

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

Verschiedene methodische Ansätze für einen metabolischen Test
zur Diagnose einer Maligne-Hyperthermie-Veranlagung in vivo:
Unterschiedliche Applikation der Triggersubstanz und Messung des
Stoffwechselprodukts über Mikroperfusion oder direkt im Muskel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Daniel Mathias Holzheid
aus Kolitzheim

Würzburg, im Mai 2007

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

Koreferent: Prof. Dr. med. N. Roewer

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04. April 2008

Der Promovend ist Arzt

Meiner Frau und meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE MALIGNEN HYPERTHERMIEN	1
1.2	OFFENE MIKROPERFUSION	6
1.3	CO ₂ -PARTIALDRUCKMESSUNG	8
1.4	FRAGESTELLUNG	9
2	METHODIK PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)	11
2.1	PROBANDEN	11
2.2	MATERIAL.....	11
2.3	VERSUCHSAUFBAU.....	14
2.4	FRAGEBOGEN	17
2.5	DATENVERARBEITUNG	18
2.6	STATISTIK	19
3	METHODIK PROTOKOLL 2 (DIREKT I.M.)	20
3.1	PROBANDEN	20
3.2	MATERIAL.....	20
3.3	VERSUCHSAUFBAU.....	21
3.4	FRAGEBOGEN, DATENVERARBEITUNG UND STATISTIK	23
4	ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)	24
4.1	CO ₂ -PARTIALDRUCK	24
4.2	WEITERE DATEN.....	30
5	ERGEBNISSE PROTOKOLL 2 (DIREKT I.M.)	37
5.1	CO ₂ -PARTIALDRUCK	37
5.2	WEITERE DATEN.....	41
6	DISKUSSION	47
6.1	METHODENKRITIK	47
6.2	ERGEBNISDISKUSSION.....	50

INHALTSVERZEICHNIS

6.3	SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT.....	53
6.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	54
7	ZUSAMMENFASSUNG	56
8	LITERATURVERZEICHNIS	58
9	ANHANG.....	63
	DANKSAGUNG	68
	CURRICULUM VITAE	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGS	Clinical Grading Scale
CK	Kreatinkinase
CO ₂	Kohlendioxid
DHPR	Dihydropyridin Rezeptor
EKG	Elektrokardiogramm
EMHG	European Malignant Hyperthermia Group
G	Gauge
IP ₃	Inositoltriphosphat
IVCT	In-vitro Kontrakturtest
K ⁺	Kalium
Mg ²⁺	Magnesium
MH	Maligne Hyperthermie
MHE	Maligne Hyperthermie equivocal
MHN	Maligne Hyperthermie negative
MHS	Maligne Hyperthermie susceptible
O ₂	Sauerstoff
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
VAS	Visuelle Analog Skala
Vol%	Volumenprozent

1 EINLEITUNG

1.1 Die Maligne Hyperthermie

1.1.1 Definition

Bei der Malignen Hyperthermie (MH) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Myopathie, der eine Störung des Kalziumstoffwechsels der quergestreiften Skelettmuskulatur zugrunde liegt. Während ohne den Einfluss von auslösenden Faktoren die Anlageträger klinisch meist unauffällig sind, kann die Exposition gegenüber volatilen Inhalationsnarkotika oder depolarisierenden Muskelrelaxantien eine lebensbedrohliche metabolische Entgleisung auslösen. Ursache ist die unkontrollierte Freisetzung von Kalziumionen in der Muskelzelle und die damit verbundene Kontraktion des Muskels und die Aktivierung des Stoffwechsels.

1.1.2 Historie und Epidemiologie

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde von GIBSON ein teilweise tödlich verlaufender Temperaturanstieg als postoperative Komplikation von Inhalationsnarkosen beschrieben.¹ Die möglicherweise erste Beschreibung von Fällen der Malignen Hyperthermie datiert HARRISON auf 1915.² DENBOROUGH und LOVELL erkannten und beschrieben 1960 die Maligne Hyperthermie als vererbbares Krankheitsbild.³

Die genetische Disposition tritt mit einer Prävalenz unabhängig von weiteren Faktoren wie Alter, Geschlecht oder Rasse von etwa 1:10.000 auf, die Inzidenz eines MH-bedingten Narkosezwischenfalls während einer Allgemeinanästhesie wird mit 1:20.000 angegeben.⁴ Die Angaben schwanken zwischen Inzidenzen von 1:25 bei Halothan-Succinylcholin-Narkosen bei Kindern bis 1:250.000.⁵ Die Letalität konnte durch die Einführung der Therapie mit Dantrolen durch HARRISON⁶ 1975 (Zulassung in Deutschland 1979) und durch die verbesserten Überwachungsmöglichkeiten während der Narkose auf heute unter 5 % gesenkt werden.

1.1.3 Elektromechanische Kopplung im Skelettmuskel

Durch die Interaktion des Neurotransmitters Acetylcholin mit der motorischen Endplatte wird an der Muskelzellmembran ein Aktionspotential generiert. Über das transversale System wird die Erregung bis zu den Triaden weitergeleitet, wo Plasmamembran und die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) in enger Beziehung zueinander stehen. Durch die Veränderung der Spannung kommt es zu einer Konformationsänderung des Dihydropyridinrezeptors (DHPR) der Plasmamembran. Vermittelt durch eine mechanische Kopplung öffnet sich auch der sarkoplasmatische Ryanodinrezeptor (RyR).^{7,8} Hierdurch strömen Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma ein. Bisher wurden drei Isoformen des RyR beschrieben. Im Skelettmuskel ist der RyR1 identifiziert worden,⁹ dessen Öffnung durch verschiedene exogene und endogene Liganden moduliert wird.⁸ Kalziumionen diffundieren in das Zytosol und binden an Troponin, wodurch die Bindungsstellen zwischen den kontraktilen Filamenten frei werden. Der Muskel kontrahiert. Die Kontraktion wird durch die Wiederaufnahme des Kalziums in das sarkoplasmatische Retikulum über einen ATP-abhängigen Kalziumkanal (Ca²⁺-ATPase Typ: SERCA 2) beendet.

1.1.4 Pathophysiologie der Malignen Hyperthermie

Mehr als 100 verschiedene Mutationen sind mit der Disposition zur Malignen Hyperthermie assoziiert, davon konnte mittels Zellkultur-Untersuchungen für bisher 28 Mutationen ein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden.¹⁰ Diese liegen meist auf dem Ryanodin-Rezeptor, einzelne Mutationen wurden auch auf dem Dihydropyridin-Rezeptor gefunden.^{11,8} Keine der einzelnen Mutationen kommt mit einer Prävalenz von mehr als 15 % vor.⁴ Die Mutation im RyR1 führt bereits ohne Exposition der auslösenden Substanzen zu einer erhöhten Empfindlichkeit des Kanals auf eine Spannungsänderung der Membran und somit zu einem erhöhten Einstrom von Kalziumionen in das skelettmuskuläre Zytoplasma.¹⁰ Wenn nun unter Exposition der Triggersubstanzen der durch den RyR vermittelte [Ca²⁺]-

Einstrom den Ausstrom in das SR massiv übersteigt, kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung der kontraktilen Einheiten in den Muskelzellen. Damit verbunden und zusätzlich durch das Kalzium vermittelt sind ein stark gesteigerter Stoffwechsel mit massiv erhöhtem Sauerstoffverbrauch sowie ein erhöhter Anfall saurer Stoffwechselprodukte und Kohlendioxid. Hieraus resultieren Muskelrigidität, intramuskuläre Hypoxie, Azidose, Hyperkapnie und Hyperthermie. Durch die Energiedepletion der Muskelzellen kommt es zum zellulären Ödem und zur Rhabdomyolyse.

Neben den bereits genannten Mechanismen der Kalziumfreisetzung sind weitere Stoffwechselwege in der Diskussion, am gesteigerten Kalziumeinstrom aus dem SR ins Zytosol beteiligt zu sein. Bei Patienten mit MH-Disposition ist der Botenstoff Inositoltriphosphat (IP₃) erhöht.⁵ Verknüpft mit dem IP₃-Stoffwechsel sind auch die Serotonin 2-Rezeptoren, für deren Agonisten im IVCT eine schnellere Kontrakturauslösung bekannt ist.¹² Am Schwein konnte ein Anstieg des freien Serotonins während einer MH-Krise nachgewiesen werden.⁵ Weiterhin scheint eine gestörte Mg²⁺ - Inhibition des RyR zur Kalziumfreisetzung beizutragen.¹³

Auch eine Beteiligung der Kalziumwiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum ist in der Diskussion.^{14, 15}

1.1.5 Klinik und Therapie

Bei der klinischen Ausprägung einer MH wird zwischen der fulminanten MH-Krise und abortiven Formen unterschieden. Erstere ist gekennzeichnet durch die sich schnell entwickelnde Muskelrigidität, Tachykardie, Hyperkapnie, Azidose und Hyperthermie. Hyperkapnie und Tachykardie gehen der Hyperthermie voraus. Frühwarnzeichen kann ein Masseterspasmus sein. Durch eine sympathoadrenerge Aktivierung kommt es zu Tachykardie, Anstieg des Herzzeitvolumens und somit zur massiven Steigerung des myokardialen Sauerstoffbedarfs. Herzrhythmusstörungen bis hin zum Herzkreislaufstillstand sind die Folge. Weiterhin entwickeln sich durch die Rhabdomyolyse eine Hyperkaliämie, Myoglobinämie und ein Anstieg der Kreatinkinase im Serum.

