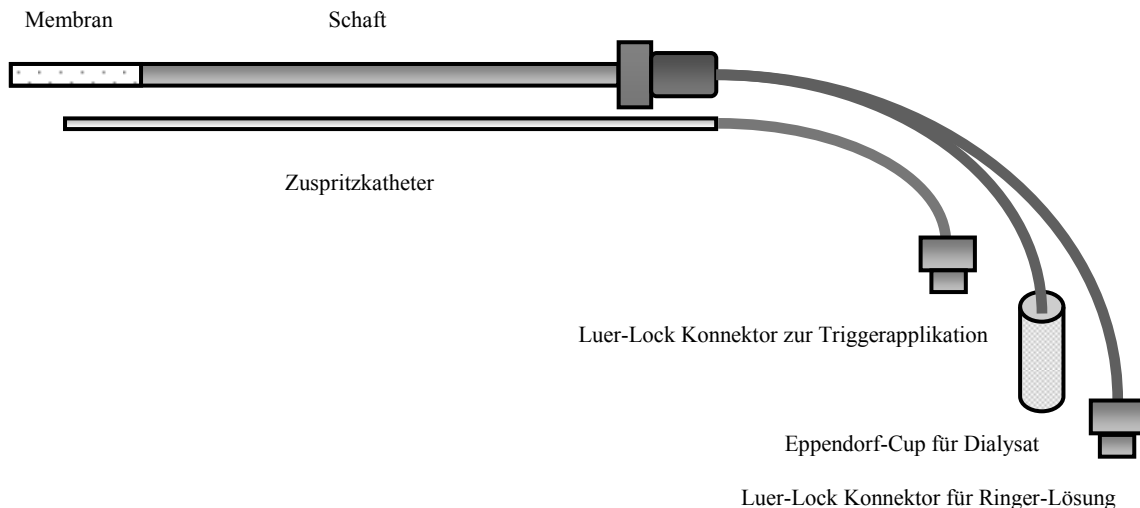
**Tabelle 2: Zusammensetzung der Halothan-Sojabohnenöl-Lösung 4 Vol%**

	Menge Halothan	Menge Sojabohnenöl
Konzentration 4 Vol%	0,5 ml	12 ml

Um die Triggersubstanzen zu applizieren, wurden 27 G Zuspritzkatheter (Pajunk, Geisingen, Deutschland) mit einem Totraumvolumen von 140 µl verwendet.

Für die Bestimmung der Laktatkonzentration im Dialysat wurde Laktatreagenz (Trinity Biotech, Wicklow, Irland) benutzt. Als Laktatstandard (Trinity Biotech, Wicklow, Irland) dienten Lösungen der Konzentrationen 20, 80 und 120 mg/dl.

Weiterhin kamen Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit einem Volumen von 1000 µl und 0-20 µl mit den zugehörigen Pipettenspitzen (Hartmann, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz.



**Abbildung 2: Zusammengesetzte Messvorrichtung mit Mikrodialyse-sonde und Zuspritzkatheter.**

### 3.1.4. Geräte

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

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

Die Auswertung der Blutgasanalysen wurde am Blutgasanalysator des Aufwachraums (Radiometer ABL 615, Willich, Deutschland) des Zentrums für operative Medizin der Universität Würzburg vorgenommen. Sämtliche Labordiagnostik der Blutproben führte das Zentrallabor der Universität Würzburg durch.

Zur Perfusion der Sonden mit Ringer-Lösung wurde eine Präzisionsspritzenpumpe (PHD 2000-Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatures, Holliston, MA, USA) mit zehn dazu kompatiblen 1 ml Spritzen (Pump Syringe, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt. Zur Applikation der Triggersubstanzen wurde eine weitere Spritzenpumpe (PHD 2000-Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatures, Holliston, MA, USA) mit vier kompatiblen 1 ml Spritzen (Pump Syringe, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

### **3.1.5. Standardkurve Laktat**

Vor Beginn der Untersuchungen wurde einmalig eine Standardkurve für Laktat erstellt. Dazu wurden jeweils zwei Messungen einer Laktatstandard-Lösung der Konzentrationen 2,2 mM, 4,4 mM und 6,6 mM durchgeführt. Es wurden 10 µl des Laktatstandards zu 1000 µl Laktatreagenz gegeben und zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Lösung in eine Glasküvette gefüllt und spektrometrisch bei 540 nm gemessen.

Bei der beschriebenen enzymatischen Methode wird Laktat durch die Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgewandelt. In Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert die Peroxidase die oxidative Kondensierung chromogener Vorstufen, die einen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 540 nm bilden. Der gemessene Absorptionsanstieg ist der Laktatkonzentration in der Probe direkt proportional. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz wurde aus den gemessenen Werten eine lineare Laktatstandardkurve erstellt.

### **3.1.6. Laktatbestimmung**

Die Bestimmung der Laktatkonzentration in der Dialysatflüssigkeit erfolgte im Anschluss an die Untersuchung mit Hilfe eines Spektrophotometers. 10 µl des Dialysats wurden mit 1000 µl Laktatreagenz in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, vermischt und für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden 1000 µl dieser Lösung in einer Glasküvette wie oben beschrieben bei 540 nm spektrometrisch gemessen. Das Laktatreagenz wurde vor der Messung der Dialysatproben gegen aqua ad iniectabilita als Referenz gemessen. Die Absorption durfte einen Wert von 0,08 nicht übersteigen. Ansonsten wurde die Lösung verworfen. Zur Überprüfung der Messgenauigkeit des Verfahrens wurde zu Beginn der Laktatbestimmung des Untersuchungsmaterials die Messung eines Laktatstandard mit 2,2 mM durchgeführt. Nach Messung der Hälfte der Proben erfolgte eine Laktatstandardbestimmung mit 4,4 mM und nach Beendigung mit einer 6,6 mM Lösung. Eine Abweichung von bis zu 10% wurde toleriert. Alle Proben wurden mit derselben Glasküvette vermessen, die nach jeder Benutzung mit destilliertem Wasser gesäubert und auf trockenen Tüchern ausgeklopft wurde.

### 3.1.7. Versuchsprotokoll

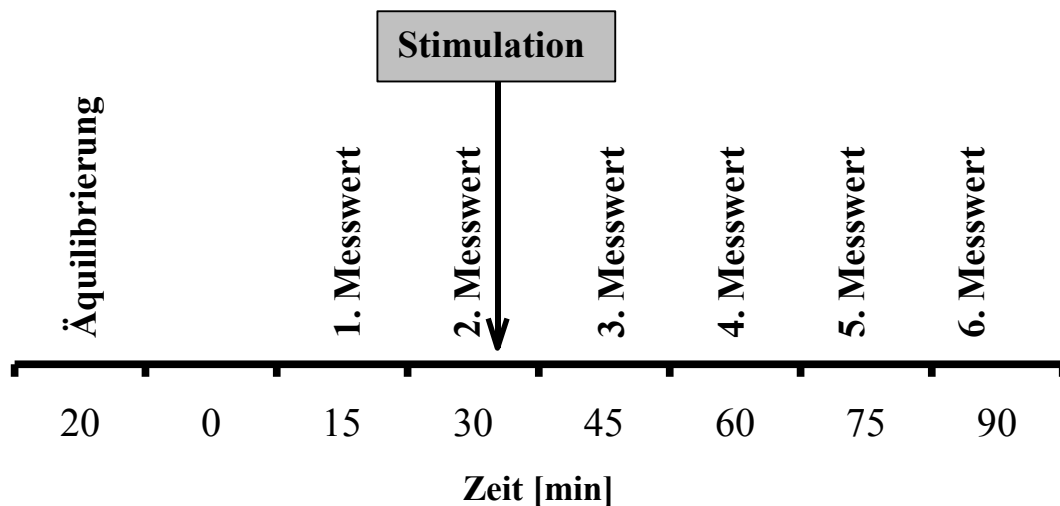
Alle Untersuchungen wurden im Aufwachraum der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Zentrums für operative Medizin der Universität Würzburg unter ärztlicher Betreuung durchgeführt. Eine kontinuierliche Überwachung der Vitalparameter und der Zugriff auf Notfallmedikamente und -ausrüstung waren zu jeder Zeit gewährleistet. Der Versuchsleiter klärte den Probanden in einem telefonischen Vorgespräch und unmittelbar vor Beginn der Untersuchung persönlich über die freiwillige Teilnahme an der Studie auf. Anschließend bestätigte der Patient sein Einverständnis auf einem Aufklärungsbogen.

Der Proband lag während der Untersuchung in einem Patientenbett. Das rechte Bein wurde in einer Beinschiene aus Schaumstoff gelagert, um die Beweglichkeit einzuschränken und somit mögliche Messartefakte zu verhindern. Zur Überwachung wurden durchgehend die Herzfrequenz, der Blutdruck, die periphere Sauerstoffsättigung sowie die Schmerzempfindung mit Hilfe einer Visuellen Analogskala (VAS) gemessen. Weiterhin wurde ein venöser Zugang angelegt und eine Blutentnahme sowie eine Blutgasanalyse vor Beginn und am Ende der Untersuchung durchgeführt. Im Labor wurden CK, LDH, Myoglobin, GOT, GPT sowie das Kalium im Serum bestimmt. Falls sich in der Blutgasanalyse ein Laktatwert größer als 2 mM zeigte, wurde der Versuch abgebrochen.

Durch Anspannen der Oberschenkelmuskulatur wurde die genaue Lokalisation des M. vastus lateralis bestimmt und eine Desinfektion und gegebenenfalls Rasur des distalen Drittels der Haut des Oberschenkels über dem Muskel vorgenommen. Das Untersuchungsgebiet wurde steril mit einem Lochtuch abgedeckt und die Haut mit einem Lokalanästhetikum (10 ml Mepivacain 1%: AstraZeneca, Wedel, Deutschland) infiltriert. Zur Vorbereitung der Messvorrichtung wurde der Zuspritzkatheter in einem Abstand von fünf Millimetern zur Spitze der Mikrodialysesonde an der Plastikkappe befestigt. Nach erneuter Desinfektion wurde die Haut mit einer Lanzette an den beiden Einstichstellen eingeritzt und zwei 16 G Katheter (Insyte, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) nebeneinander (einer lateral, einer medial im Muskel) im Abstand von mindestens drei Zentimetern in einem Winkel von ungefähr 30° in kranialer Richtung in den M. vastus lateralis eingebracht. Ein weiterer Katheter wurde drei Zentimeter kranial der beiden eingeführten Kanülen platziert.



Der laterale Katheter war für die Applikation von Koffein 80 mM, der mediale Katheter für das Halothan 4 Vol%-Sojabohnenölgemisch und der kraniale Katheter für die Lösung Halothan 6 Vol% vorgesehen. Die vorbereitete Messvorrichtung wurde bis zum Anschlag in die 16 G Kanüle eingeführt und diese dann bis zur Markierung von 9 cm am Zuspritzschlauch zurückgezogen. Dies gewährleistete die vollständige Lage der Membran und des Zuspritzschlauchs im Muskel. Nach Konnektion an die Spritzenpumpe wurde die Perfusion mit 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  gestartet. Es folgte für 20 Minuten eine Spülung zur Einstellung eines stabilen physiologischen Milieus (Äquilibrationsphase) im Muskel. Im Anschluss wurde der erste Messwert abgenommen. Über jeweils 15 min wurden 15  $\mu\text{l}$  Dialysatflüssigkeit von beiden Messsonden gesammelt. Nach Abnahme der ersten Messwerte wurden 340  $\mu\text{l}$  der Triggersubstanzen Halothan 4 Vol%, Halothan 6 Vol% und Koffein 80 mM mit einer Geschwindigkeit von 340  $\mu\text{l}/\text{min}$  über den Perfusor in den Muskel appliziert. Insgesamt wurden sechs Messungen über einen Zeitraum von 90 min durchgeführt. Die mit Dialysat gefüllten Eppendorf-Gefäße wurden bis zur spektrometrischen Messung im Anschluss an die Untersuchung im Medikamentenkühlschrank des Aufwachraums bei 4°C aufbewahrt.



**Abbildung 3: Zeitlicher Untersuchungsablauf: Äquilibrationzeit: 20 min; Abnahme von Messwerten alle 15 min, Stimulation mit Triggersubstanzen zum Zeitpunkt 30 min, Abnahme von sechs Messwerten.**

Mit Hilfe der Visuellen Analogskala sollte der Proband seine subjektive Schmerzempfindung während des Einführens der 16 G Kanülen in den Oberschenkel und nach Applikation der Triggersubstanzen angeben. Die Vitalparameter wurden während der gesamten Untersuchung kontinuierlich überwacht und auf dem Versuchsprotokoll dokumentiert. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Sonden entfernt und die Wunden mit LeukoStrip (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) steril abgedeckt. Der Oberschenkel wurde mit einem Kompressionsverband (Hartmann, Heidenheim, Deutschland) eingebunden und ein Netzschlauch (Lohmann&Rauscher, Rengsdorf, Deutschland) zur Fixierung des Verbands übergestülpt.

Der Proband wurde weitestgehend schmerzfrei und kreislaufstabil vom Arzt entlassen. Eine erneute Kontrolle der oben erwähnten Laborwerte erfolgte in einem Zeitraum von 12 bis 24 h nach der Untersuchung. Der Proband wurde einige Tage nach dem Versuch telefonisch kontaktiert und zu seinem Befinden befragt.

### **3.1.8. Modifiziertes Versuchsprotokoll**

Nach der Auswertung erster Ergebnisse von Kontrollprobanden war eine Veränderung des Versuchsprotokolls notwendig. Die kraniale Messsonde mit der Stimulationssubstanz Halothan 6 Vol% wurde in den folgenden Untersuchungen an MHS- und MHN-Probanden nicht mehr weiterverwendet. Der Versuchsaufbau blieb ansonsten bestehen.

### **3.1.9. Fragebogen**

Vier Wochen nach der Untersuchung wurde den Probanden ein Fragebogen zugesandt, in dem sie zu Akzeptanz und Belastung der Untersuchungsmethode befragt wurden.

### **3.1.10. Statistik**

Die Versuche wurden mit Probanden der Kontrollgruppe begonnen und danach mit MH-positiven und MH-negativen Probanden je nach Verfügbarkeit randomisiert weitergeführt.

Die Daten sind als Median und Quartilen angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den MHS-, MHN-, und Kontrollstudienteilnehmern wurden mit der Kruskal-Wallis-Analyse untersucht. Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, um Unterschiede zwischen MHS- vs. MHN-, MHS- vs. Kontroll- und MHN- vs. Kontrollprobanden zu zeigen. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen.