Sekundäre Komplikationen sind das akute Nierenversagen, das Hirnödem und die disseminierte intravasale Gerinnung.⁴

Abortive Formen verlaufen langsamer und zeigen nicht die volle Ausprägung aller Kardinalsymptome. Meist treten nur einzelne Symptome wie Tachykardie oder Hyperkapnie auf, die auf den gesteigerten Stoffwechsel hinweisen.

Bei Verdacht auf MH muss sofort die Therapie eingeleitet werden. Therapeutische Prinzipien sind die Beendigung der Zufuhr von Triggersubstanzen, die Gabe von Dantrolen, die ausreichende Oxygenierung und die Stabilisierung der Kreislauffunktion.

Therapiemaßnahmen im Einzelnen sind die Hyperventilation mit Steigerung des Atemminutenvolumens auf das 3-4 fache, die Beatmung mit reinem Sauerstoff, die Vertiefung der Narkose mit sicheren Substanzen wie Opioiden, Benzodiazepinen und nicht-depolarisierenden Muskelrelaxantien. Die schnelle pharmakologische Therapie mit Dantrolen in einer Dosierung von 2,5 mg/kg Körpergewicht intravenös ist von entscheidender Bedeutung. Die Dantrolentherapie wird auch nach Beendigung der akuten Symptomatik in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht/Tag weitergeführt. Weitere Pharmaka, die während einer MH-Episode zum Einsatz kommen, sind Natriumbikarbonat zum Ausgleich der Azidose, Sympathomimetika zur Kreislaufstabilisierung, Insulin-Glucose-Lösungen zum Ausgleich einer Hyperkaliämie und nur selten Antiarrhythmika. Der Initialtherapie sollte sich eine intensivmedizinische Überwachung mit engmaschigen Kontrollen aller relevanten Parameter anschließen.⁵

1.1.6 Diagnostik

Die Diagnose einer Disposition zur MH wird heute in der Regel mittels des In-vitro-Kontrakturtest (IVCT) nach Muskelbiopsie und in ausgewählten Fällen durch genetische Untersuchung gestellt. Eine „Clinical Grading Scale (CGS)“ zur Verifizierung einer MH-Episode posthoc wurde für die Indikationsstellung zur MH-Diagnostik vorgeschlagen, hat sich aber kaum durchgesetzt.¹⁶

Das Standardverfahren zur Diagnostik der Disposition zur MH ist der IVCT. Basierend auf Vorschlägen von KALOW¹⁷ und ELLIS¹⁸ wird er seit 1984 in allen europäischen MH-Zentren standardisiert nach dem Protokoll der „European Malignant Hyperthermia Group“ (EMHG) durchgeführt.¹⁹ Unter Lokal- oder Regionalanästhesie wird eine Muskelprobe aus der Oberschenkelmuskulatur entnommen. Präparierte Muskelbündel werden im Labor in eine Messeinrichtung eingespannt, vorgedehnt und in verschiedenen konzentrierten Halothan- und Koffeinlösungen inkubiert. Die Ruhespannung sowie die Kraft der Zuckungen nach elektrischer Auslösung der Kontraktion werden gemessen. Kommt es zu einer pathologischen Kontraktur ≥ 2 mN unter einer Inkubation in Halothan $\leq 0,44$ mM und Koffein ≤ 2 mM, so wird der Patient als MH positiv (MHS) klassifiziert. Ist nur ein genanntes Kriterium erfüllt, wird der Patient als fraglich positiv (MHE) bezeichnet. Beginnt die Entwicklung einer Kontraktur erst bei Konzentrationen $> 0,44$ mM für Halothan bzw. > 2 mM für Koffein ist der Patient MH negativ (MHN).²⁰ MHE-Patienten werden aus Sicherheitsgründen als positiv eingestuft. Die Spezifität dieses Verfahrens liegt bei 94 %, die Sensitivität bei 99 %.⁴ Um die Spezifität weiter zu verbessern wurden verschiedene weitere Substanzen, insbesondere Ryanodin und 4-Chloro-m-Kresol, zur Verwendung im IVCT vorgeschlagen. Mit letzt genannter Substanz konnte die Spezifität des IVCT auf 96 % angehoben werden.²¹ Auch die Kombination von Substanzen wurde untersucht.²² Die diagnostische Zuordnung der ca. 10% MHE-Patienten bleibt jedoch weiterhin schwierig.

Die genetische Untersuchung stellt die zweite wichtige Säule neben dem IVCT zur Diagnose einer MH-Veranlagung dar. Seit einigen Jahren steht damit ein nicht-invasives Testverfahren zur Verfügung. Auch für die genetische MH-Diagnostik gibt es Richtlinien der EMHG, welche zur Zeit 28 kausale Mutationen im RyR als diagnostisch relevant vorsehen.^{23,4} Ein negativer Vorhersagewert von 95% für die alleinige Mutationsanalyse ist unzureichend und daher sollte im Falle einer negativen Mutationsanalyse bei bekannter familiärer Belastung ein IVCT durchgeführt werden.²⁴

Weitere experimentelle Ansätze zur Diagnostik sind die Protonen-Freisetzung aus mit 4-Chlorokresol stimulierten Muskelfasern,²⁵ die Interleukin 1 β -

Freisetzung aus stimulierten B-Lymphozyten^{26,27} und der fluoreszenz-mikroskopische Kalziumnachweis in kultivierten und mit Halothan stimulierten Muskelzellen.²⁸

1.1.7 Pharmakologie von Koffein und Halothan

Das Methylxanthin Koffein führt zum einen über die Hemmung der Phosphodiesterase zu einer Erhöhung der Konzentration von zyklischem Adenosintriphosphat (cAMP) in der Zelle. Zweitens werden in niedriger Dosis Adenosin-Rezeptoren durch Koffein blockiert. Adenosin 1-Rezeptoren erhöhen durch Bindung an das inhibitorische G-Protein die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kalium-Kanälen im Gehirn. Adenosin 2-Rezeptoren steigern die Konzentration von cAMP.²⁹ Weiterhin hat Koffein direkten Einfluss auf den Ryanodinrezeptor RyR 1 und steigert dort direkt den Kalziumeinstrom in die Muskelzelle. In hohen Dosen führt Koffein allein zur Kontraktur des Muskels.²⁹

Das volatile Anästhetikum Halothan ist ein fluoriertes Alkan, welches 1965 als Anästhetikum eingeführt wurde und heute in Deutschland nicht mehr als Anästhetikum beim Menschen eingesetzt wird. Bei einem Siedepunkt von 50 °C liegt es bei Raumtemperatur noch flüssig vor und wird zur Narkose im Vapor verdampft.

Der Wirkungsmechanismus im zentralen Nervensystem, der zu den narkotischen Wirkungen führt, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Halothan zeigt gute hypnotische Eigenschaften bei nur schwacher Analgesie und Muskelrelaxation.³⁰

1.2 Offene Mikroperfusion

Die Mikroperfusion ist ein Verfahren, bei dem mittels zahlreicher makroskopisch sichtbarer Perforationen in der Größenordnung von 500 µm der freie Stoffaustausch durch eine Membran ermöglicht wird. Die Technik der offenen Mikroperfusion basiert auf Arbeiten von SKRABAL³¹ und TRAJANOSKI³² und bringt als Modifikation der bekannten Technik der Mikrodialyse verschiedene Vorteile: Im Vergleich zur Mikrodialyse kann die Mikroperfusion exakt die Verhältnisse im

Gewebe abbilden. Das Fehlen der Dialysemembran erlaubt auch den Übertritt großer Moleküle, die niedrige Flussrate ermöglicht die vollständige Äquilibration mit der interstitiellen Flüssigkeit, was aufwendige Nachberechnungen der Äquilibration (recovery) unnötig macht.³³ Das Einbringen der Trägerlösung und die Gewinnung der äquilibrierten Lösung erfolgt dabei mittels eines zweilumigen, außen perforierten Katheters. Über das distale Ende des inneren Lumens tritt die Perfusionslösung in das äußere Lumen aus und äquilibriert sich durch die makroskopischen Perforationen mit dem Interstitium. Aus dem äußeren Lumen wird mittels einer Peristaltikpumpe die Lösung gewonnen. Die Analyse der äquilibrierten Lösung erfolgt ex vivo in einem separaten Prozess. Den schematische Aufbau der offenen Mikroperfusion zeigt Abbildung 1.1

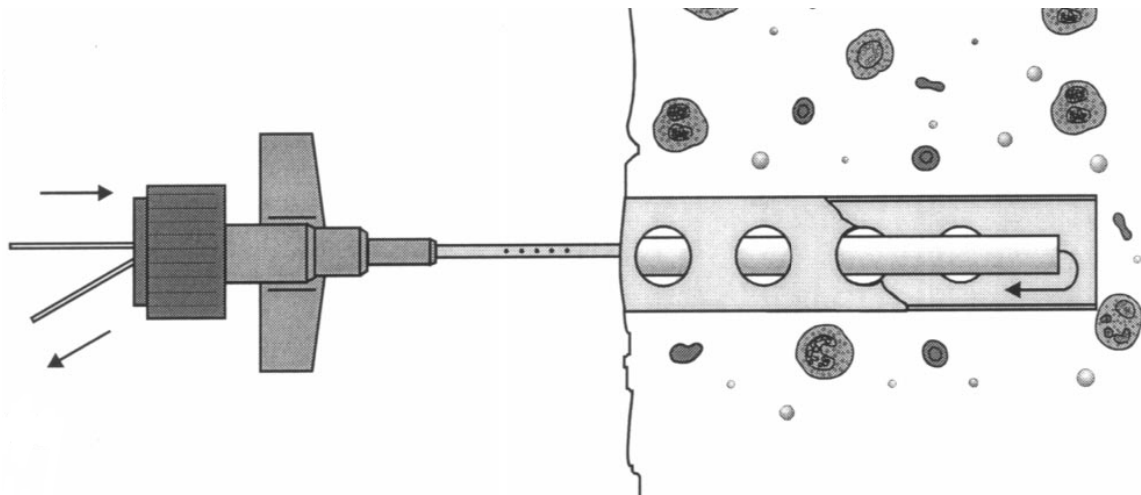


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der offenen Mikroperfusion³⁴

Die Technik der Mikroperfusion wird vor allem für die in vivo Messung von Stoffwechselprodukten verwendet. Nach den Arbeiten einer Arbeitsgruppe in Graz sind hier vor allem die Bestimmung der Gewebekonzentration von Laktat,³⁵ Glucose^{32,36} und Albumin³⁷ im Fett- und Muskelgewebe zu nennen.

In modifizierter Form beschreibt eine Arbeitsgruppe aus Graz die Verwendung der offenen Mikroperfusion als Hilfsmittel zur Gewinnung von interstitieller

Flüssigkeit und deren Analyse hinsichtlich verschiedener Stoffwechselprodukte. Für die vorliegende Arbeit stand von den genannten Vorteilen der Mikroperfusion vor allem die große, frei durchgängige Austauschfläche zwischen Kanülenlumen und Gewebe im Vordergrund. Die Technik der Injektion von Medikamenten zur Stimulation des Muskelstoffwechsels über diese Mikroperusionskanülen ist für die vorliegende Untersuchung neu entwickelt worden. Auch die Messung der Stoffwechselprodukte wie Kohlendioxid ist hierfür modifiziert worden. Im Gegensatz zur ex vivo Messung bei den bisherigen Anwendungsgebieten erfolgt die CO₂-Partialdruckmessung direkt in der Kanüle, also in vivo.

1.3 CO₂-Partialdruckmessung

Die Partialdruckmessung im Gefäßsystem dient zur kontinuierlichen Blutgasüberwachung. Über eine fiberoptische Messsonde mit verschiedenen fiberoptischen Fasern können kontinuierlich die Parameter pCO₂, pO₂, pH-Wert und Temperatur gemessen werden.

Hierzu sind die fiberoptischen Fasern mit einer perforierten Polyethylenhülle ummantelt und jede einzelne Messfaser mit einer chemischen Indikatorflüssigkeit gefüllt. Ein von einer Leuchtdiode ausgehender grüner Lichtstrahl fällt durch diese Indikatorflüssigkeit, dessen optischen Eigenschaften durch die zu messende Substanz verändert werden. Die CO₂-Messung funktioniert also nach dem optischen Absorptionsprinzip. Als Indikator wird Phenolrot gelöst in Natriumbikarbonatlösung verwendet.

CO₂ diffundiert in die Flüssigkeit, was über eine Änderung des pH-Wertes zu einer Verfärbung des Indikators führt. Der abgeschwächte Lichtstrahl wird an der Spitze der Sonde reflektiert. Zur Kontrolle der Messung wird intermittierend ein roter Lichtstrahl durch die Sonde geschickt, der durch den Indikator nicht verändert wird. Das rote Licht kann somit als Referenz für Änderungen der optischen Leitfähigkeit, die nicht durch die eigentlich zu messende Substanz bedingt sind, dienen. Das Verhältnis der gemessenen Intensität des grünen zu der des roten Lichtes ist somit das Maß für die CO₂-bedingte Lichtabsorption und somit für den Kohlendioxidpartialdruck.³⁸

1.4 Fragestellung

Der IVCT stellt seit langer Zeit das einzige sichere Diagnoseverfahren der Disposition zur Malignen Hyperthermie dar. Dennoch ist dieser Test technisch aufwendig und die ordnungsgemäße Durchführung stellt große Anforderungen an die Laboratorien. Weiterhin birgt das Verfahren als invasive Methode deutliche Risiken für den Patienten: Die häufigste Komplikation ist eine bleibende Parästhesie im Bereich der Narbe am Oberschenkel, daneben besteht das Risiko einer Wundheilungsstörung, einer Nachblutung oder einer Komplikation im Rahmen der Anästhesie, die durch eine Blockade des N. femoralis oder durch eine Allgemeinanästhesie ermöglicht wird. Zusätzlich ist eine Heilungsdauer von 10 – 20 d bis zur vollständigen Genesung nach der Biopsie zu verzeichnen.³⁹ Die genetische Diagnostik ist nur bei ca. 40% der MH-veranlagten Indexpatienten, bei denen eine kausale MH-Mutation gefunden wird, erfolgreich und ist auf absehbare Zeit als Screeningverfahren ungeeignet. Eine zusätzliche Alternative zur Diagnostik ist daher notwendig.

Nachdem in vorausgegangenen Studien das Prinzip der lokalen metabolischen Stimulation nachgewiesen werden konnte,⁴⁰ sollen nun in vorliegender Arbeit in zwei Protokollen verschiedene Modifikationen des Untersuchungsprotokolls auf Verbesserungen überprüft werden.

Bei der Auswertung der vorherigen Studien von ANETSEDER et al. zur minimal-invasiven Messung des Gewebepartialdruckes von Kohlendioxid⁴⁰ hat sich gezeigt, dass trotz sonographischer Kontrolle der Kanülenlage im Skelettmuskel die Ausbreitung und die Konzentration der frei in den Muskel injizierten Substanzen nicht sicher bestimmt werden konnte. Weiterhin hat durch den direkten Kontakt der empfindlichen Sonde mit der Muskulatur die Gefahr von bewegungsbedingten Artefakten bestanden. Also musste der Ausbreitungs- und Wirkungsbereich der Triggersubstanzen Koffein und Halothan genauer definiert werden. Gleichzeitig sollte aber der Stoffaustausch zwischen Messsonde und Gewebe, also der Muskulatur, nicht behindert sein.

Um diesen Forderungen gerecht zu werden, wurde für das Protokoll 1 (Mikroperfusion) eine stark modifizierte Version der Mikroperfusionsskanülen nach ELLMERER und SCHAUPP^{34,35} entwickelt und mit der Messsonde für den

1 EINLEITUNG

Kohlendioxidpartialdruck kombiniert. Die Injektion erfolgt dabei in die Kanüle. Die Triggersubstanz diffundiert aus der Kanüle in die Muskulatur und das entstehende Stoffwechselprodukt Kohlendioxid diffundiert in umgekehrter Richtung aus dem Muskel in die Kanüle. Die Messsonde liegt dabei in einem definierten Reaktionsraum und es liegen somit konstantere Bedingungen vor als bei freier Lage der Sonde im Muskel.

Im Protokoll 2 (direkt i.m.) wurde dagegen eine modifizierte Methode der direkten Injektion in die Muskulatur untersucht.

Protokoll 1 (Mikroperfusion)

- Injektion in die perforierte Kanüle
- Mehrere Injektionen pro Kanüle
- Halothan 10 Vol% und Koffein 80 mM

Protokoll 2 (direkt i.m.)

- Direkte Injektion in die Muskulatur
- Nur eine Injektion pro Kanüle
- Halothan 8 Vol% und Koffein 80 mM

Abb. 1.2 Die wichtigsten Merkmale der Protokolle 1 und 2 in der Gegenüberstellung

Besondere Fragestellungen waren hierbei:

- a) Kann eine gute Stimulation der CO₂-Produktion im Muskel mit dem Prototyp einer modifizierten Mikroperfusionsskanüle erreicht werden?
- b) Können mit diesen Verfahren MH-veranlagte und MH-nichtveranlagte Probanden unterschieden werden?
- c) Kann die Methodik der minimal-invasiven metabolischen Stimulation im Hinblick auf die Durchführbarkeit und die Standardisierbarkeit verbessert werden?
- d) Können die Ergebnisse früherer Studien zur lokalen CO₂-Produktion nach direkter intramuskulärer Bolusgabe von Halothan und Koffein bestätigt werden?