## **3.2. Methodik Tiermodell**

### **3.2.1. Versuchstiere**

Mit Genehmigung der örtlichen Tierschutzkommission wurden 15 (6 männliche, 9 weibliche) Pietrain-Schweine im Alter von 12- 16 Wochen verwendet. Es wurden 9 Tiere, die vor Versuchsbeginn homozygot für das „Porcine Stress Syndrom“ (MHS) getestet wurden und sechs homozygote Tiere des Wildtyps (MHN) untersucht. Das Gewicht der MHS-Veranlagten betrug 28 [26 – 29] kg und das der MHN-Tiere 32 [31–33] kg.

Die Schweine wurden eine Woche vor dem Versuch von den Zuchtbetrieben des Regierungsbezirkes Unterfranken im Großtierstall der experimentellen Chirurgie der Universität Würzburg untergebracht und artgerecht gehalten. Futter und Trinkwasser wurde ihnen zuletzt am Abend vor dem Versuchstag angeboten.

### **3.2.2. Mikrodialyse**

Für alle Messungen kamen flexible Mikrodialysesonden (MAB 7, Microbiotech/se Stockholm Schweden) aus Polyethylensulfon mit einer Membranlänge von 10 mm und einer Schaftlänge von 80 mm zum Einsatz. Die Durchlässigkeit der Membran für Moleküle betrug 15000 Dalton (*cut off membrane*) und das Totraumvolumen der Sonde lag bei 13,6 µl.

Die Sonden bestanden aus einem zuführenden Schenkel für das Perfusat und einem abführenden Schenkel für das Dialysat. Der zuführende Schenkel wurde in einen 16 G Venenverweilkatheter (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingeführt. Der Abführende wurde in einem Auffanggefäß (CMA Microdialysis, Solna, Schweden) befestigt. Die Sonden wurden während der gesamten Messzeit mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 µl/min mit Ringer-Lösung (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) perfundiert und die Auffanggefäße alle 15 bzw. 7,5 min gewechselt.

Nach jedem Versuch wurden die Sonden kontinuierlich mit Ringer-Lösung durchgespült, um eine Austrocknung bis zur nächsten Verwendung zu verhindern. Zur Bestimmung der *in-vitro-recovery* nach jedem sechsten Versuch wurden die Mikrodialysesonden in eine Lösung mit einer 40 mM Laktatkonzentration eingebracht und mit Ringer-Lösung perfundiert. Aus dem Verhältnis der Konzentration im Dialysat zur Ausgangskonzentration wurde die *in-vitro-recovery* berechnet und Sonden mit einem Wert < 70% ausgewechselt.

### 3.2.3. Substanzen und Material

Zum Mischen der Substanzen dienten gasdichte 50 ml Glaskolben (Marienfeld, Lauda, Deutschland). Es wurden vier verschiedene Konzentrationen eines Sevofluran-Sojabohnenöl-Gemisches hergestellt. (Sevofluran: Abbott, Wiesbaden, Deutschland; Lipofundin 20%, Fresenius, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) Die Substanzen wurden ca. 20 Minuten vor dem Spritzen zubereitet und bis zur Applikation durch kontinuierliches Schütteln in Lösung gehalten.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Sevofluran-Sojabohnenöl-Lösungen 3 Vol%, 7,5 Vol%, 15 Vol%, 28 Vol%.**

Konzentration	Menge Sevofluran	Menge Sojabohnenöl
<b>3 Vol%</b>	9,7 ml	0,3 ml
<b>7,5 Vol%</b>	18,5 ml	1,5 ml
<b>15 Vol%</b>	8,5 ml	1,5 ml
<b>28 Vol%</b>	9 ml	3,5 ml

Um die Triggersubstanzen zu applizieren wurden 27 G Zuspritzschläuche (Spinalkatheter Pajunk, Geisingen, Deutschland) mit einem Totraumvolumen von 140 µl eingesetzt. Für das Anschließen der Mikrodialysesonden an die Spritzen wurden stumpfe 21 G Kanülen (Braun, Melsungen, Deutschland) benutzt.

### 3.2.4. Geräte

Es wurde eine Präzisions-spritzenpumpe (PHD 2000-Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatures, Holliston, MA, USA) mit 1 ml Spritzen (Pump Syringe, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und zehn Spritzenplätzen zum kontinuierlichen Spülen verwendet. Für die Applikation der Triggersubstanzen wurde eine Spritzenpumpe (PHD 2000-Programmable Syringe Pump, Harvard Apparatures, Holliston, MA, USA) mit 1 ml Spritzen (Pump Syringe, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und vier Spritzenplätzen gewählt. Sofort nach der Sammlung des Dialysats wurden die Proben

auf ihre Laktat-, Glukose- und Pyruvatkonzentrationen mit einem Spektrophotometer (CMA/ISCUS, CMA, Solna, Schweden) untersucht.

Zur Lagekontrolle der Venenverweilkatheter wurde ein Ultraschallgerät (SonoSite, 180 Plus, Bothell, WA, USA) verwendet.

### **3.2.5. Versuchsprotokoll**

Alle Untersuchungen an Tieren wurden im Großtier-OP der Experimentellen Chirurgie der Universität Würzburg durchgeführt. Das Tier wurde kurz vor dem Transport mit 5-10 mg/kg KG mit dem Butyrophenon Azaperon i.m. tief sediert. Bei Eintreffen im Tier-OP wurde bei noch nicht ausreichender Sedierung 6-10 mg/kg KG Ketamin i.m. verabreicht und ein intravenöser Katheter in eine Ohrvene gelegt. Zur Narkoseeinleitung wurden 14-17 mg/kg KG Thiopental als Bolus appliziert. Die Versuchstiere wurden auf dem Rücken gelagert und an den Vorder- und Hinterläufen fixiert. Daraufhin erfolgte die endotracheale Intubation (7,0 mm ID Endotrachealtubus Rüscher, Kernien i.R., Deutschland) und eine maschinelle Beatmung (Siemens Servo Ventilator 900C, Erlangen, Deutschland) mit einem 50% Sauerstoff/ 50% Luftgemisch. Die Beatmungsparameter wurden so gewählt, dass ein endtidales CO<sub>2</sub> zwischen 30-35 mmHg (Atemfrequenz 12-14 min<sup>-1</sup>; Tidalvolumen 10-15 ml/kg; PEEP 5 mmHg) erzielt wurde. Über Perfusoren wurden Fentanyl und Midazolam zur Aufrechterhaltung der Narkose verabreicht. Die Körpertemperatur wurde durch eine Infrarotlampe und eine Heizmatte aufrechterhalten. Die Tiere wurden kontinuierlich mittels Pulsoxymetrie, EKG-Ableitung, Kapnometrie, rektaler Temperaturmessung und der Messung des arteriellen Blutdrucks in der A. saphena überwacht. Ein weiterer arterieller Zugang in der A. carotis diente Blutentnahmen zur Untersuchung der Blutgase und des Laktats im Serum. Zur Vorbereitung der Mikrodialyse wurde die Spritzenpumpe mit vier 1 ml Spritzen versehen und auf einen Fluss von 1 µl/min eingestellt. Vier Mikrodialysesonden wurden mit einem Katheter zum Zuspritzen der Triggersubstanzen ausgestattet. Der Zuspritzschlauch wurde in einem Abstand von 5 mm zur Spitze der Mikrodialyse-sonde fixiert. Fünf 16 G Venenverweilkatheter (Insite, Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden in einem Mindestabstand von drei Zentimetern in die Adduktorenmuskulatur eingebracht und die intramuskuläre Lage mit einem Ultraschallgerät (SonoSite, 180 Plus, Bothell, WA, USA) kontrolliert. Anschließend erfolgte das

Einführen der vorbereiteten Messvorrichtung in die Führungskanüle. Um eine komplette intramuskuläre Lage der Sondenmembran zu gewährleisten, wurden die Führungskatheter um zwei Zentimeter zurückgezogen. Nach Konnektion an die Spritzenpumpe wurde die Perfusion gestartet. Die abführenden Schenkel der Sonden wurden zur Sammlung des Dialysats in Reaktionsgefäße (CMA, Solna, Schweden) eingebracht. Diese befanden sich wiederum in einem *Styro-Rack* (Hartenstein, Würzburg, Deutschland). Nach einer Äquilibrationsphase von 30 min wurde als Bolus 100 µl der Sevofluran-Sojabohnenöl-Mischung 3, 7,5, 15 und 28 Vol% über den Zupritzkatheter in den Muskel appliziert. Die Proben vor der Verabreichung der Triggersubstanzen wurden in 15 minütigen Abständen, die danach in 7,5 minütigen Abständen gesammelt. Im Dialysat wurden Glukose, Laktat und Pyruvat spektrophotometrisch bestimmt. Eine kontinuierliche Aufzeichnung der hämodynamischen Parameter fand während der gesamten Versuche statt.

### **3.2.6. Statistik**

Die Daten wurden als nicht-parametrisch verteilt angenommen und als Median und Interquartilenabstand angegeben. Um Unterschiede zwischen MHS- und MHN-Tieren in Hinsicht auf die Maxima von Laktat-, Glukose- und Pyruvatkonzentrationen zu zeigen, wurde der Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Probanden-Studie

#### 4.1.1. Biometrische Daten

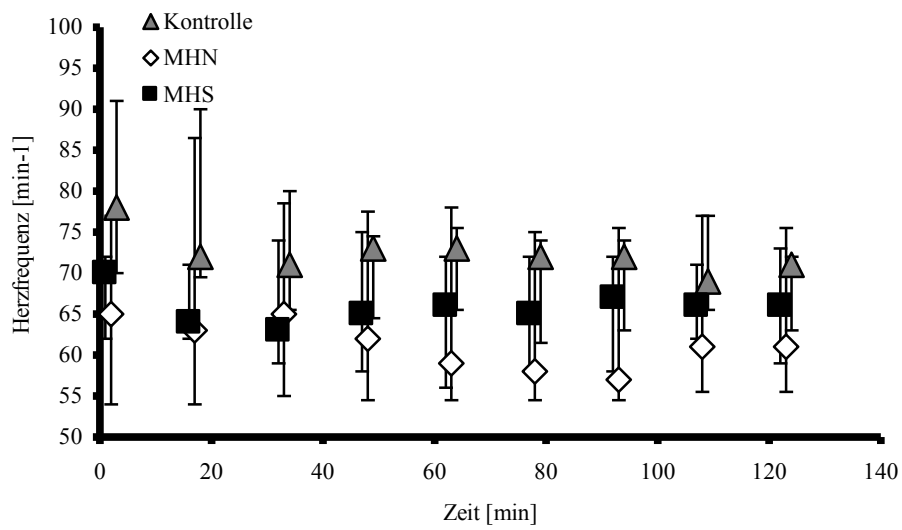
Die biometrischen Daten der Probanden unterschieden sich nicht signifikant zwischen der MHS-, MHN-, und Kontrollgruppe. Es bestand eine Verwandtschaft ersten Grades zu dreimal je zwei Personen: davon zweimal in der Kombination MHS-MHN und einmal MHS-MHS. Alle MHS-Studienteilnehmer wiesen eine kausale Mutation auf. Bei den Teilnehmern der MHN-Gruppe lag in der Familie eine kausale Mutation vor, die jedoch nicht beim Probanden nachweisbar war.

**Tabelle 4: Biometrische Daten, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollgruppe: n= 7, Median und Quartilen.**

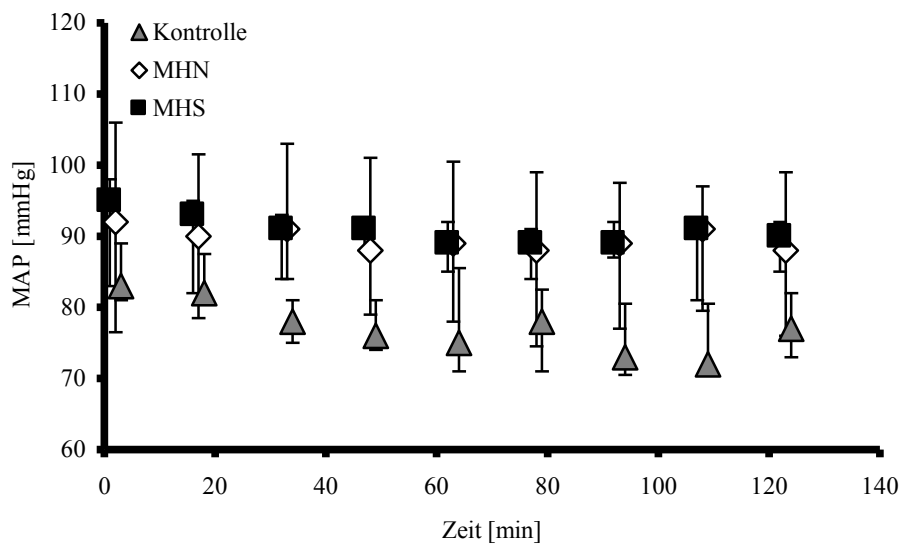
	<b>Anzahl</b>	<b>Geschlecht [w/m]</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>
<b>MHS</b>	9	1 / 8	35 [33-43]	27 [24-28]
<b>MHN</b>	7	3 / 4	31 [25-43]	25 [24-27]
<b>Kontrolle</b>	7	2 / 5	25 [24-25]	24 [21-27]

#### 4.1.2. Vitalparameter

Die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck der Studienteilnehmer unterschieden sich während der Untersuchung nicht zwischen MHS-, MHN- und Kontrollprobanden. Die periphere Sauerstoffsättigung lag bei allen Probanden kontinuierlich zwischen 94% und 100%.



**Abbildung 4: Herzfrequenz während der Untersuchung, Median und Quartilen, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7.**



**Abbildung 5: Mittlerer arterieller Blutdruck während der Untersuchung, Median und Quartilen, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7.**



#### 4.1.3. Peripher-venöse Blutgasanalyse

Die peripher-venöse Blutgasanalyse zu Beginn der Untersuchung ergab, dass sich pH, pCO<sub>2</sub>, Basenabweichung und Laktat im physiologischen Bereich befanden.