2 METHODIK PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

2.1 Probanden

Mit Zustimmung der örtlichen Ethikkommission wurden 8 MH-negative (MHN) und 8 MH-positive (MHS) Probanden untersucht. Bei allen Probanden war aus diagnostischen Gründen ein IVCT nach den Richtlinien der EMHG durchgeführt worden. Alle Probanden wurden vor der Untersuchung über mögliche Risiken aufgeklärt und erklärten schriftlich und mündlich ihr Einverständnis. Die Einschlusskriterien zur Studie sind in Abbildung 2.1 aufgeführt. Nachträglich wurde aus jeder Gruppe ein Proband ausgeschlossen, da eine nicht MH-assozierte Myopathie diagnostiziert wurde.

- Alter zwischen 18 und 65 Jahre
- Schriftliche Einverständniserklärung
- Keine bekannte weitere Myopathie
- Guter Allgemeinzustand (ASA-Klassifikation 1 oder 2)
- Vorherige eindeutige MH-Diagnostik als MHS oder MHN mittels IVCT

Abb. 2.1 *Einschlusskriterien*

2.2 Material

2.2.1 Mikroperfusionskanüle

Die Mikroperfusionskanülen wurden in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Laserzentrum Erlangen aus herkömmlichen extralangen peripheren Venenkathetern hergestellt (BECTON DICKINSON, Sandy, USA ; Angiocath1.7 x 83 mm, 16G).

Die Venenkatheter wurden am distalen Kanülenende mittels Excimer-Laser mit 100 Löchern von je 500 µm Durchmesser versehen (TUI-LASER, ExciStar M-

2 METHODIK PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

100), danach erfolgte zum besseren Abfluss der injizierten Substanzen am proximalen Ansatzstück eine Bohrung von 3mm Durchmesser (Abbildung 2.2).



Abb. 2.2 *Komplett bearbeitete Mikroperfusionskanüle*

Nach der Bearbeitung wurden die Kanülen im Auflichtmikroskop auf grobe Verunreinigungen und Beschädigungen geprüft und mögliche Fremdkörper im Kanülenlumen entfernt. In einem zweiten Schritt wurden die perforierten Kanülen im Ultraschallbad gereinigt. Um lipophile Verunreinigungen zu entfernen wurden die Katheter für fünf Minuten in einer Lösung aus 10 ml Seife und 1500 ml Aqua dest. bei 40 °C im Ultraschallbad eingelegt. Darauf folgte zur Reinigung von hydrophilen Fremdstoffen ein Bad mit 50 ml 96% Alkohol (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Deutschland) in 1500 ml Aqua dest. Zum Abschluss wurden die Kanülen für fünf Minuten in reinem Aqua dest. im Ultraschallbad von möglichen Alkohol- oder Spülmittelresten gereinigt. Die Mikroperfusionskanülen wurden mittels Stickstoff-Flow getrocknet, in Sterilpapier eingeschweißt und mit Ethylenoxid gassterilisiert.

2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Die Injektion der Triggersubstanzen in die Mikroperfusionskanüle erfolgte mittels einer Mikrospritzenpumpe (PHD 2000 Programmable, HARVARD APPARATUS, Holiston, USA) mit kompatiblen 1 ml-Spritzen (BECTON DICKINSON, Sandy, USA). Daran konnektiert wurden zur Injektion der Triggersubstanzen Spinalkatheter der Größe G27 x 90 cm (PAJUNK, Gelsingen, Deutschland). Der Totraum der G27-Katheter beträgt 120 µl.

Mittels eines zweiarmigen rotierenden hämostatischen Ventils (GUIDANT, Santa Clara, USA) wurde der Zuspritzkatheter als auch die Messsonde in der Mikroperfusionskanüle platziert. Als Führung während des Zusammenbaus unter sterilen Bedingungen unmittelbar vor Platzierung dienten handelsübliche Venenverweilkanülen der Größe G14 (Insyte, BECTON DICKINSON, Sandy, USA). Zur Messung des Kohlendioxidpartialdruckes wurde ein Blutgasmonitor (Trendcare TCM 6000 Monitor, DIAMETRICS MEDICAL, Roseville, USA) mit den passenden Messsonden (Paratrend 7+ Multiparametersensor, DIAMETRICS MEDICAL, Roseville, USA) verwendet. Die Sonden wurden vor Versuchsbeginn mit genormten CO₂ -Konzentrationen im Kalibriergerät (DIAMETRICS MEDICAL, Roseville, USA) kalibriert. Die korrekte intramuskuläre Position der Kanülen wurde mit einem Ultraschallgerät (180 plus SONOSITE, Bothell, USA) kontrolliert. Die Daten wurden während der Messung minütlich über Windows Hyperterminal[®] erfasst.

2.2.3 Substanzen

Halothan Eurim (Eurim Pharm, Piding, Deutschland) wurde mit Lipofundin 20% N (B.Braun, Melsungen, Deutschland) kurz vor Beginn der Untersuchung auf einen Volumenanteil von 10 Vol% (2 ml auf 20 ml) verdünnt. Hierzu wurden 18ml Lipofundin unter sterilem Vorgehen in einen Erlmeyerkolben gegeben, 2ml Halothan zugesetzt und durch Schütteln in Lösung gebracht.

Für die Koffeinlösung wurde Koffein (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) mit Ringerlösung (DELTA PHARMA, Pfullingen, Deutschland) auf eine Konzentration von 80 mmol/l verdünnt, die Konzentration photometrisch überprüft und die Lösung sterilfiltriert. Zum Spülen des Messsystems wurde Ringerlösung (DELTA PHARMA, Pfullingen, Deutschland) verwendet.

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Vorbereitung und Überwachung der Probanden

Die Probanden wurden ambulant auf der perioperativen Anästhesiestation der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Würzburg aufgenommen. Während der Untersuchung wurden kontinuierlich die Sauerstoffsättigung und die Herzfrequenz aufgezeichnet sowie der Blutdruck 15-minütlich gemessen. Die Probanden erhielten einen venösen Zugang. Blut wurde vor und nach der Untersuchung zur Kontrolle der Kreatinkinase (CK) und Myoglobin abgenommen. Das zu untersuchende Bein wurde in einer Beinschiene gelagert. Nach Hautdesinfektion mit Alkohol (Cutasept, BOBE, Hamburg, Deutschland) und falls nötig Rasur erfolgte die Lokalanästhesie mit 10 ml Mepivacain 1% (Scandicain[®], ASTRA ZENECA, Wedel, Deutschland) und die sterile Abdeckung mittels Lochtuch. Schmerzen während der Untersuchung wurden nach dem Einstechen der Kanülen sowie nach jeder Injektion mittels Visueller–Analog-Skala (VAS) quantifiziert und dokumentiert.

2.3.2 Aufbau

Die Haut über dem M. vastus lateralis wurde mit einer Lanzette circa 2 mm weit angeritzt und die perforierten Kanülen unter sterilen Kautelen mit dem Stahlmandrin im 30 Grad Winkel zur Haut nach kranial eingestochen und ungefähr 4 cm vorgeschoben. Der Mindestabstand zwischen den zwei eingestochenen Kanülen wurde auf 2 cm festgelegt. Nach sonographischer Kontrolle der intramuskulären Lage des perforierten Abschnitts der Kanüle wurde der Mandrin entfernt. Die Bohrung am Ansatzstück zeigte nach unten. In dieser Position wurden die Kanülen mit einem sterilen Pflaster (Cutiplast, SMITH & NEPHEW, Hull, Großbritannien) fixiert. Zur Kontrolle der Längeneinstellung vor Platzierung der Sonde wurde an das hämostatische Ventil eine weitere perforierte Kanüle konnektiert. Durch einen Schenkel des Ventils wurde der Spinalkatheter eingeführt, bis kurz vor die Spitze der Kanüle vorgeschoben und arretiert. Durch den zweiten Schenkel des Ventils wurde die kalibrierte Messsonde bis etwa 2 cm proximal der Spinalkatheterspitze vorgeschoben und

die fertig zusammengesetzte Messeinrichtung in die im Muskel liegende Kanüle eingeführt. Der Messbereich der Sonde lag also innerhalb der Kanüle im Bereich der Perforationen. Eine schematische Darstellung der gesamten Messeinrichtung nach Platzierung in die perforierten Kanülen zeigt Abbildung 2.3.

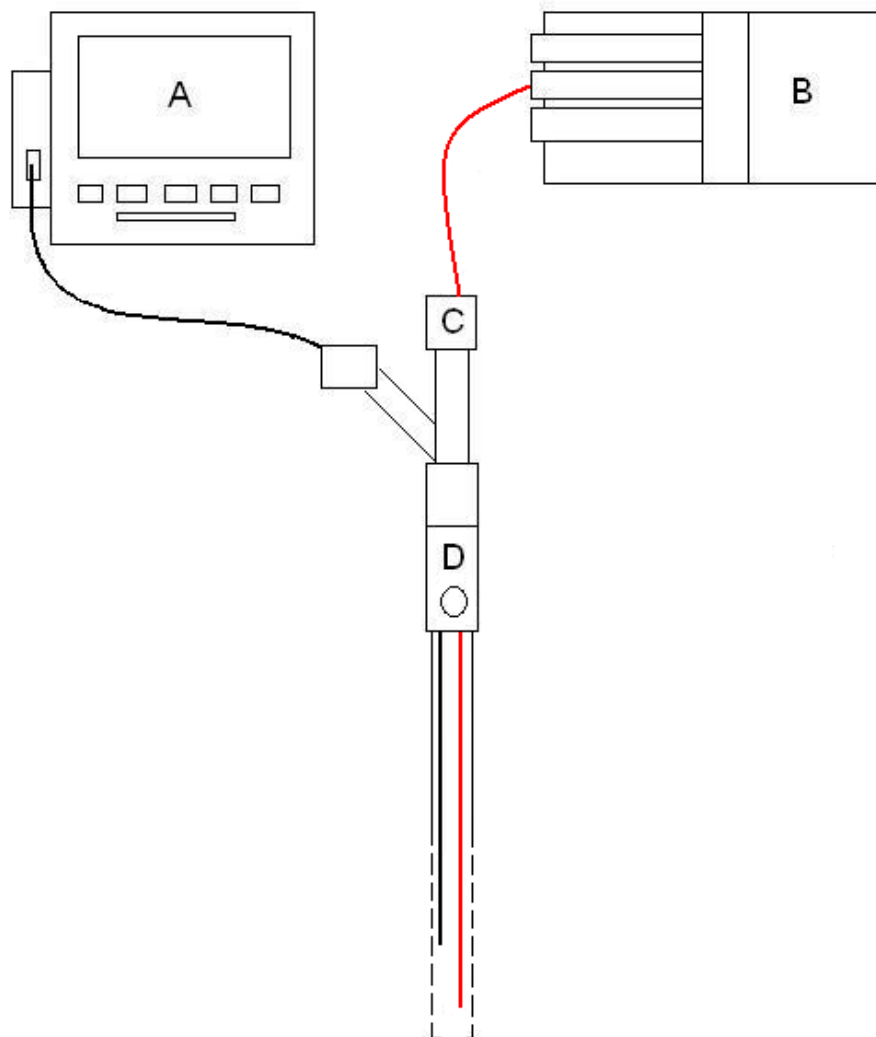


Abb. 2.3 Schematischer Aufbau der Messeinrichtung; A Trendcare Monitor, B Mikrospritzenpumpe, C Hämostatisches Ventil, D Perforierte Kanüle

2.3.3 Ablauf

Unmittelbar nach Einführen der Messsonde wurde die perforierte Kanüle mit 500 µl Ringer-Lösung mit einer Flussrate von 250 µl/min gefüllt. Als Zeichen der korrekten Lage und Funktion der Sonde fiel der Kohlendioxidpartialdruck nach Injektion raumluftäquibrierter Ringer-Lösung kurzfristig steil ab, bevor ein stabiler Ausgangswert erreicht wurde. Dieser war als eine Abweichung vom Mittelwert < 1,5 mmHg innerhalb von 10 min definiert.

Jetzt wurden über 2 min in eine Kanüle 500 µl Koffein 80 mmol/l, in die zweite Kanüle 500 µl Halothan 10 Vol% injiziert. Die Kanülen wurden in der Dokumentation je nach Reihenfolge der Injektionen als Kanüle „Halothan“ bei initialer Injektion von Halothan beziehungsweise als Kanüle „Koffein“ bezeichnet. Nach Erreichen des Maximums, frühestens nach 30 Min, wurden beide Kanülen mit 500 µl Ringerlösung gespült, wonach wieder ein stabiles Ausgangsniveau erreicht wurde. Hierauf erfolgte die Injektion der Trigger seitenvertauscht. Nach Erreichen und Überschreiten des Maximalwertes wurde die Untersuchung beendet. Die Mindestmessdauer insgesamt betrug 90 min plus die Zeit zum Platzieren der Kanülen und die Dauer der Äquibrierung nach der ersten Spülung (Abbildung 2.4)

Kanüle „Halothan“	Kanüle „Koffein“
Platzierung der Kanülen	Platzierung der Kanülen
Ringerlösung	Ringerlösung
Abwarten des Ausgangswertes	Abwarten des Ausgangswertes
Halothan 10 Vol%	Koffein 80 mmol/l
Abwarten des Maximums	Abwarten des Maximums
Ringerlösung	Ringerlösung
Abwarten des Ausgangswertes	Abwarten des Ausgangswertes
Koffein 80 mmol/l	Halothan 10 Vol%
Abwarten des Maximums	Abwarten des Maximums

Abb. 2.4 Zeitlicher Ablauf und Injektionsabfolge

2.3.4 Entfernung der Katheter und Wundversorgung

Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Katheter zusammen mit der Messeinrichtung entfernt und auf Vollständigkeit überprüft. Die Einstichstellen wurden mit Klammerpflastern (Leukostrip, SMITH & NEPHEW, Hull, Großbritannien) versorgt, steril abgedeckt und ein Kompressionsverband am Oberschenkel angelegt.

2.4 Fragebogen

Vier Wochen nach der Untersuchung wurde zur Qualitätssicherung die Patientenzufriedenheit und der Verlauf der Untersuchung mittels Fragebogen erhoben. Hierbei konnten sowohl die Akzeptanz des Verfahrens bei den Probanden als auch mögliche Nebenwirkungen der Untersuchung erfasst werden. Der verwendete Fragebogen ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

Fragebogen zur Verträglichkeit der Untersuchung zur MH-Disposition mittels Partialdruckmessung für Frau / Herrn

Bitte bewerten Sie die folgenden Fragen auf einer Skala von 0 bis 10, wobei 0 am wenigsten bzw. besten und 10 am stärksten bzw. schlechtesten ist.

(zum Beispiel: Schmerzen nach der Untersuchung)

wenig 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 stark)

1. Waren Sie mit dem gesamten Verlauf der Untersuchung zufrieden?

zufrieden 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 unzufrieden

2. Fühlten Sie sich im Vorfeld vor dem Untersuchungstag ausreichend informiert?

gut 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 schlecht

3. Wie empfanden Sie die Betreuung während der Untersuchung?

gut 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 schlecht

4. Hatten Sie Schmerzen

- beim Legen bzw. Entfernen der Kanüle in der Ellenbeuge?

wenig 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 stark

- bei der örtlichen Betäubung?

wenig 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 stark

- beim Einstechen der Messkatheter im Bein?

wenig 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 stark

- nach dem Spritzen der Medikamente im Bein?

wenig 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 stark

- direkt nach Entfernung der Messkatheter im Bein?	wenig	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 9 <input type="checkbox"/> 10	stark
- am selben Tag nach Untersuchung?	wenig	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 9 <input type="checkbox"/> 10	stark
- am Tag nach Untersuchung?	wenig	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 9 <input type="checkbox"/> 10	stark
5. Wie stark fühlten Sie sich am Tag nach der Untersuchung noch bei Ihrer täglichen Beschäftigung beeinträchtigt?	wenig	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 9 <input type="checkbox"/> 10	stark
6. Wie verlief die Wundheilung an den Einstichstellen der Nadeln?			
a) Rötung?	wenig	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 9 <input type="checkbox"/> 10	stark
b) Bluterguss?	wenig	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 9 <input type="checkbox"/> 10	stark
7. Wie viele Tage hat Sie die Untersuchung durch Schmerzen etc. beeinträchtigt?		Tage
8. Wie würden Sie die Schmerzen während der Untersuchung beschreiben?			keine Schmerzen, spitz, kurz einschließend, krampfartig, stumpf
9. Wie lange hielten die durch das Spritzen der Medikamente erzeugten Schmerzen an?		min
10. Nach wie vielen Tagen waren die Einstichstellen verheilt?		Tage
11. Wie entscheiden Sie, wenn Sie noch einmal die Wahl hätten zwischen Muskelbiopsie oder diesem neuen Verfahren mittels Messkatheter.			Muskelbiopsie oder neues Verfahren mit Messkatheter
12. Für weitere Kommentare, Meinungen und Anregungen sind wir Ihnen sehr dankbar. Bitte benutzen Sie hierfür die Rückseite.			Herzlichen Dank für Ihre Mühen

Abb. 2.5 Fragebogen zur Qualitäts- und Verlaufskontrolle

2.5 Datenverarbeitung

Die mittels TrendCare Monitor gemessenen Daten wurden an einem tragbaren Computer mit Windows Hyperterminal[®] aufgezeichnet. Alle erhobenen Daten wurden in einer Access-Datenbank gespeichert und mit Microsoft Excel grafisch und statistisch weiterverarbeitet.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Excel 2000 und WinStat für Windows durchgeführt. Die Daten wurden als nicht-normalverteilt angenommen und werden als Median mit Quartilen dargestellt. Unterschiede zwischen den zwei diagnostischen Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test statistisch analysiert. Für die statistische Berechnung wurde zum einen der Median aus den erreichten absoluten Maxima herangezogen. Diese sind unabhängig von der Zeit von Injektion bis zum Erreichen des Maximums. Weiterhin wurde jeweils die maximale Steigung als Funktion der erreichten Maxima und der bis zum Erreichen benötigten Zeit errechnet und auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Laborwerte vor und nach der Untersuchung wurden mit dem Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3 METHODIK PROTOKOLL 2 (DIREKT I.M.)