**Tabelle 5: Venöse BGA bei Versuchsbeginn, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollgruppe: n= 7, Median und Quartilen.**

<b>Venöse BGA bei Versuchsbeginn</b>	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	BE [mmol/l]	Laktat [mmol/l]
MHS	7,4 [7,4-7,4]	42,0 [48,1-39,1]	0,2 [-0,1-1,2]	1,0 [0,8-1,1]
MHN	7,4 [7,4-7,4]	41,3 [38,3-47,8]	0,5 [-1,2-1,4]	1,0 [0,9-1,4]
Kontrolle	7,4 [7,3-7,4]	49,0 [46,6-52,1]	1,3 [1,1-1,8]	1,5 [1,4-1,7]

Bei der peripher-venösen Blutgasanalyse am Ende der Untersuchung konnten wiederum Normwerte für pH, pCO<sub>2</sub>, Basenabweichung und Laktat gemessen werden. Ein signifikanter Unterschied ergab sich in der Laktatkonzentration beim Vergleich von MHN- und Kontrollgruppe.

**Tabelle 6: Venöse BGA 60 min nach Triggerapplikation, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollgruppe: n= 7, Median und Quartilen, §: p< 0,05 MHN vs. Kontrollgruppe.**

<b>Venöse BGA 60 min nach Triggerapplikation</b>	pH	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	BE [mmol/l]	Laktat [mmol/l]
MHS	7,4 [7,4-7,4]	44,5 [40,6-47,3]	0,4 [0,1-0,8]	1,0 [1,0-1,4]
MHN	7,4 [7,4-7,4]	40,2 [38,7-48,1]	0,3 [-0,9-1,2]	0,9 [0,9-1,0] <sup>§</sup>
Kontrolle	7,4 [7,3- 7,4]	46,5 [45,5-51,0]	0,8 [0,6-1,7]	1,4 [1,3-1,8]

#### 4.1.4. Muskelenzyme

Die Kreatinkinase-Werte im Serum zeigten zu Beginn und am Ende der Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen MHS-, MHN- und Kontrollgruppe. Der höchste Wert betrug 509 U/l in der MHS-Gruppe, 24 h nach der Untersuchung. Ein signifikanter Unterschied war zwischen MHS- und MHN-Probanden sowie zwischen Kontroll- und MHN-Probanden festzustellen (Daten siehe Tabelle 7). Der höchste individuelle Wert aller Teilnehmer wurde 24 h nach der Untersuchung bei einem MHS-Probanden gemessen. Dieser betrug 967 U/l, bei einem Ausgangswert von 580 U/l. Klinische Zeichen einer Myopathie bestanden zu keinem Zeitpunkt.

**Tabelle 7: Kreatinkinase im Serum am Versuchsbeginn, nach Triggerapplikation, 24 h nach Untersuchung; MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollgruppe: n= 7, Median und Quartilen, \*: p< 0,05 MHS vs. MHN, §: p< 0,05 MHN vs. Kontrollgruppe.**

<b>Kreatinkinase i.S.</b>	<b>Versuchsbeginn [U/l]</b>	<b>60 min nach Triggerapplikation [U/l]</b>	<b>24 h nach Untersuchung [U/l]</b>
MHS	289 [168-319]	305 [134-317]	509 [371-567]*
MHN	135 [119-176]	116 [100-149]	151 [132-205]§
Kontrolle	151 [102-211]	124 [86-184]	182 [68-28]

Die zu Beginn, 60 min nach Triggerapplikation und 24 h nach der Untersuchung durchgeführte Blutuntersuchung zeigte, dass signifikante Unterschiede der Myoglobinwerte zu allen drei Zeitpunkten zwischen der MHS- und der MHN-Gruppe sowie im Vergleich MHS- und Kontrollgruppe bestanden.

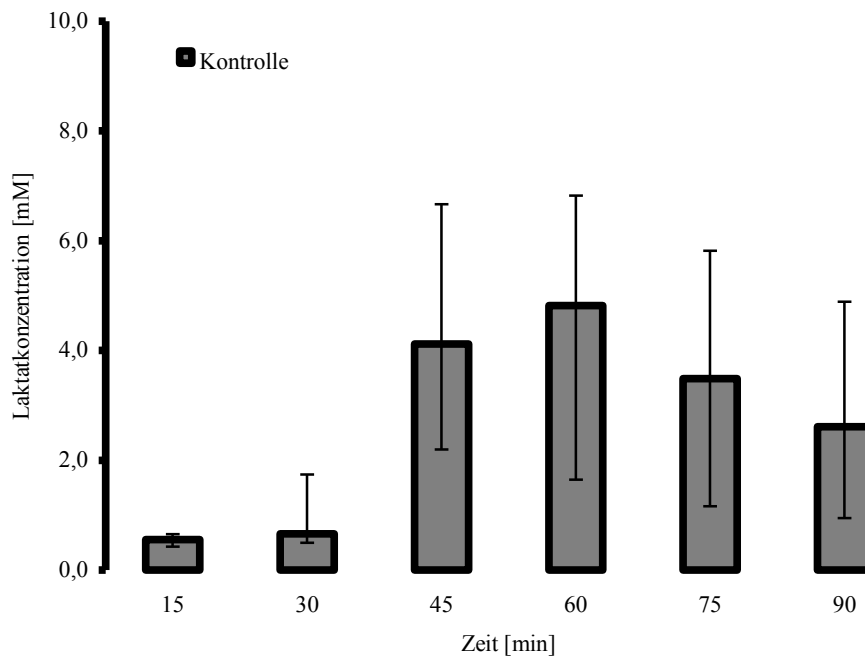
**Tabelle 8: Myoglobin im Serum am Versuchsbeginn, nach Triggerapplikation, 24 h nach Untersuchung; MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollgruppe: n= 7, Median und Quartilen, \*: p< 0,05 MHS vs. MHN, §: p< 0,05 MHS vs. Kontrollgruppe.**

<b>Myoglobin i.S.</b>	Versuchsbeginn [µg/l]	60 min nach Triggerapplikation [µg/l]	24h nach Untersuchung [µg/l]
MHS	68 [52-111]* §	98 [80-106]* §	81 [69-105]* §
MHN	44 [29-59]	34 [28-48]	42 [34-61]
Kontrolle	40 [28-51]	41 [38-46]	31 [25-38]

#### **4.1.5. Mikrodialyse**

##### **Laktatkonzentration nach Halothan 6 Vol%-Stimulation**

In der Gruppe der Kontrollprobanden wurde eine dritte Messsonde mit einer Halothan 6 Vol%igen Lösung zur Stimulation platziert. Der Median des ersten Messwerts lag bei 0,6 mM [0,4-0,7]. Nach der Applikation der Triggersubstanz Halothan 6 Vol% wurde ein Anstieg des Laktats auf ein Maximum von 4,8 mM [2,2-7,3] gemessen. Da der Anstieg der Laktatkonzentration unter der o.g. Halothan-Konzentration bereits bei Kontrollprobanden unerwartet hoch ausfiel, wurde auf eine Untersuchung von MHS- und MHN-Probanden mit 6 Vol% Halothan verzichtet.

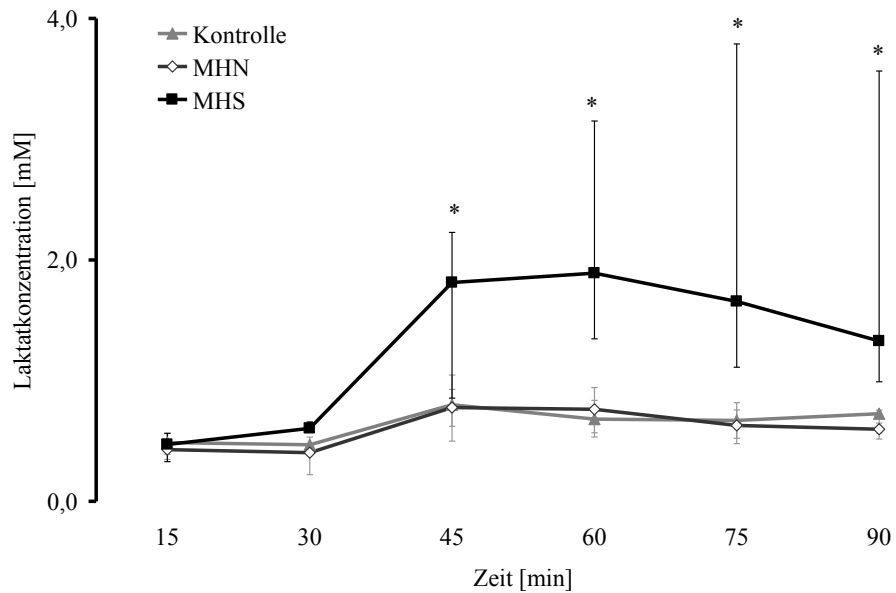


**Abbildung 6: Intramuskuläre Maximalwerte der Laktatkonzentrationen unter Stimulation mit 200 µl Halothan 6 Vol%, Median und Quartilen, Kontrollprobanden: n= 7.**

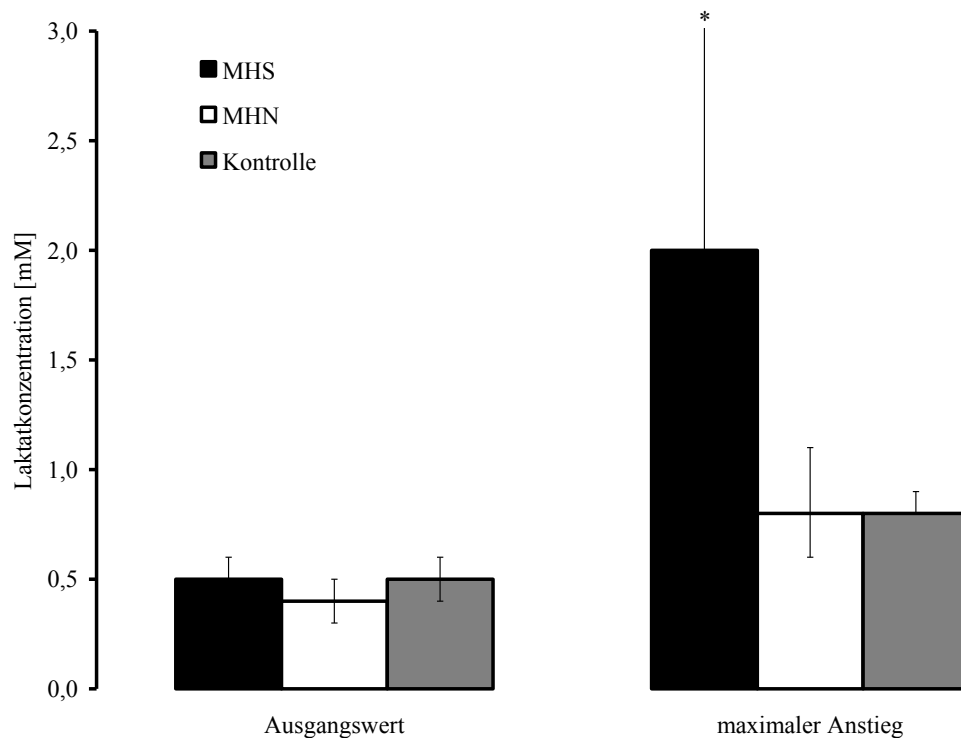
#### **Laktatwerte nach Koffein 80 mM-Stimulation**

Der Median des ersten Messwertes aller nach 15 min gemessenen Laktatkonzentrationen lag bei 0,5 mM [0,3-0,6], und es bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen. Nach der Stimulation mit 200 µl 80 mM Koffein stieg in der MHS-Gruppe die Laktatkonzentration von einem Ausgangswert von 0,5 mM [0,3-0,6] auf ein Maximum von 2,0 mM [1,8-3,8]. In der MHN-Gruppe zeigte sich bei einem Ausgangswert von 0,4 mM [0,3-0,5] nur ein Anstieg auf ein Maximum von 0,8 mM [0,6-1,1]. Die Werte der Kontrollgruppe wiesen ein ähnliches Verhalten auf. Der Ausgangswert lag bei 0,5 mM [0,4-0,6] und stieg auf 0,8 mM [0,8-0,9] an. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der MHS- und MHN-Gruppe und der MHS- und Kontrollgruppe. Der höchste Wert wurde in der MHS-Gruppe verzeichnet. Die MHN- und Kontrollgruppe verhielten sich identisch. Nicht signifikant verschieden waren die

Milchsäurekonzentrationen der MHN- und Kontrollgruppe. Aus technischen Gründen versagte die Messung der Koffeinsonde eines Kontrollprobanden.