3.1 Probanden

Das Protokoll 2 (direkte intramuskuläre Injektion) schließt 9 MH-positive und 8 MH-negative Probanden ein. Es lag für alle Probanden das Ergebnis eines IVCT vor und zusätzlich wurde eine kausale MH-Mutation nachgewiesen (MHS) oder ausgeschlossen (MHN) (Abb. 3.1). Die Einschlusskriterien entsprechen den im Protokoll 1 dargestellten.

Proband	Diagnose	Mutation	Proband	Diagnose	Mutation
144	MHN	C6617T neg.	146	MHS	C6617T
145	MHN	C6617T neg.	147	MHS	C1840T
148	MHN	C1840T neg.	149	MHS	G7300A
150	MHN	C1840T neg.	151	MHS	G7300A
153	MHN	C6617T neg.	152	MHS	C1840T
156	MHN	G7300A neg.	154	MHS	G7300A
157	MHN	C1840T neg.	155	MHS	G7300A
160	MHN	C6617T neg.	158	MHS	C6617T
			159	MHS	C6617T

Abb. 3.1 Ausgeschlossenen bzw. nachgewiesene Mutationen bei den Probanden im Protokoll 2

3.2 Material

3.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Für die Injektion der Triggersubstanzen wurde eine Mikrospritzenpumpe (PHD 2000 Programmable, HARVARD APPARATUS, Holiston, USA) mit kompatiblen 1 ml-Spritzen (BECTON DICKINSON, Sandy, USA) verwendet. Daran konnektiert wurden Spinalkatheter der Größe G27 x 90 cm (PAJUNK, Gelsingen, Deutschland) mit einem Totraum von 120 µl.

Durch ein zweiarmiges rotierendes hämostatisches Ventil (GUIDANT, Santa Clara, USA) wurden der Zuspritzkatheter und die Messsonde zusammengeführt. Zum Einbringen der Messsonde in den Muskel wurden Insyte Venenkatheter der Größe G18 von BECTON DICKINSON verwendet.

Zur Messung des Kohlendioxidpartialdruckes kam der Blutgasmonitor Trendcare TCM 6000 Monitor (DIAMETRICS MEDICAL, Roseville, USA) mit dem Neotrend Multiparametersensor (DIAMETRICS MEDICAL, Roseville, USA) zum Einsatz. Der Sensor wurde vor Versuchsbeginn mit genormten CO₂ - Konzentrationen im Kalibriergerät (DIAMETRICS MEDICAL, Roseville, USA) kalibriert. Die korrekte Lage der Kanülen wurde sonographisch (Sonosite Ultraschallgerät 180 plus SONOSITE, Bothell, USA) kontrolliert. Die Datenerfassung erfolgte während der Messung minütlich über Windows Hyperterminal[®].

3.2.2 Substanzen

2ml Halothan (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Deutschland) wurden unter sterilen Bedingungen mit 23ml Lipofundin 20% N (B.BRAUN, Melsungen, Deutschland) auf einen Volumenanteil von 8 Vol% verdünnt und durch Schütteln in Lösung gebracht.

Koffein (80 mmol/l) und Ringerlösung wurden analog dem Protokoll 1 hergestellt.

3.3 Versuchsaufbau

3.3.1 Vorbereitung und Überwachung der Probanden

Die Vorbereitung und Lagerung der Probanden und die Überwachung und Aufzeichnung der Vitalfunktionen unterschied sich nicht vom Protokoll 1.

3.3.2 Aufbau

Zwei G18-Venenverweilkanülen wurden unter sonographischer Kontrolle im Abstand von mindestens 2 cm steril in den M. vastus lateralis platziert, der Mandrin zurückgezogen und die Kanülen fixiert. Eine weitere sterile G18-Venenverweilkanüle wurde zur Längenkontrolle an das zweiarmige hämostatische Ventil konnektiert, der G27-Zuspritzkatheter vorgeschoben und

in einer Position etwa 2 cm distal der Kanülenspitze arretiert. Über den zweiten Anschluss des Ventils wurde die kalibrierte Trendcaresonde bis 3 mm distal des G27-Katheters vorgeschoben. Die zusammengesetzte Messeinrichtung konnte nun in die in der Muskulatur liegende Kanüle eingeführt werden, bis Widerstand spürbar war. Jetzt wurde die G18-Führungskanüle über die Sonde und den Spinalkatheter zurückgezogen, so dass Katheter und Messsonde frei im Muskel zu liegen kamen.

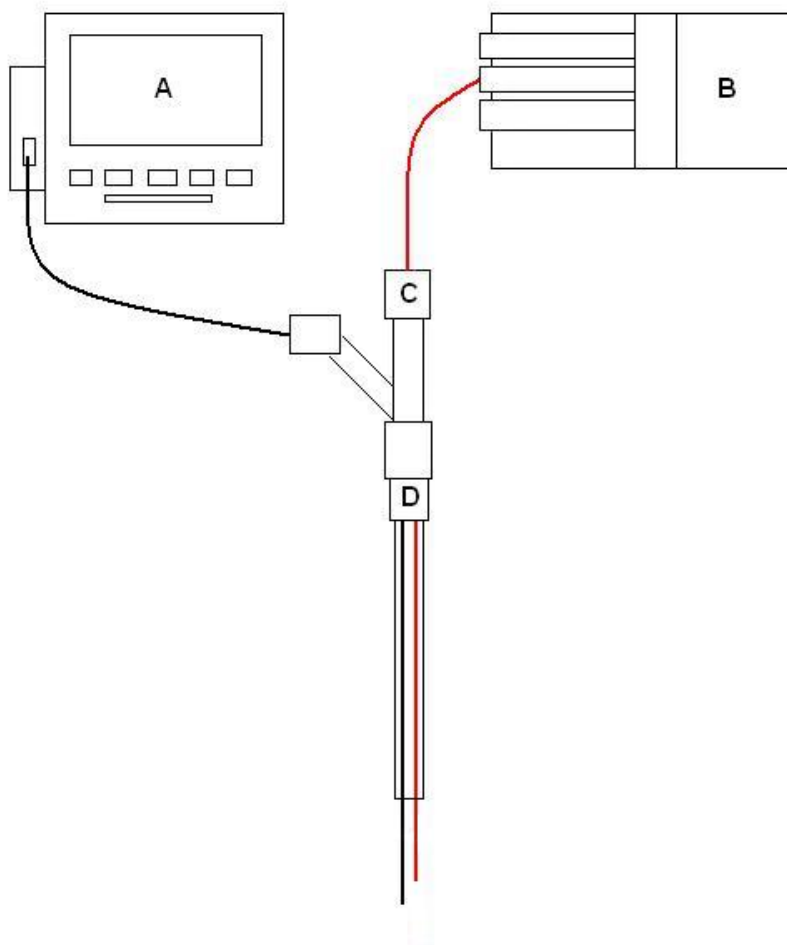


Abb. 3.2 Schematischer Aufbau der Messeinrichtung 2; A Trendcare Monitor, B Mikrospitzenpumpe, C Hämostatisches Ventil, D G18-Kanüle

3.3.3 Ablauf

Das System wurde mit 320 µl Ringerlösung mittels Perfusor über 1 min gefüllt. Nach Abzug des Totraums des Katheters von 120 µl wurden so 200 µl in die

Muskulatur appliziert. Nach Einstellung eines stabilen Ausgangswertes im Bereich physiologischer CO₂ -Werte erfolgte gleichzeitig in eine Kanüle die Injektion von Halothan 8 Vol%, in die andere Koffein 80 mmol/l. Das Volumen betrug hierbei 320 µl. Der Kohlendioxidpartialdruck wurde aufgezeichnet und die Untersuchung nach Erreichen der maximalen Steigung, frühestens aber nach 30 min beendet. Den zeitlichen Ablauf des Protokolls 2 gibt Abbildung 3.3 wieder.

Kanüle „Halothan“	Kanüle „Koffein“
Platzierung der Kanülen	Platzierung der Kanülen
Ringerlösung	Ringerlösung
Abwarten des Ausgangswertes	Abwarten des Ausgangswertes
Halothan 8 Vol%	Koffein 80 mmol/l
Abwarten des Maximums	Abwarten des Maximums

Abb. 3.3 *Zeitlicher Ablauf und Injektionsabfolge des Protokolls 2*

3.3.4 Entfernung der Katheter und Wundversorgung

Die Sonden wurden am Versuchende entfernt, die Einstichstellen mit sterilen Pflastern (Cutiplast, SMITH & NEPHEW, Hull, Großbritannien) versorgt und ein Kompressionsverband angebracht.