**Abbildung 7: Maximalwerte der intramuskulären Laktatkonzentration unter Stimulation mit 200 µl Koffein 80 mM, Median und Quartilen, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7, \*: p< 0,05 für MHS- vs. MHN- Probanden.**

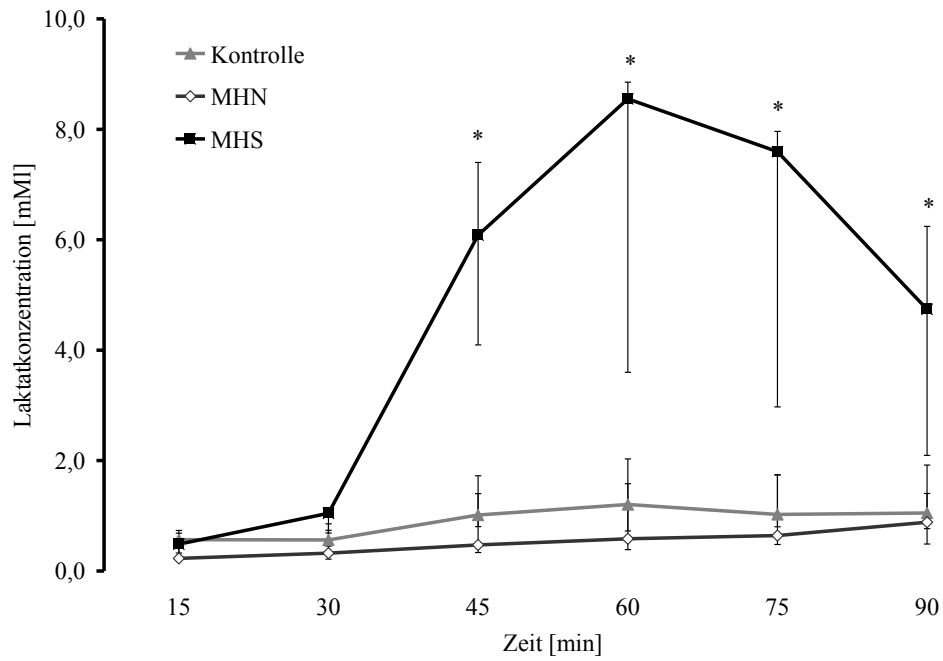


**Abbildung 8: Ausgangswert und maximaler Anstieg der Laktatkonzentration unter Stimulation mit 200 µl Koffein 80 mM, Median und Quartilen, \*:  $p < 0,05$  für MHS- vs. MHN-Probanden.**

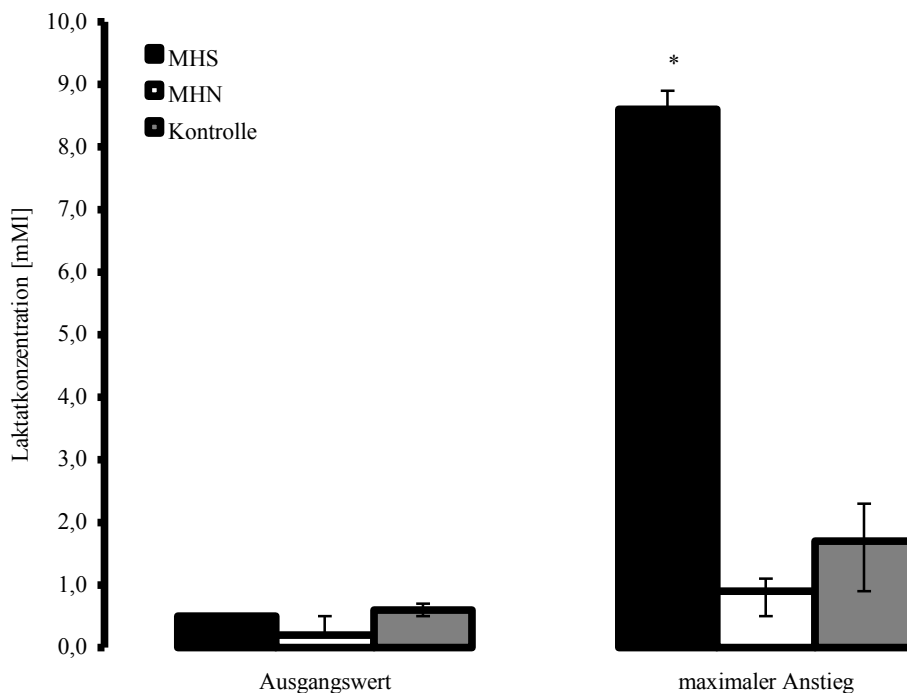
#### **Laktatwerte nach Halothan 4 Vol%-Stimulation**

Nach der Stimulation mit Halothan 4 Vol% ergab sich für die MHS-Probanden ein Spitzenwert der Laktatkonzentration von 8,6 mM [4,1-8,9] bei einem Ausgangswert von 0,5 mM [0,3-0,5]. In der MHN-Gruppe war dieser Anstieg wiederum wesentlich geringer ausgeprägt. Bei einem Anfangswert von 0,2 mM [0,2-0,5] wurden Maximalwerte von 0,9 mM [0,5-1,2] erreicht. Die Kontrollprobanden zeigten einen Anstieg der Laktatkonzentrationen von 0,6 mM [0,5-0,7] auf 1,7 mM [0,9-2,3] und erreichten somit einen höheren Spitzenwert als die MHN-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den MHS- und den MHN-Probanden ebenso wie zwischen MHS- und Kontrollprobanden festgestellt. MHN- und Kontrollprobanden unterschieden sich nicht. Nach dem Anstieg der Werte auf ein Maximum nach Injektion der verschiedenen Triggersubstanzen, fielen die Laktatwerte bei allen Probanden wieder ab. Die Messung

wurde nicht bis zum Erreichen der Ausgangswerte weitergeführt. Aufgrund technischer Probleme schlug die Messung der Halothansonde eines MHS-Probanden fehl.



**Abbildung 9: Intramuskuläre Maximalwerte der Laktatkonzentration unter Stimulation mit 200 µl Halothan 4 Vol%, Median und Quartilen, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7, \*: p < 0,05 für MHS- vs. MHN-Probanden.**

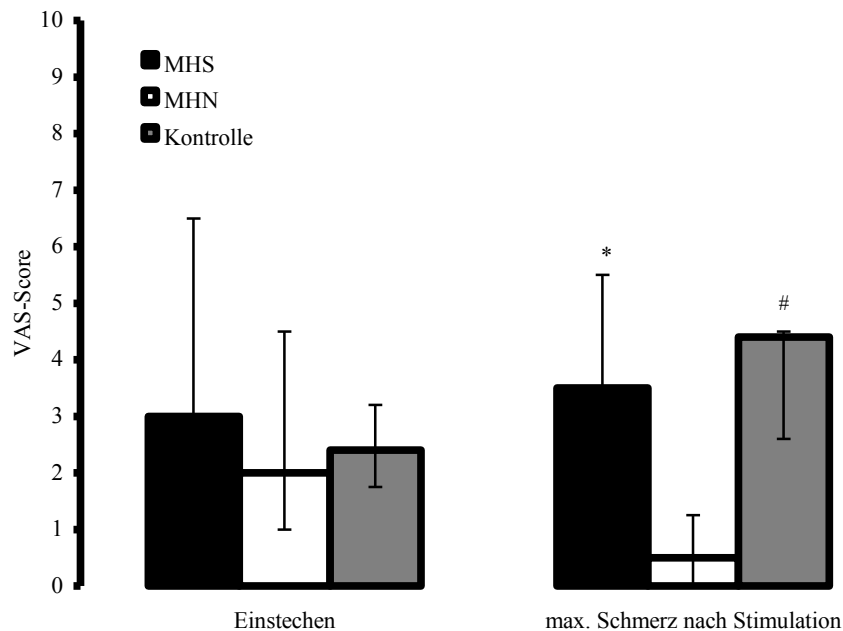


**Abbildung 10: Ausgangswert und Maximalwert der Laktatkonzentration nach Applikation von Halothan 4 Vol%, Median und Quartilen, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7, \*: p< 0,05 für MHS- vs. MHN-Probanden.**

#### 4.1.6. Visuelle Analogskala

Während der Untersuchung wurde der VAS-Wert entsprechend der Intensität des verspürten Schmerzes beim Einbringen der Messkatheter sowie der maximale Schmerz nach Applikation der Triggersubstanz ermittelt. Beim Einbringen der Messsonden empfanden die Gruppen ähnlich. Die MHS-Probanden gaben eine Schmerzintensität von 3,0 [2,0-6,5], die MHN-Probanden 2,0 [1,0-4,5] und die Kontrollteilnehmer 2,4 [1,8-3,2] an. Deutliche Unterschiede in der Empfindung wurden nach der Stimulation mit den Triggerlösungen festgestellt. Der höchste Wert wurde hier in der Kontrollgruppe mit 4,4 [2,6-4,5], gefolgt von der MHS-Gruppe mit 3,5 [2,3-5,5] gemessen. Den geringsten Schmerz empfanden die Teilnehmer der MHN-Gruppe mit einem Wert von 0,5 [0,0-1,3]. Demnach war der Unterschied zwischen den MHS- und den MHN-Teilnehmern sowie zwischen MHN- und Kontrollprobanden signifikant. Zwischen MHS- und Kontrollgruppe wurde kein Unterschied ermittelt.





**Abbildung 11: Scores der Visuellen Analogskala beim Einbringen der Messkatheter und nach Stimulation mit Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol%, Median und Quartilen, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7 mit zusätzlicher Messsonde Halothan 6 Vol%, \*:  $p < 0,05$  für MHS- vs. MHN-Probanden, #:  $p < 0,05$  für Kontroll- vs. MHN- Probanden.**

#### 4.1.7. Fragebögen

Zwei Wochen nach der Untersuchung erhielten alle Probanden Fragebögen. Ein Fragebogen aus der MHN-Gruppe wurde nicht vollständig ausgefüllt. Die Probanden konnten auf einer Skala von 1 (wenig; zufrieden) bis 10 (stark; unzufrieden; schlecht) verschiedene Aspekte der Untersuchung bewerten.

Nach Stimulation gaben Probanden der MHS-Gruppe sowie der Kontrollgruppe im Vergleich zu MHN-Teilnehmern stärkere Schmerzen an. Keiner der Probanden fühlte sich am Tag der Untersuchung oder am darauf folgenden Tag schwerwiegend beeinträchtigt. Der Schmerzcharakter während der Untersuchung wurde in der MHS-Gruppe am häufigsten als krampfartig, in der Kontrollgruppe als stumpf beschrieben, die MHN-Gruppe charakterisierte das Empfinden mit „wenig Schmerz“ bis „gar kein Schmerz“.

Die Schmerzen nach der Triggerapplikation hielten bei der MHS-Gruppe am längsten an. Die Einstichstelle war in allen Gruppen nach vier bis sieben Tagen verheilt.

**Tabelle 9: Auswertung der Fragebögen, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7, Median und Quartilen; S.: Schmerz.**

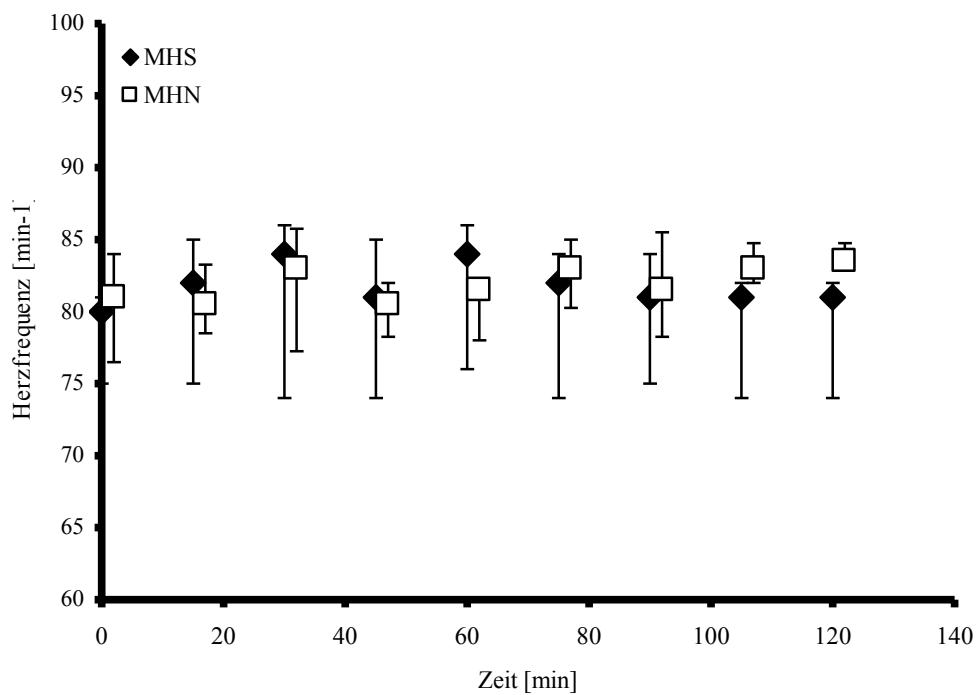
Fragebogen	MHS	MHN	Kontrollgruppe
Gesamtverlauf	2 [1-2]	2 [1-2]	2 [1-2]
Information im Vorfeld	1 [1-2]	2 [1-2]	2 [1-2]
Betreuung	1 [1-2]	1 [1-1]	1 [1-1]
S. Kanüle legen	2 [1-2]	2 [1-3]	1 [1-2]
S. Lokalanästhesie	2 [2-3]	3 [2-3]	3 [3-4]
S. Einstechen Messkatheter	3 [2-4]	3 [1-4]	4 [2-6]
S. Triggerapplikation	4 [3-6]	2 [1-3]	4 [2-6]
S. Entfernung Messkatheter	2 [2-3]	2 [1-2]	2 [2-2]
S. Tag der Untersuchung	2 [1-2]	2 [1-2]	2 [2-3]
S. Tag nach Untersuchung	1 [1-1]	1 [1-2]	1 [1-3]
Beeinträchtigung Tag n. Versuch	1 [1-2]	1 [1-1]	1 [1-3]
Rötung Einstichstelle	1 [1-1]	1 [1-1]	3 [2-4]
Bluterguss Einstichstelle	1 [1-1]	1 [1-1]	4 [4-5]
Tage durch S. beeinträchtigt	0 [0-2]	0 [0-0]	0 [0-2]
Schmerzcharakter	krampfartig	kein	stumpf
Dauer S. durch Triggerapplikation	20 [15-30]	0 [0-0]	2 [2-8]
Einstichstelle verheilt [Tage]	4 [3-5]	5 [4-6]	7 [4-9]
IVKT/ Messkatheter	Messkatheter	Messkatheter	

## 4.2. Tierversuchs-Studie

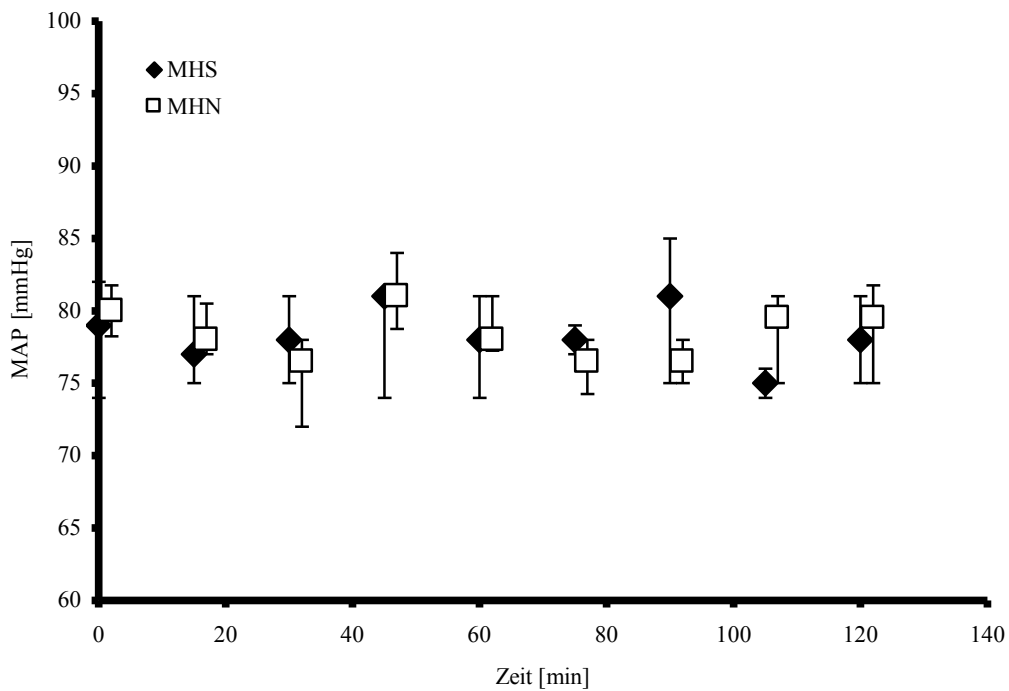
### 4.2.1. Biometrische Daten und systemische hämodynamische Parameter

Das Gewicht der Tiere lag in der MHS-Gruppe (n=9) bei 29 kg [27-31] und in der MHN-Gruppe (n=6) bei 32 kg [31-33].

Die Tiere unterschieden sich weder vor, noch nach Applikation der Triggersubstanzen bezüglich ihrer systemischen hämodynamischen Parameter.



**Abbildung 12: Herzfrequenz während der Untersuchung, MHS-Tiere: n= 9, MHN-Tiere: n= 6; Median und Quartilen.**



**Abbildung 13: Mittlerer arterieller Blutdruck während der Untersuchung, MHS-Tiere: n= 9, MHN-Tiere: n= 6; Median und Quartilen.**

**Tabelle 10: Temperatur bei Versuchsbeginn und am Ende der Untersuchung, MHS-Tiere: n= 9, MHN-Tiere: n= 6; Median und Quartilen.**

	Temp. prä [°C]	Temp. post [°C]
<b>MHS</b>	37 [36-37]	37 [37-37]
<b>MHN</b>	37 [37-37]	37 [37-38]

**Tabelle 11: Endexpiratorische Kohlendioxidkonzentration/ periphere Sauerstoffsättigung bei Versuchsbeginn und am Ende der Untersuchung, MHS-Tiere: n= 9, MHN-Tiere: n= 6; Median und Quartilen.**

	<b>EtCO<sub>2</sub> prä [mmHg]</b>	<b>EtCO<sub>2</sub> post [mmHg]</b>	<b>SpO<sub>2</sub> prä [%]</b>	<b>SpO<sub>2</sub> post [%]</b>
<b>MHS</b>	34 [32-34]	35 [31-35]	98 [97-99]	98 [98-98]
<b>MHN</b>	34 [32-34]	34 [31-35]	99 [88-99]	99 [97-100]

#### **4.2.2. Muskelenzyme**

Die Kreatinkinase-Werte der MHS-Gruppe waren vor der Untersuchung höher als in der MHN-Gruppe. In der MHS-Gruppe stieg sie nach der Untersuchung stark an. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Myoglobin-Werten.

**Tabelle 12: Kreatinkinase/ Myoglobin im Serum bei Versuchsbeginn und am Ende der Untersuchung, MHS-Tiere: n= 9, MHN-Tiere: n= 6; Median und Quartilen, \*: p< 0,05 für MHS vs. MHN.**

	<b>CK prä [U/l]</b>	<b>CK post [U/l]</b>	<b>Myoglobin prä [µg/l]</b>	<b>Myoglobin post [µg/l]</b>
<b>MHS</b>	1364 [1155-1689]*	1971 [1704-2663]*	30 [28-48]	52 [39-64]
<b>MHN</b>	605 [551-876]	832 [620-1082]	26 [23-32]	26 [19-35]

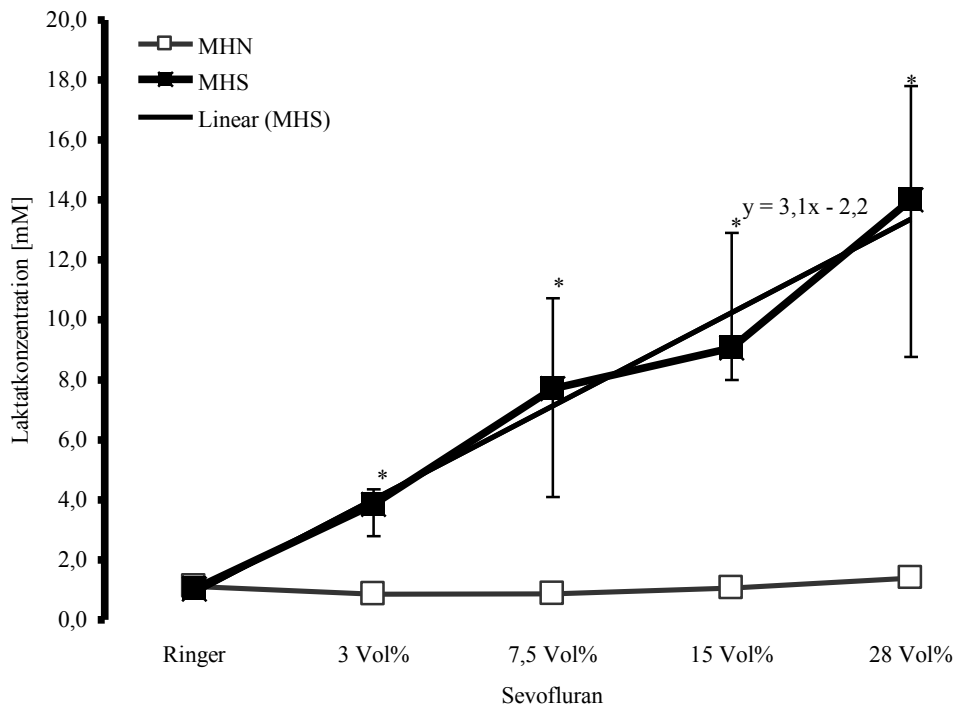
### 4.2.3. Mikrodialyse

Die intramuskulären Laktat-, Pyruvat- und Glukosewerte unterschieden sich vor der Applikation der Ringer-Lösung und der Sevofluranboli nicht signifikant. Die intramuskuläre Injektion von Sevofluran führte zu einem signifikanten Anstieg des lokalen Laktatspiegels in der MHS-Gruppe im Vergleich zur MHN-Gruppe.

**Tabelle 13: Maximale intramuskuläre Laktat- und Pyruvatkonzentrationen nach Stimulation mit 100 µl Sevofluran 3 Vol%, 7,5 Vol%, 15 Vol%, 28 Vol% und Ringer-Lösung als Kontrolle, MHS-Tiere: n= 9, MHN-Tiere: n= 6; Median und Quartilen, \*: p< 0,05 für MHS vs. MHN.**

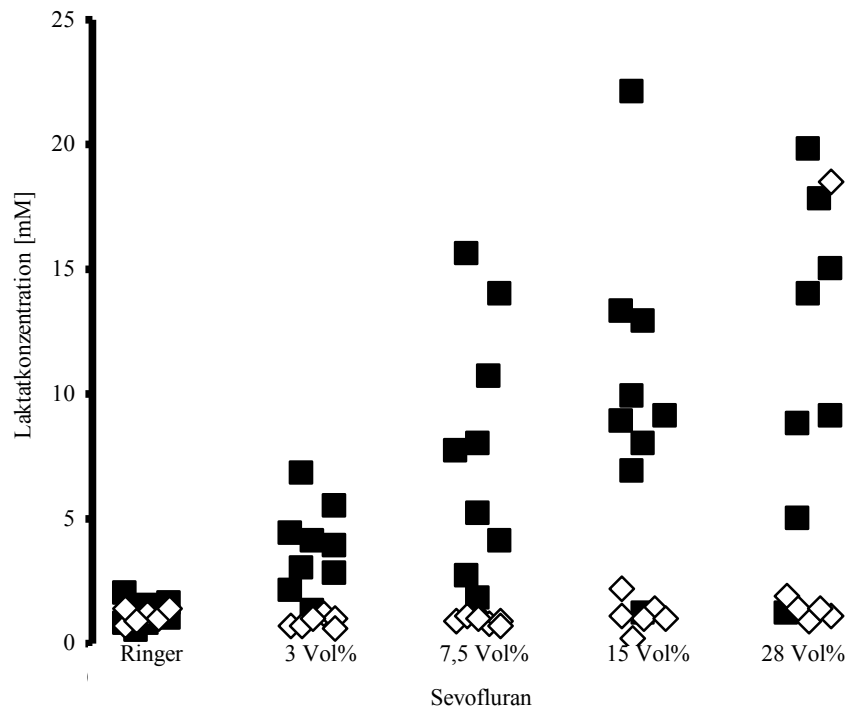
100 µl Sevofluran in Sojabohnenöl	Laktat [mM]		Pyruvat [mM]	
	MHS	MHN	MHS	MHN
<b>Ringer</b>	1 [0,8-1,5]	1,1 [1,0-1,3]	8,1 [6,3-9,1]	7,6 [6,3-8,5]
<b>3 Vol%</b>	3,9 [2,8-4,4]*	0,9 [0,7-1,0]	10,3 [8,7-12,6]	6,8 [6,4-8,1]
<b>7,5 Vol%</b>	7,7 [4,1-10,7]*	0,9 [0,8-0,9]	9,1 [6,7-11,2]	6,6 [5,8-8,0]
<b>15 Vol%</b>	9,1 [8,0-12,9]*	1,1 [1,0-1,3]	8,7 [7,4-12,4]	7,7 [7,3-8,3]
<b>28 Vol%</b>	14 [8,8-17,8]*	1,4 [1,1-1,8]	11,1 [8,2-14,6]	7,6 [7,3-11,2]

Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen den ansteigenden Sevoflurankonzentrationen und den Spitzenwerten der intramuskulären Laktatkonzentrationen der MHS-Tiere.



**Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Beziehung: Linearer Zusammenhang zwischen den ansteigenden Sevoflurankonzentrationen und den Maximalwerten der intramuskulären Laktatkonzentrationen der MHS-Tiere: Stimulation mit 100  $\mu$ l Sevofluran 3 Vol%, 7,5 Vol%, 15 Vol%, 28 Vol% und Ringer-Lösung, Median und Quartilen, MHS: n= 9 , MHN: n= 6, \*: p< 0,05 für MHS vs. MHN.**

Die Individualwerte der Laktatkonzentrationen der Tiere überschritten sich. (Abbildung) Bei zwei MHS-Tieren stiegen die Werte weniger an: bei Stimulation mit 15 Vol% auf den Wert 1,2 mM und auch bei 28 Vol% auf 1,2 mM. Die anderen Werte lagen zwischen 2,1 mM und 25,2 mM.



**Abbildung 15: Maximalwerte der Laktatkonzentrationen der MHS- und MHN-Tiere nach intramuskulärer Stimulation mit 100 µl Sevofluran 3 Vol%, 7,5 Vol%, 15 Vol%, 28 Vol% und Ringer-Lösung; Median, MHS: n= 9, MHN: n= 6.**



Die interstitiellen Glukosekonzentrationen wurden durch die ansteigenden Sevoflurankonzentrationen nicht signifikant erhöht. Die Pyruvatwerte und der Laktat/Pyruvat-Quotient stiegen dosisabhängig an. Im Vergleich MHS-MHN wurden signifikante Unterschiede des Laktat/Pyruvat-Quotienten bei allen vier Konzentrationen erzielt. Die Werte für Pyruvat unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

**Tabelle 14: Maximale intramuskuläre Glukosekonzentration/ Laktat/Pyruvat-Quotient unter Stimulation mit 100 µl Sevofluran 3 Vol%, 7,5 Vol%, 15 Vol%, 28 Vol% und Ringer-Lösung als Kontrolle, MHS-Tiere: n= 9, MHN-Tiere: n= 6; Median und Quartilen, \*: p< 0,05 für MHS vs. MHN.**

100 µl Sevofluran in Sojabohnenöl	Glukose [mM]		Laktat/Pyruvat-Quotient	
	MHS	MHN	MHS	MHN
<b>Ringer</b>	2,4 [1,9-2,7]	2,4 [2,0-2,9]	0,1 [0,1-0,2]	0,1 [0,1-0,2]
<b>3 Vol%</b>	1,8 [1,6-2,0]	1,8 [1,5-2,0]	0,4 [0,3-0,4]*	0,1 [0,1-0,1]
<b>7,5 Vol%</b>	1,7 [1,6-2,3]	1,8 [1,4-2,7]	0,9 [0,4-1,2]*	0,1 [0,1-0,1]
<b>15 Vol%</b>	1,9 [1,6-2,4]	2,2 [1,9-2,7]	1,0 [0,9-1,1]*	0,2 [0,1-0,2]
<b>28 Vol%</b>	1,7 [1,3-2,2]	2,2 [1,7-2,6]	1,0 [0,9-1,3]*	0,2 [0,1-0,2]

## **5. DISKUSSION**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass (a) die lokale Injektion von Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol% einen mittels Mikrodialysetechnik messbaren Anstieg der intramuskulären Laktatkonzentration induziert und eine Unterscheidung zwischen Probanden mit MH-Veranlagung und Gesunden ermöglicht. Ferner machen die Ergebnisse sichtbar, dass (b) im Tierversuch Sevofluran als potentieller Ersatz für Halothan im minimal-invasiven metabolischen Test geeignet erscheint und (c) eine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung für Sevofluran nachweisbar ist. Klinisch relevante systemische oder lokale Nebenwirkungen konnten weder in der Probandenstudie noch im Tierversuch festgestellt werden.

### **5.1. Entwicklung des Versuchsprotokolls/ Methodik der Probanden-Studie**

Zu Beginn der Studie wurden die Substanzen Halothan 6 Vol%, Halothan 4 Vol% und Koffein 80 mM intramuskulär injiziert, um eine diagnostische Zuordnung in MH-positiv oder -negativ zu treffen. Halothan 4 Vol% und 6 Vol% wurden in Sojabohnenöl gelöst, um eine toxische Zellschädigung durch eine alleinige Applikation zu umgehen (53). Testet man Sojabohnenöl als singuläre Substanz im minimal-invasiven Test, kommt es zu keiner metabolischen Reaktion. Ein Einfluss auf die intramuskuläre Laktatkonzentration ist also nicht zu befürchten (54).