3.4 Fragebogen, Datenverarbeitung und Statistik

Auch im Protokoll 2 wurde den Probanden vier Wochen nach der Untersuchung ein Fragebogen zur Erfassung möglicher Nebenwirkungen zugestellt.

Die Datenerfassung und Verarbeitung sowie die statistische Auswertung erfolgten wie im Protokoll 1 angegeben.

4 ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

4.1 CO₂-Partialdruck

4.1.1 CO₂-Partialdruck nach Stimulation mit Halothan

Für die Stimulation mit Halothan bestehen zwei Messreihen. Zuerst werden die Ergebnisse für die initiale Injektion von Halothan gezeigt, dann die Daten für die Stimulation mit Halothan nach initialer Injektion von Koffein und konsekutiver Spülung.

Die im Text angegebenen Mediane errechnen sich aus den individuell erreichten absoluten Maximalwerten, unabhängig von der Dauer bis zum Erreichen dieses Maximums.

Die Injektion der Triggersubstanzen erfolgte zum Zeitpunkt 5 min in der Grafik . Durch den Verdünnungseffekt an der Messsonde fielen die Kohlendioxidwerte erst steil ab, um dann je nach Aktivierung des Muskelstoffwechsels wieder anzusteigen.

Für die initiale Injektion von Halothan unterschieden sich die beiden Gruppen hinsichtlich des Ausgangspunktes vor Injektion nicht (MHS 44 [42; 45] mmHg gegen MHN 40 [37; 46] mmHg) und die MH-positive Gruppe zeigte ein signifikant höheres Maximum des CO₂-Partialdruckes nach Injektion im Vergleich zur MHN-Gruppe. Die Maximalwerte betragen 79 [74; 92] mmHg für die MHS-Gruppe und 50 [45; 64] mmHg für die MHN-Gruppe (Abb. 4.1). Der Zeitverlauf der CO₂-Werte ist in Abb. 4.2 dargestellt.

4 ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

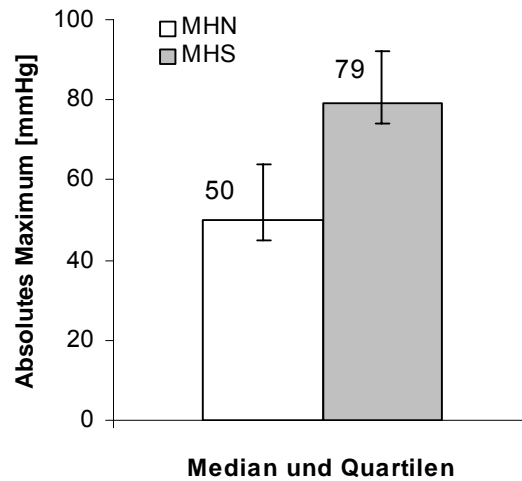


Abb. 4.1 Absolute $p\text{CO}_2$ -Maxima für die initiale Stimulation mit Halothan 10 Vol%. $p < 0,05$. MHN $n=7$, MHS $n=7$

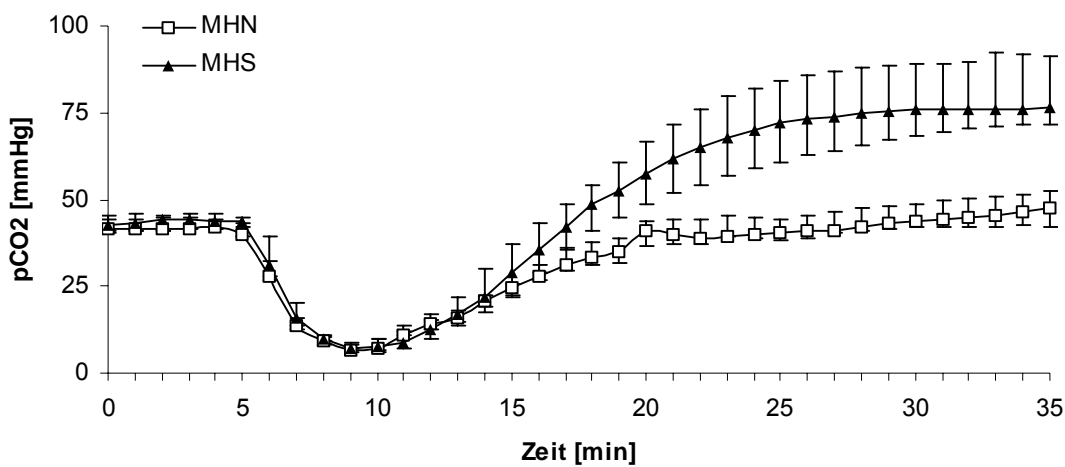


Abb. 4.2 $p\text{CO}_2$ -Verlauf für die initiale Stimulation mit Halothan 10 Vol% zum Zeitpunkt 5 min. Daten als Median und Quartilen. MHN $n=7$, MHS $n=7$

Bei der Injektion von Halothan nach Koffein und Ringerlösung unterschieden sich die Gruppen bezüglich des Ausgangswertes vor Injektion (MHN 37 [36; 40] und MHS 43 [42; 44]), jedoch zeigte sich im Verlauf ein signifikant höheres

4 ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

Maximum der MHS-Gruppe (MHS 84 [78; 91] gegen MHN 66 [58; 68]; $p < 0,05$).
Der Zeitverlauf ist in Abbildung 4.4 angegeben

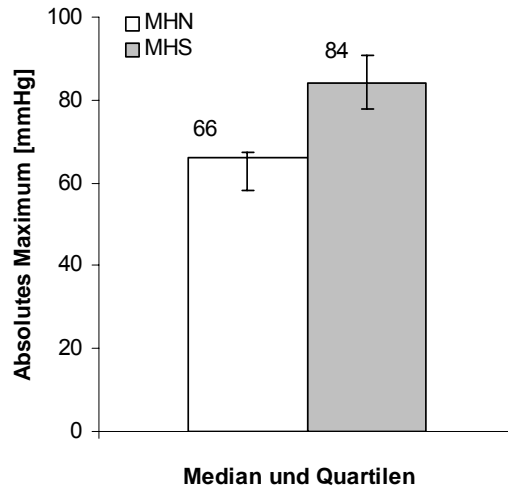


Abb. 4.3 Absolute $p\text{CO}_2$ -Maxima für die Stimulation mit Halothan 10 Vol% nach Vorinjektion von Koffein und Ringerlösung. $p < 0,05$. MHN $n=7$, MHS $n=7$

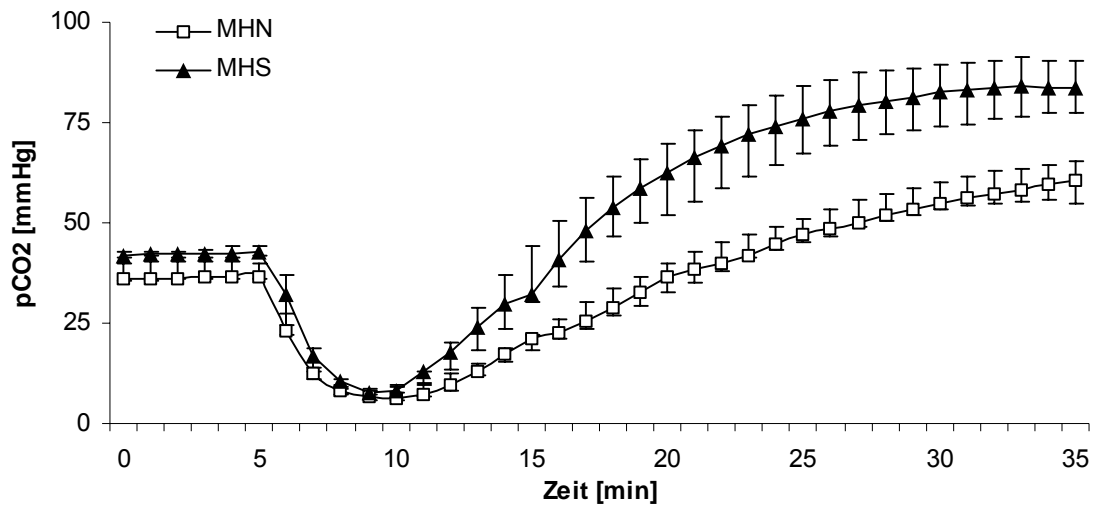


Abb. 4.4 $p\text{CO}_2$ -Verlauf für die Stimulation mit Halothan 10 Vol% zum Zeitpunkt 5 min nach Vorinjektion von Koffein und Ringerlösung. Daten als Median und Quartilen. MHN $n=7$, MHS $n=7$

4.1.2 Maximale Steigung nach Stimulation mit Halothan

Neben den absoluten Maxima wurde bei auch die Steigung berechnet, die auch die Zeit bis zum Erreichen des Maximums berücksichtigt.

Nach initialer Halothanexposition konnte für die Gruppe MHN eine Steigung von 21 [-1; 35] mmHg/h und für die Gruppe MHS eine maximale Steigung von 91 [69; 126] mmHg/h errechnet werden (Abbildung 4.4). Die Gruppen unterschieden sich signifikant.