Es wurde aber nach Injektion von Halothan 6 Vol% auch bei Nicht-MH-veranlagten Probanden eine lokale hypermetabole Stoffwechselreaktion beobachtet, welche mit der Stoffwechselreaktion bei MH-positiven Teilnehmern vergleichbar war. Im Tiermodell ist ebenfalls bei Verwendung entsprechend hoher Halothankonzentrationen und fehlender MH-Veranlagung eine Stoffwechselsteigerung beschrieben (55). Ähnliche Ergebnisse liegen für in-vitro-Versuche vor. Die Stimulation mit Koffein löst in einer Konzentration von 32 mM eine maximale Skelettmuskelkontraktur aus (56). Wird dieses Phänomen auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung übertragen, zeigt sich eine Rechtsverschiebung der klassischen, sigmoiden Dosis-Wirkungs-Kurve. Aufgrund dieser Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve ist bei Stimulation mit Halothan 6 Vol% keine ausreichende Differenzierung der Laktatkonzentrationen in MH-positiv oder -negativ möglich, so dass die Applikation von Halothan in dieser Konzentration nicht weitergeführt wurde. Die Messungen wurden mit den Triggersubstanzen Halothan 4 Vol% und Koffein 80 mM an MHS-Probanden, MHN-Probanden, und Kontrollprobanden rando-

misiert fortgesetzt. Sowohl Halothan 4 Vol% wie auch Koffein 80 mM führten bei MHS-Probanden zu einer lokalen hypermetabolischen Reaktion des Skelettmuskels. Die intramuskulären Laktatkonzentrationen stiegen bei MH-veranlagten Probanden entsprechend einer Dosis-Wirkungs-Beziehung an und ließen sich gut von nicht-veranlagten Teilnehmern unterscheiden.

Eine Beeinflussung der Werte der Kontrollprobanden durch die zunächst zusätzlich getestete Substanz Halothan 6 Vol% ist wegen der räumlichen Nähe der Applikationskatheter nicht auszuschließen. In einer Studie an MH-suszeptiblen Schweinen wurden jedoch in einem Abstand von mehr als 10 mm zu der Mikrodialysesonde keine metabolischen Veränderungen nachgewiesen (54). Da die Katheter in einem Abstand von mindestens 30 mm zur Sonde platziert wurden, macht dies eine Verzerrung der Messergebnisse durch eine Substanzdiffusion sehr unwahrscheinlich

In der Probandenstudie wurde eine Äquilibrierungszeit von 20 Minuten, im Tierversuch von 15 Minuten gewählt. Die ersten beiden Messungen aller Sonden zeigten konstant stabile Messbedingungen. Auch in einer früheren Untersuchung konnten schon nach 15 Minuten gleich bleibende Ausgangswerte erzielt werden, so dass eine Veränderung der Messwerte aufgrund einer unangemessenen Äquilibrierungsphase nicht anzunehmen ist (48).

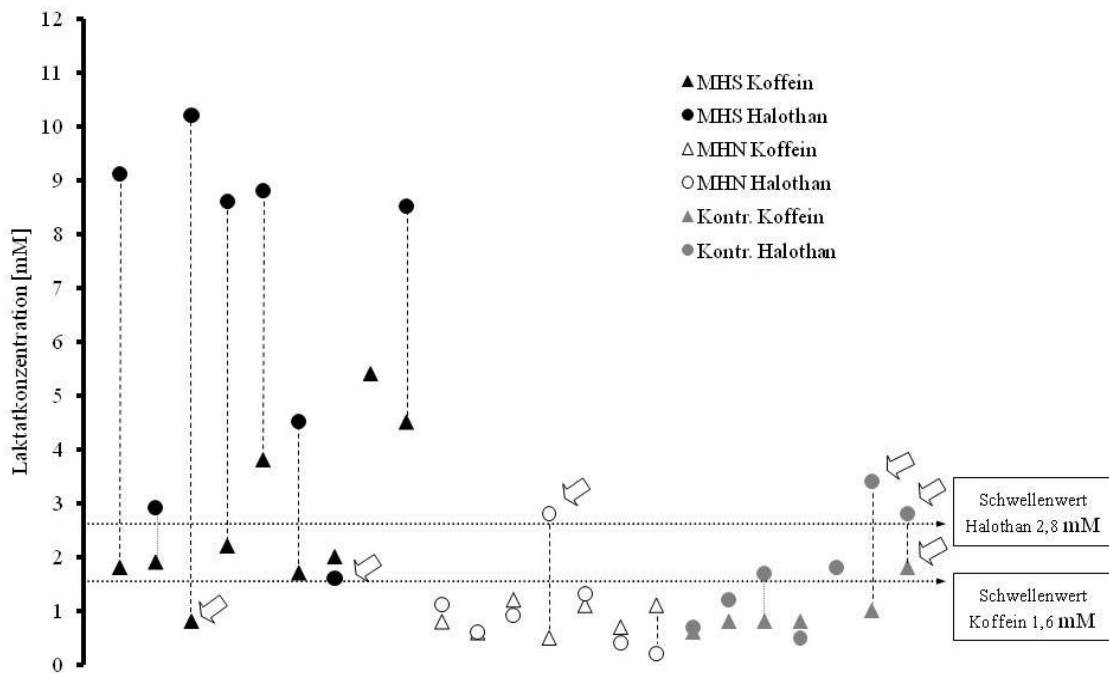
Als Perfusat wurde in beiden Versuchen Ringer-Lösung verwendet. Ein osmotischer Effekt, der die Laktatmessung beeinflussen könnte, wurde in Voruntersuchungen ausgeschlossen (57).

## **5.2. Individuelle Ergebnisse der Probanden-Studie**

Für eine sichere Diagnostik einer MH-Veranlagung müssen in die Auswertung der individuellen Daten die Testergebnisse beider Messsonden der menschlichen Probanden einfließen. In der Studie wurden folgende Schwellenwerte empirisch festgelegt:

1. Laktatschwellenwert nach Koffeinstimulation 1,6 mM
2. Laktatschwellenwert nach Halothanstimulation 2,8 mM

Bei diesen Schwellenwerten wird angenommen, dass eine sichere Klassifizierung der Patienten als MH-positiv oder MH-negativ gewährleistet ist. Im Rahmen der Studie wurde ein Patient als MH-positiv eingestuft, wenn mindestens einer der beiden Schwellenwerte überschritten wurde.



**Abbildung 16: Individuelle Maximalwerte der intramuskulären Laktatkonzentrationen unter Stimulation mit Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol%, MHS: n= 9, MHN: n= 7, Kontrollprobanden: n= 7, Testergebnisse eines Probanden jeweils vertikal untereinander dargestellt; empirischer Schwellenwert Koffein: 1,6 mM; empirischer Schwellenwert Halothan: 2,8 mM; =>: Abweichung vom Schwellenwert.**

Der minimal-invasive Test mit den Konzentrationen Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol% fiel bei allen MHS-Probanden positiv aus. Ein MHN-Proband wies ein MH-ähnliches Testergebnis auf und wurde falsch-positiv klassifiziert. Ein derartiger Anstieg des Laktatwertes wurde bereits in einer früheren Probanden-Studie nach Applikation höherer Halothandosen festgestellt (58).

Als Begründung könnte man die im Vorfeld gestellte Diagnose des IVKT bei dem MHN-Probanden in Frage stellen. Die Klassifizierung der Patienten im IVKT ist aber bei einer Sensitivität von 99% und einer Spezifität von 94% (22) als korrekt anzunehmen. Zudem bestand eine familiär gesicherte MH-Mutation, die mit dem Ergebnis des IVKT übereinstimmte. Daher kann mit sehr hoher Sicherheit davon ausgegangen wer-

den, dass ein MH-positiver bzw. MH-negativer Proband auch eine korrekte Diagnose trug.

Auch in der Kontrollgruppe reagierten zwei Probanden positiv. Ein Proband sprach stärker auf Halothan 4 Vol% an, der zweite Proband reagierte auf beide getesteten Substanzen gleichermaßen positiv. Als Begründung wäre hier eine bisher nicht bekannte MH-Veranlagung denkbar. Da die genetische Prävalenz einer MH bei 1:10000 (7) liegt, erscheint dies aber als unwahrscheinlich. Eine subklinische Myopathie ist jedoch nicht mit Sicherheit auszuschließen. Klinisch bestanden dafür keine Anzeichen.

Bei den Untersuchungen trat weiterhin bei einem MHS-Patienten kein Laktatanstieg nach Stimulation mit der Substanz Koffein 80 mM auf. Bei einem weiteren MHS-Probanden fehlte die Stoffwechselsteigerung nach Stimulation mit Halothan 4 Vol%. Dafür existieren mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

So könnte das fehlende Ansprechen der MHS-Probanden auf die Triggersubstanzen in Zusammenhang mit dem äußerst heterogenen Erscheinungsbild der MH stehen. Die Symptomatik der MH weist eine hohe Variabilität auf. Bis heute ist unklar, warum einige MHS-Individuen bei der ersten Exposition mit Triggersubstanzen keinerlei klinische Anzeichen aufweisen, während andere wiederum sofort mit einer fulminanten MH-Krise reagieren. Zum Teil entwickeln die Veranlagten auch nur einzelne Symptome wie einen Masseterspasmus oder eine Rhabdomyolyse (59). Selbst im IVKT, der den Goldstandard der MH darstellt, wurde von einer intraindividuell variablen Reaktion der Muskelkontraktur berichtet (60).

Der fehlende Laktatanstieg nach Triggerapplikation bei den zwei MHS-Probanden könnte aber auch durch methodische Probleme bedingt worden sein. So ist die genaue Verteilung der Triggersubstanz im interstitiellen Raum nach erfolgter intramuskulärer Injektion unbekannt. Das Vorliegen lokal unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz ist dementsprechend denkbar. Weiterhin kann auch eine Fehlplatzierung der Mikrodialysesonde zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

### **5.3. Sensitivität und Spezifität des minimal-invasiven Tests**

Da die MH eine potentiell tödliche Erkrankung ist, wird für den diagnostischen Test einer MH-Veranlagung eine möglichst hohe Sensitivität gefordert. Schließt man in die Berechnung nur die mittels IVKT vordiagnostizierten neun MHS- und sieben MHN-

Probanden ein, ergibt sich eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 86%. Ein positiv oder negativ prädiktiver Wert ist nicht bestimmbar, da die genaue Prävalenz der MH nicht bekannt ist. Die Aussagekraft dieser Parameter ist auf Grund der geringen Probandenanzahl beschränkt.

#### **5.4. Systemische Nebenwirkungen**

Die Applikation kleiner Mengen MH-spezifischer Triggersubstanzen kann eine MH-Krise induzieren. Darum wurde in beiden Studien besonderer Wert auf eine sorgfältige Überprüfung der Vitalparameter gelegt. In der Probanden-Studie gab es keine Auffälligkeiten bezüglich der Herzfrequenz, des mittleren arteriellen Blutdrucks und der peripheren Sauerstoffsättigung. Insbesondere nach Triggerapplikation lagen die Werte immer im physiologischen Bereich. Bei den Probanden wurde vor Beginn und nach der Untersuchung eine venöse Blutgasanalyse durchgeführt. Es gab keine Veränderungen, die auf eine metabolische Azidose als Zeichen der Entwicklung einer MH beim spontan atmenden Patienten hindeuteten. Schon in vorangegangenen Studien an Schweinen und am Menschen (52) waren bei den eingesetzten, geringen Mengen an Triggersubstanz keinerlei Symptome der MH festgestellt worden. Auch im Tierversuch waren die systemischen hämodynamischen Parameter in beiden Gruppen unauffällig. Es zeigte sich kein Anstieg des Kohlendioxidpartialdrucks als Frühsymptom einer MH-Reaktion (18) bei beatmeten MH-Veranlagten.

#### **5.5. Lokale Nebenwirkungen**

Grundsätzlich kann man zwischen zwei Formen der lokalen Nebenwirkungen unterscheiden. So traten bei bestimmten Probanden nach der Untersuchung Schmerzen auf. In diesem Zusammenhang ist eine lokale Schädigung des Muskelgewebes zu diskutieren. Des Weiteren wurden die Messsonden in räumlicher Nähe zueinander platziert. So wäre zu überlegen, ob es hierbei zu Interferenzen bei den Messvorgängen gekommen sein könnte. Im Folgenden soll auf diese Fragen genauer eingegangen werden.

Die Energiegewinnung in der Muskulatur erfolgt primär aerob. Liegt jedoch eine systemische, maximale Steigerung des Energieumsatzes vor, wie dies bei der MH der Fall ist, erfolgt die Energiegewinnung zunehmend auf anaerobem Wege. Laktat reichert sich als Stoffwechselendprodukt intrazellulär an, so dass eine Störung der Homöostase der

Skelettmuskelzelle resultiert und eine Zellmembranschädigung eintritt (15). Hierbei werden Muskelenzyme freigesetzt. Im Rahmen einer MH-Krise kommt es zu Zellnekrosen, Rhabdomyolyse und zu einem starken Anstieg der Kreatinkinase (27). Daraus wird ersichtlich, dass eine Beobachtung der Muskelenzyme Kreatinkinase und Myoglobin im Serum vor, direkt im Anschluss und 24 Stunden nach der Untersuchung sinnvolle Parameter für die Erfassung einer Muskelzellschädigung darstellen. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Konzentration der Serum-Kreatinkinase war erst 24 Stunden nach der Untersuchung zwischen den verschiedenen Patientengruppen nachweisbar. Es bestanden Unterschiede zwischen den Kreatinkinase-Werten der MHS-Gruppe und der MHN-Gruppe sowie zwischen der MHS-Gruppe und der Kontrollgruppe während sich zwischen MHN- und Kontrollgruppe kein Unterschied zeigte. Ähnliche Befunde liegen von Studien nach einem Trauma, schwerer körperlicher Arbeit und intramuskulären Injektionen vor. Die Kreatinkinase-Werte stiegen ca. 18 Stunden später an (61, 62). Ein Anstieg der Kreatinkinase lässt demnach nicht zwangsläufig auf eine Schädigung der Muskelfasern schließen. In der Kontrollgruppe der Probandenuntersuchung wurden trotz z.T. deutlich erhöhter Laktatwerte keine Veränderungen der Muskelenzyme und somit keine Anzeichen für einen lokalen Muskelschaden festgestellt.

Lokale Schmerzen am Ort der Stimulation wiesen vor allem MHS- und Kontrollprobanden auf. Schmerz ist ein Indikator für eine Muskelzellschädigung (63). Es wäre denkbar, dass durch die örtlich begrenzte Stoffwechselsteigerung eine Muskelzellschädigung hervorgerufen wird. Der Muskel war jedoch bei allen Studienteilnehmern palpatorisch weich. Es lagen keinerlei klinische Hinweise auf eine Schädigung vor. Im Rahmen unseres Tierversuches wurden sporadisch Ultraschalluntersuchungen der Muskulatur durchgeführt. Auch diese Untersuchungen waren durchgehend unauffällig. Histologische Untersuchungen an Muskelbiopsien von Ratten, welche ebenfalls einer lokalen muskulären Stimulation mit Koffein und Halothan gelöst in Sojabohnenöl unterzogen worden waren, ergaben nur unspezifische morphologische Veränderungen im Sinne einer hydropischen Zellschwellung. Eine strukturelle Schädigung der Muskelfasern konnte nicht nachgewiesen werden (57).

Die Platzierung der Sonden verursacht ein lokales Gewebstrauma, das Einfluss auf den lokalen Metabolismus haben könnte. In einer vorhergehenden Studie an MHS- und MHN-Schweinen wurde gezeigt, dass die Laktatmessung bei einem Mindestabstand

zwischen den Messsonden von zehn bis fünfundzwanzig Millimetern nicht beeinflusst wird. Die lokale hypermetabole Reaktion nach Stimulation ist also auf ein Gebiet von kleiner als zehn Millimeter um die jeweilige Sonde begrenzt. Ein größerer Muskelschaden ist folglich nicht zu erwarten (54).

### **5.6. Akzeptanz des Verfahrens**

Vier bis sechs Wochen nach der Untersuchung wurden die Probanden aufgefordert, unterschiedliche Aspekte des neuen Verfahrens zu bewerten. Aus Sicht der Untersuchten stellt der Schmerz einen der wichtigsten Punkte dar. Die stärksten Schmerzen empfanden die MHS-Individuen, gefolgt von den Kontroll- und MHN-Probanden nach Applikation der Triggersubstanzen. Die Qualität des Schmerzes wurde von MHS-Probanden als krampfartig beschrieben und blieb nach Triggerapplikation im Vergleich zu den anderen Gruppen am längsten bestehen. Diese Aussagen korrelieren mit dem stärkeren Anstieg der Laktatwerte bei MHS-Probanden als in den beiden anderen Gruppen, welcher durch eine massive Kalzium-Freisetzung im Skelettmuskel mit nachfolgender Stoffwechselsteigerung induziert wird (64). Halothan 6 Vol% als zusätzliche Stimulationssubstanz erzeugte in der Kontrollgruppe eine ähnliche Reaktion. Der VAS-Score dieser Probanden war vergleichbar mit MHS-Patienten. Die MHN-Probanden gaben zumeist an, keine Schmerzen verspürt zu haben. Insgesamt fühlten sich alle Probanden durch diese Untersuchung nur sehr geringfügig beeinträchtigt. Sämtliche Teilnehmer würden sich für den minimal-invasiven Test und gegen eine Muskelbiopsie entscheiden. In einer Befragung nach der Diagnostik einer MH-Veranlagung mittels IVKT wurde von den Patienten eine Dauer des Wundschmerzes von 6,7 Tagen sowie eine motorische Beeinträchtigung von 10,3 Tagen angegeben, die mit einer Arbeitsunfähigkeit von 9,5 Tagen einhergingen (65). Im Vergleich erweist sich der minimal-invasive Test als wesentlich weniger beeinträchtigend.

### **5.7. Entwicklung des Versuchsprotokolls/ Methodik der Tierversuchs-Studie**

Sevofluran findet häufig als Ersatz für Halothan in der Klinik Verwendung. Im Rahmen der Studie wurde deshalb auch Sevofluran als Triggersubstanz für die MH untersucht. Hinsichtlich der Auslösung einer MH besitzt Sevofluran eine schwächere Triggerpotenz als Halothan (39). Ziel des Versuchs war es, die Wirkung von Sevofluran als Trigger im



minimal-invasiven Test zu untersuchen und seine potentielle Eignung als Halothanersatz zu überprüfen.

Sevofluran wurde, wie schon in der Probandenstudie, in Sojabohnenöl gelöst. Es ist anzunehmen, dass diese Zusammensetzung der Substanzen genauso wie Halothan in Sojabohnenöl eine intravenöse Anästhesie erlauben würde, ohne eine Zellschädigung zu verursachen (66). Lokale Nebenwirkungen auf den Skelettmuskelstoffwechsel bei singularer intramuskulärer Applikation von Sojabohnenöl wurden in Voruntersuchungen ausgeschlossen (54).

In dieser Studie wurden weitere Parameter wie die Pyruvatkonzentration, die Glukosekonzentration und der Laktat/Pyruvat-Quotient untersucht. Die Bestimmung des Laktat/Pyruvat-Quotienten erlaubt Rückschlüsse auf den intrazellulären Energiehaushalt. Halothan und Koffein induzieren bei MH-veranlagten Patienten durch Interaktion mit dem Ryanodinrezeptor einen zellulären Kalziumüberschuss, der einen erhöhten Energieverbrauch durch die Aktivierung kontraktile Filamente zur Folge hat. Es resultiert ein Abfall des Adenosintriphosphat/Adenosindiphosphat-Quotienten, der wiederum zu einer Zunahme des NADH/NAD<sup>+</sup>-Quotienten führt. Letztlich erhöht sich dadurch der Laktat/Pyruvat-Quotient (67, 68). Für Sevofluran wurden ähnliche Ergebnisse erwartet.

Es wurde, was die Applikation der Triggersubstanzen betrifft, das gleiche Versuchsprotokoll wie beim Versuch mit menschlichen Probanden verwendet. Demzufolge waren bezüglich der Methodik die gleichen Fehlerquellen zu erwarten wie bei der Probandenstudie. Unterschiede bestanden in einer Vollnarkose, einer invasiven Blutdruckmessung und in einer ZVK-Anlage. Die systemischen Parameter wurden dadurch bei erstmaliger intramuskulärer Applikation von Sevofluran viel engmaschiger überwacht. Auch in vorangehenden Untersuchungen der Halothanlösung an Tieren wurde dies so gehandhabt, um eine eventuelle generalisierte Reaktion schnellstmöglich erkennen zu können (54).

### **5.8. Individuelle Ergebnisse der Tierversuchs-Studie**

Die durchgeführte Studie zeigt, dass die intramuskuläre Injektion von Sevofluran den lokalen Skelettmuskelmetabolismus bei MHS-Tieren stärker stimuliert als bei MHN-Tieren. Die Laktatwerte vor Applikation der Triggersubstanzen waren bei MHS- und MHN-Tieren identisch. Nach der Stimulation wurden bei MHS-Tieren höhere intra-

muskuläre Laktatkonzentrationen gemessen als bei MHN-Tieren. Zwischen den Ergebnissen der MHS- und der MHN-Gruppe wurden Überlappungen festgestellt. Die deutlichste Differenzierung zwischen den Gruppen ermöglichte die Substanz Sevofluran in der Konzentration 15 Vol% (siehe Abbildung 15). Der Laktat/Pyruvat-Quotient wies wiederum eine signifikante Erhöhung nach Triggerapplikation zwischen MHS- und MHN-Tieren auf. Auch dies kann als Zeichen des lokalen Hypermetabolismus gedeutet werden. Hinsichtlich der Glukose- und Pyruvatkonzentrationen traten bei MHS- und MHN-Tieren nach Stimulation keine Unterschiede auf.

Bei den Untersuchungen reagierten zwei MHS-Tiere nach Stimulation falsch-negativ. Es gelten die gleichen Fehlerquellen wie im Probandenversuch: Auf der einen Seite wären methodische Probleme möglich. Andererseits weist die MH ein sehr heterogenes Erscheinungsbild auf.

### **5.9. Dosis-Wirkungs-Beziehung**

Unter Berücksichtigung der Studienergebnisse von Halothan (54) wurde postuliert, dass auch Sevofluran gelöst in Sojabohnenöl nach intramuskulärer Injektion einen dosisabhängigen Effekt auf die untersuchten Werte haben könnte und eine Unterscheidung zwischen MHS- und MHN-Tieren ermöglicht wird.

Versuche im Rahmen des IVKT an MHS- und MHN-Individuen zeigten, dass Sevofluran im menschlichen Skelettmuskel dosisabhängige Kontrakturen induziert (69). In der vorliegenden Arbeit wurde ein dosisabhängiger Effekt nach intramuskulärer Injektion von Sevofluran auf die Laktatkonzentration und den Laktat/Pyruvat-Quotienten beobachtet. Bei MH-veranlagten Tieren wurde eine stärkere Steigerung des Skelettmuskelmetabolismus nachgewiesen als bei nicht-veranlagten Tieren. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den ansteigenden Sevoflurankonzentrationen und den gemessenen Laktatkonzentrationen. Dies entspricht einer Dosis-Wirkungs-Beziehung (siehe Abbildung 14).

Sevofluran hat sich im Tierversuch als Trigger bewährt. Im nächsten Schritt kann untersucht werden, ob man mittels Sevofluran auch beim Menschen zwischen MHS und MHN unterscheiden kann, in welchem Bereich die Schwellenwerte liegen und ab welcher Konzentration man von einer MH-Veranlagung ausgehen muss.

## 5.10. Bewertung des Verfahrens

Der minimal-invasive Test hat Stärken und Schwächen:

- a) Die Konzentration der Triggersubstanzen variiert in Abhängigkeit vom interstiellen Wasser- und Fettgehalt. Dies zeigt sich besonders bei adipösen Patienten. Für eine zuverlässige Diagnose ist eine Messung in reinem Skelettmuskelgewebe erforderlich. Eingelagerte Fettmuskelzellen können zu einem verfälschten Ergebnis führen. Bei einem BMI  $> 35 \text{ kg/m}^2$  ist davon auszugehen, dass die Einführungskanüle zu kurz ist, um die subkutane Fettschicht zu durchdringen und eine Messung im Skelettmuskel zu gewährleisten.
- b) Im Vergleich mit dem IVKT stellt der minimal-invasive Test keinen operativen Eingriff mit den damit einhergehenden Risiken wie Blutung, größere Infektionsgefahr und Nervenverletzung dar. Er zeichnet sich durch seine leichte Wiederholbarkeit und einfache Standardisierung aus und ist kostengünstiger als der IVKT. Ein genetisches Screening scheint in absehbarer Zeit bei 33 kausalen Mutationen, die nur in 40% der MH-Familien nachgewiesen wurden, nicht realisierbar.
- c) Sollte Halothan in der Zukunft nicht mehr zur Verfügung stehen, könnte der minimal-invasive Test mit Sevofluran fortgeführt werden. Erfolgversprechende Vorversuche wurden in dieser Arbeit durchgeführt.

Im Allgemeinen handelt es sich bei diesem metabolischen Test um eine funktionelle in-vivo Untersuchung, in der die lokale Reaktion des Skelettmuskelmetabolismus auf die Applikation von Halothan und Koffein untersucht wird. Wiederholte Messungen mit Koffein und Halothan, wie sie im Testprotokoll des IVKT durchgeführt werden, könnten die Sensitivität und Spezifität des Verfahrens erheblich steigern. Führt eine der Messungen zu einer positiven Reaktion, wird der Patient als MHS klassifiziert. Stellt sich kein Laktatanstieg auf eine Triggerexposition ein und besteht anamnestisch eine vermutliche MH-Disposition, muss zur Diagnosesicherung der IVKT durchgeführt werden. Um eine valide Aussage zur tatsächlichen Sensitivität und Spezifität sowie zu den genauen Schwellenwerten für eine MH-Disposition zu treffen, sind größere Fallzahlen nötig. Eine Multizenterstudie mit diesem Versuchsprotokoll wird deshalb angestrebt.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine erbliche Myopathie, die bei prädisponierten Patienten durch Anwendung volatiler Anästhetika sowie depolarisierender Muskelrelaxanzien bei Narkosen verursacht wird. Die klinische Symptomatik umfasst einen Anstieg des endexpiratorischen Kohlendioxidpartialdrucks, Tachykardie, Muskelrigidität, metabolische Azidose und Hyperthermie. Dieser Prozess wird durch einen abnorm erhöhten Einstrom von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma ausgelöst, welcher durch eine Mutation im Ryanodinrezeptor der Skelettmuskulatur bedingt ist.

Der Goldstandard für die Diagnostik einer MH-Veranlagung ist der Koffein-Halothan-In-vitro-Kontrakturtest. Eine Alternative zu diesem operativen Eingriff stellt der minimal-invasive Test dar. Untersucht wurde, ob der intramuskuläre Laktatspiegel durch eine lokale Applikation der Triggersubstanzen Halothan 6 Vol%, Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol% in Abhängigkeit von der MH-Prädisposition gesteigert wird. Ziel der Studie war es zu überprüfen, ob dies eine Differenzierung zwischen MHS- und MHN-Individuen ermöglicht.

Da die humanmedizinische Zulassung von Halothan abgelaufen ist, könnte es in naher Zukunft kommerziell nicht mehr erhältlich sein. Sevofluran als neueres Inhalationsanästhetikum könnte als potentieller Ersatz für Halothan Verwendung finden. In unserem Tierversuch wurde Sevofluran in unterschiedlichen Konzentrationen intramuskulär appliziert um zu testen, ob sich der Laktatwert in Abhängigkeit von der MH-Veranlagung verändert und eine Unterscheidung zwischen MHS- und MHN-Tieren erlaubt. Ziel war es, die erhobenen Daten auf eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen und diese mathematisch zu beschreiben.

In der Probandenstudie wurden bei 23 Freiwilligen (neun MHS-Patienten, sieben MHN-Patienten, sieben Kontrollpersonen) über Venenverweilkatheter Mikrodialysesonden mit Zuspritzschläuchen in den M. vastus lateralis eingeführt. An die Spitze der Messsonden wurden nach einer Äquilibrationsphase die Triggersubstanzen Halothan 6 Vol% (nur in der Kontrollgruppe), Halothan 4 Vol% und Koffein 80 mM lokal als Bolus von 200 µl über Zuspritzschläuche appliziert und die intramuskulären Laktatveränderungen im Dialysat photospektrometrisch gemessen. Sowohl nach Stimulation mit Koffein als auch mit Halothan 4 Vol% zeigten sich Maximalwerte der

Laktatkonzentrationen bei MHS-Patienten, die sich als signifikant höher als die der MHN- und Kontrollgruppe erwiesen. In der Kontrollgruppe wurde eine zusätzliche Messung mit einer Konzentration von Halothan 6 Vol% durchgeführt. Bei den Messungen wurden Werte erreicht, die für MHS-Patienten typisch sind.

Im Tiermodell wurden bei gleichem Versuchsaufbau Messsonden in den Adduktoren-muskeln der Hinterläufe von neun MHS- und sechs MHN-Pietrain-Schweinen platziert. Als Triggersubstanz wurde Sevofluran in den Konzentrationen 3, 7,5, 15 und 28 Vol% gelöst in Sojabohnenöl als Bolus von 100 µl appliziert. Die Laktat- und Pyruvatwerte sowie die Laktat-Pyruvat-Quotienten stiegen dosisabhängig an. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Maximalwerten der MHS- und MHN-Tiere.

Die Vitalparameter wurden in beiden Versuchen kontinuierlich überwacht und metabolische Parameter vor und nach den Untersuchungen bestimmt. Gravierende systemische oder lokale Nebenwirkungen traten weder bei den untersuchten Probanden noch bei den Versuchstieren auf.

Wie schon vorhergehende Untersuchungen belegen diese beiden Studien, dass die intramuskuläre Stimulation mit MH-Triggersubstanzen zu einer Veränderung der lokalen Stoffwechselforgänge mit signifikantem Laktatanstieg führt, welche bei MH-Prädisponierten stärker ausgeprägt ist als bei Gesunden. Koffein 80 mM und Halothan 4 Vol% ermöglichen eine sehr gute Differenzierung zwischen MHS- und MHN-Probanden. Eine zu hohe Konzentration an Triggersubstanz (Halothan 6 Vol%) ruft auch in nicht-veranlagten Patienten eine lokale, MH-ähnliche Reaktion hervor. In diesem Fall kann keine Unterscheidung zwischen MHS- und MHN-Individuen auf der Grundlage der Stoffwechselforgänge getroffen werden.

Bei der intramuskulären Applikation von Sevofluran ist eine Unterscheidung zwischen MHS- und MHN-Tieren über die resultierende Laktatkonzentration wiederum zu erreichen, so dass Sevofluran im Rahmen des Versuchsprotokolls als Ersatz für Halothan geeignet ist. Es ergibt sich eine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung für diese Substanz.

Die von uns erhobenen Daten zeigen, dass mittels des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Untersuchungsverfahrens eine zuverlässige Diagnostik einer MH-Veranlagung möglich ist. Das minimal-invasive Testverfahren könnte in naher Zukunft die heutige MH-Diagnostik ergänzen.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Gronert G, Pessah I, Muldoon S, Tautz T. Malignant Hyperthermia. In: Miller RD, ed. Miller's Anesthesia Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005:1169-90.
2. Gibson C. Meeting of the Surgical Section of the New York Academy of medicine *Jama* 1900;1685.
3. Burford G. Hyperpyrexia following anesthesia. A consideration of control of body temperature during anesthesia. *Anesthesiology* 1940;1:208-15.
4. Denborough MA, Forster JF, Lovell RR et al. Anaesthetic deaths in a family. *Br J Anaesth* 1962;34:395-6.
5. Harrison GG. Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br J Anaesth* 1975;47:62-5.
6. Ording H. Incidence of malignant hyperthermia in Denmark. *Anesth Analg* 1985;64:700-4.
7. Hartung E, Anetseder M, Olthoff D et al. [Regional distribution of predisposition to malignant hyperthermia in Germany: data in 1997]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1998;33:238-43.
8. Robinson R, Carpenter D, Shaw MA et al. Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* 2006;27:977-89.
9. Weiss RG, O'Connell KM, Flucher BE et al. Functional analysis of the R1086H malignant hyperthermia mutation in the DHPR reveals an unexpected influence of the III-IV loop on skeletal muscle EC coupling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1094-102.
10. Treves S, Anderson AA, Ducreux S et al. Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord* 2005;15:577-87.
11. Fujii J, Otsu K, Zorzato F et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 1991;253:448-51.
12. Harbitz I, Chowdhary B, Thomsen PD et al. Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11-q21 segment of chromosome 6. *Genomics* 1990;8:243-8.
13. Hayek SM, Zhu X, Bhat MB et al. Characterization of a calcium-regulation domain of the skeletal-muscle ryanodine receptor. *Biochem J* 2000;351:57-65.
14. Marx SO, Ondrias K, Marks AR. Coupled gating between individual skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors). *Science* 1998;281:818-21.

15. Klinker R. SS. Lehrbuch der Physiologie. 4.korrigierte Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003.
16. Fill M, Coronado R, Mickelson JR et al. Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophys J* 1990;57:471-5.
17. Adam H, Gottschaldt U, Pausch NC et al. [Fulminant MH crisis during the ninth general anaesthesia]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2007;42:692-9.
18. Roewer N. [Malignant hyperthermia today]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1991;26:431-49.
19. Anetseder M, Müller, C.R. . Maligne Hyperthermie. *Intensivmed* 2003;40:324-35.
20. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. The European Malignant Hyperpyrexia Group. *Br J Anaesth* 1984;56:1267-9.
21. Larach MG. Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. North American Malignant Hyperthermia Group. *Anesth Analg* 1989;69:511-5.
22. Ording H, Brancadoro V, Cozzolino S et al. 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.
23. Hopkins PM, Ellis FR, Halsall PJ. Ryanodine contracture: a potentially specific in vitro diagnostic test for malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 1991;66:611-3.
24. Gilly H, Musat I, Fricker R et al. Classification of malignant hyperthermia-equivocal patients by 4-chloro-M-cresol. *Anesth Analg* 1997;85:149-54.
25. Ruffert H, Olthoff D, Deutrich C, Froster UG. [Current aspects of the diagnosis of malignant hyperthermia]. *Anaesthesist* 2002;51:904-13.
26. Textor Z, Beer M, Anetseder M et al. Caffeine impairs intramuscular energy balance in patients susceptible to malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 2003;28:353-8.
27. Kozack JK, MacIntyre DL. Malignant hyperthermia. *Phys Ther* 2001;81:945-51.
28. Isaacs H, Badenhorst ME, Du Sautoy C. Myophosphorylase B deficiency and malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 1989;12:203-5.

29. Sim AT, White MD, Denborough MA. Effects of adenylate cyclase activators on porcine skeletal muscle in malignant hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 1987;59:1557-62.
30. von Breunig F, Wappler F, Hagel C et al. Histomorphologic examination of skeletal muscle preparations does not differentiate between malignant hyperthermia-susceptible and -normal patients. *Anesthesiology* 2004;100:789-94.
31. Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S. Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 2001;86:283-7.
32. Sawynok J. Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs* 1995;49:37-50.
33. Hleihel W, Talon S, Huchet-Cadiou C, Leoty C. Inhibition of caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release by adenosine in mammalian skinned slow- and fast-twitch fibres. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;364:259-68.
34. Su JY, Kerrick WG. Effects of halothane on Ca<sup>2+</sup>-activated tension development in mechanically disrupted rabbit myocardial fibers. *Pflugers Arch* 1978;375:111-7.
35. Tsuda Y, Mashimo T, Yoshiya I et al. Direct inhibition of the actomyosin motility by local anesthetics in vitro. *Biophys J* 1996;71:2733-41.
36. Blanck TJ, Gruener R, Suffecool SL, Thompson M. Calcium uptake by isolated sarcoplasmic reticulum: examination of halothane inhibition, pH dependence, and Ca<sup>2+</sup> dependence of normal and malignant hyperthermic human muscle. *Anesth Analg* 1981;60:492-8.
37. Medizinprodukte BfAu. Bekanntmachung des Erlöschens fiktiver Arzneimittelzulassungen nach § 105 Abs. 3 Satz 1 des Arzneimittelgesetzes (AMG) aufgrund bestimmter Vorschriften des 10. Änderungsgesetzes zum Arzneimittelgesetz (AMG- ÄndG). *Bundesanzeiger Nr. 2/, 2002:61 (Beilage)*.
38. Yasuda N, Targ AG, Eger EI, 2nd. Solubility of I-653, sevoflurane, isoflurane, and halothane in human tissues. *Anesth Analg* 1989;69:370-3.
39. Ducart A, Adnet P, Renaud B et al. Malignant hyperthermia during sevoflurane administration. *Anesth Analg* 1995;80:609-11.
40. Zhao F, Li P, Chen SR et al. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem* 2001;276:13810-6.
41. Lonroth P. Microdialysis--a new and promising method in clinical medicine. *J Intern Med* 1991;230:363-4.



42. Lonnroth P, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol* 1987;253:E228-31.
43. Ungerstedt U. Microdialysis--principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1991;230:365-73.
44. 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.
45. de Lange EC, Danhof M, Zurcher C et al. Repeated microdialysis perfusions: periprobe tissue reactions and BBB permeability. *Brain Res* 1995;702:261-5.
46. Shuaib A, Xu K, Crain B et al. Assessment of damage from implantation of microdialysis probes in the rat hippocampus with silver degeneration staining. *Neurosci Lett* 1990;112:149-54.
47. Imperato A, Di Chiara G. Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites. *J Neurosci* 1984;4:966-77.
48. Korth U, Merkel G, Fernandez FF et al. Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anesthesiology* 2000;93:1407-12.
49. Arner P, Bulow J. Assessment of adipose tissue metabolism in man: comparison of Fick and microdialysis techniques. *Clin Sci (Lond)* 1993;85:247-56.
50. Wang X, Stenken JA. Microdialysis sampling membrane performance during in vitro macromolecule collection. *Anal Chem* 2006;78:6026-34.
51. Tossman U, Ungerstedt U. Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta Physiol Scand* 1986;128:9-14.
52. Anetseder M, Hager M, Muller CR, Roewer N. Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test. *Lancet* 2002;359:1579-80.
53. Berman P, Tattersall M. Self-poisoning with intravenous halothane. *Lancet* 1982;1:340.
54. Schuster F, Scholl H, Hager M et al. The dose-response relationship and regional distribution of lactate after intramuscular injection of halothane and caffeine in malignant hyperthermia-susceptible pigs. *Anesth Analg* 2006;102:468-72.

55. Blanck TJ, Peterson CV, Baroody B et al. Halothane, enflurane, and isoflurane stimulate calcium leakage from rabbit sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 1992;76:813-21.
56. Hartung E, Anetseder M. Malignant Hyperthermia: The Standard In-Vitro Contracture Test. In: Schulte am Esch J. SJ, Wappler F. ed. Lengerich: Pabst Science Publishers, 2000.
57. Schuster F, Tas P, Muller R et al. Pharmacologic modulation of skeletal muscle metabolism: a microdialysis study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;98:372-6.
58. Metterlein T. Methodische Untersuchungen zur Entwicklung eines minimal-invasiven Tests für die Diagnostik einer Veranlagung zur Malignen Hyperthermie Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität, 2006.
59. Harwood TN, Nelson TE. Massive postoperative rhabdomyolysis after uneventful surgery: a case report of subclinical malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 1998;88:265-8.
60. Fiege M, Wappler F, Weisshorn R et al. Results of contracture tests with halothane, caffeine, and ryanodine depend on different malignant hyperthermia-associated ryanodine receptor gene mutations. *Anesthesiology* 2002;97:345-50.
61. Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1998.
62. Laurence AS. Serum myoglobin and creatine kinase following surgery. *Br J Anaesth* 2000;84:763-6.
63. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med* 2007;18:90-100.
64. Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 1997;49:1-51.
65. Mueller R, Anetseder, M., Hoyer A., Hartung E, Roewer N. Outcome evaluation of patients after muscle biopsy for malignant hyperthermia testing. *Anaesthesiology* 2000;93.
66. Chiari PC, Pagel PS, Tanaka K et al. Intravenous emulsified halogenated anesthetics produce acute and delayed preconditioning against myocardial infarction in rabbits. *Anesthesiology* 2004;101:1160-6.
67. Martin BJ, Valdivia HH, Bunger R et al. Pyruvate augments calcium transients and cell shortening in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1998;274:H8-17.

68. Pette D, Dolken G. Some aspects of regulation of enzyme levels in muscle energy-supplying metabolism. *Adv Enzyme Regul* 1975;13:355-77.
69. Snoeck MM, Gielen MJ, Tangerman A et al. Contractures in skeletal muscle of malignant hyperthermia susceptible patients after in vitro exposure to sevoflurane. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000;44:334-7.

## DANKSAGUNG

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Anetseder für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung während der Versuche und bei der Erstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Norbert Roewer, Direktor des Instituts für Anästhesiologie der Universität Würzburg danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt Herrn Dr. med. Frank Schuster für die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen Tipps und Aufmunterungen während der gesamten Promotion. Er stand mir jederzeit für Fragen und konstruktive Kritik zur Verfügung.

Herrn Dr. med. Thomas Metterlein danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen und die Hilfe bei der Auswertung der Daten.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Anästhesielabors und des Aufwachraums der Anästhesiologischen Klinik der Universität Würzburg.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder.  
Sie haben mich die ganzen Jahre hindurch ausnahmslos unterstützt und begleitet.  
Ohne Sie wäre ich heute nicht da, wo ich bin.  
Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name Sabrina Negele  
Geburtsdatum, -ort 06.11.1980 in Ingolstadt

## Studium der Humanmedizin

11/2008 Ärztliche Prüfung  
10/2004 – 11/2008 Klinisches Studium  
an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
08/2004 Ärztliche Vorprüfung  
08/2002 - 09/2004 Vorklinisches Studium  
an der Georg-August-Universität Göttingen

## Praktisches Jahr

04/2008 - 07/2008 PJ Innere Medizin am Juliusspital Würzburg  
12/2007 - 03/2008 PJ Anästhesiologie an der Universitätsklinik Würzburg  
08/2007 - 11/2007 PJ Chirurgie am Kantonsspital Olten, Schweiz

## Berufsausbildung und berufliche Tätigkeit

Seit 12/2008 Assistenzärztin Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg  
03/2002 - 07/2002 Tätigkeit als Rettungsassistentin, BRK Ingolstadt  
02/2001 - 03/2002 Ausbildung zur Rettungsassistentin  
Rettungsdienstschule Med-Ecole, Kiel  
10/2000 - 01/2001 Ausbildung zur Kinderkrankenschwester  
Berufsfachschule f. Kinderkrankenpflege, Neuburg/Donau

## Schulbildung

06/2000 Allgemeine Hochschulreife  
09/1991 - 06/2000 Apian-Gymnasium Ingolstadt  
09/1987 - 07/1991 Volksschule Vohburg

Würzburg, 27.11.2008

\_\_\_\_\_  
(Sabrina Negele)