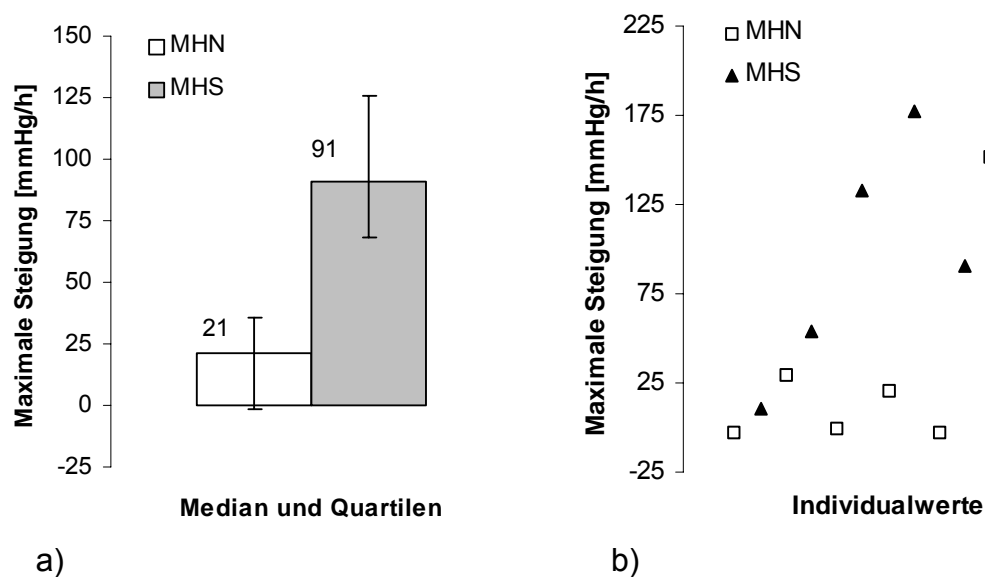


Abb. 4.5 a) Maximale Steigung für die initiale Stimulation mit Halothan 10 Vol%. Daten als Median und Quartilen. $p < 0,05$. MHN $n=7$, MHS $n=7$
 b) Individualwerte.

Für die Injektion von Halothan 10 Vol% nach Koffein und Spülung mit Ringerlösung konnten folgende signifikant unterschiedlichen ($p < 0,05$) Steigungen errechnet werden: MHN 47 [34; 58] mmHg/h und MHS 100 [82; 124] mmHg/h (Abbildung 4.3).

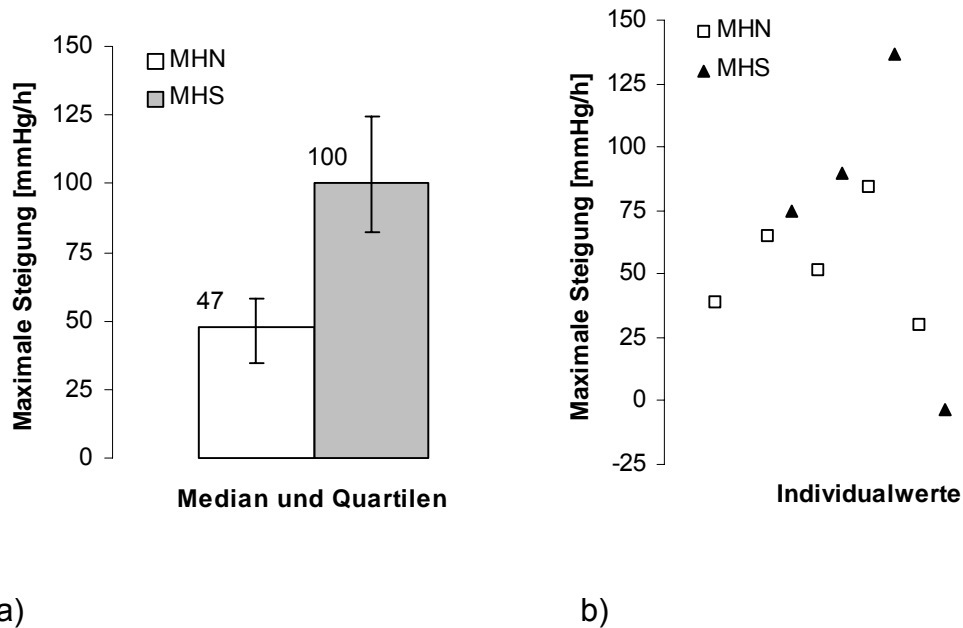


Abb. 4.6 a) Maximale Steigung für die Stimulation mit Halothan 10 Vol% nach Vorinjektion von Koffein und Ringerlösung. Daten als Median und Quartilen. $p < 0,05$. MHN $n=7$, MHS $n=7$
 b) Individualwerte

4.1.3 CO₂-Partialdruck nach Stimulation mit Koffein

Für die Stimulation mit Koffein steht nur eine Messreihe zur Verfügung, nämlich die initiale Injektion von Koffein. Da nach Vorinjektion von Halothan trotz der Spülung keine vergleichbaren Ausgangswerte (MHN: 43 [40; 47] mmHg gegen MHS: 69 [65; 79] mmHg; $p < 0,005$) erreicht werden konnten, wurde auf die Darstellung und Auswertung der CO₂-Werte für die Koffeinexposition nach Halothan und Ringerlösung verzichtet.

Nach vergleichbaren Ausgangswerten von 42 [39; 45] mmHg (MHS) und 39 [38; 43] mmHg (MHN) zeigte sich im Verlauf nach initialer Koffeinexposition weder ein deutlicher Anstieg der MH-positiven noch der MH-negativen Probanden, jedoch war der Unterschied in den Maximalwerten zwischen beiden Gruppen signifikant, da die MHN-Gruppe den Ausgangswert nicht wieder erreichte (Abb. 4.7 und 4.8).

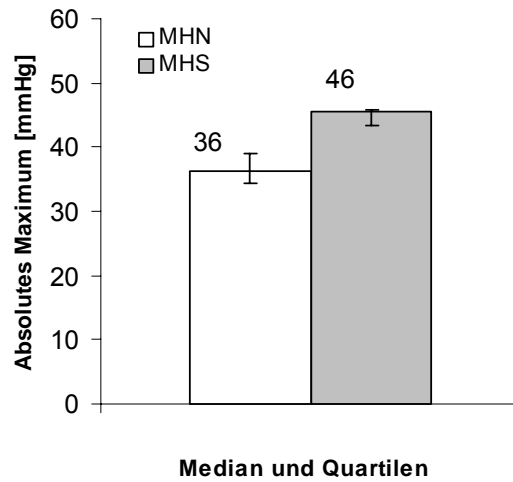


Abb. 4.7 Absolute pCO₂-Maxima für die initiale Stimulation mit Koffein 80 mmol/l. $p < 0,05$. MHN $n=7$, MHS $n=7$

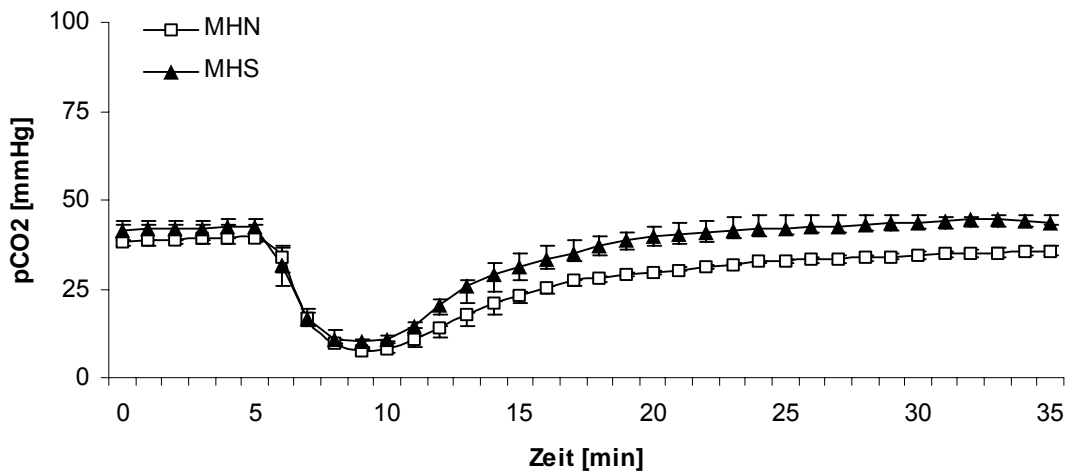


Abb. 4.8 pCO₂-Verlauf für die initiale Stimulation mit Koffein 80 mmol/l zum Zeitpunkt 5 min. Daten als Median und Quartilen. MHN $n=7$, MHS $n=7$

4.1.4 Maximale Steigung nach Stimulation mit Koffein

Die Steigung nach Injektion von 500 µl Koffein 80 mmol/l bei MH-negativen Probanden war mit -7 $[-10; -5]$ mmHg/h signifikant niedriger als bei MH-positiven mit 3 $[-2; 15]$ (Abbildung 4.9).

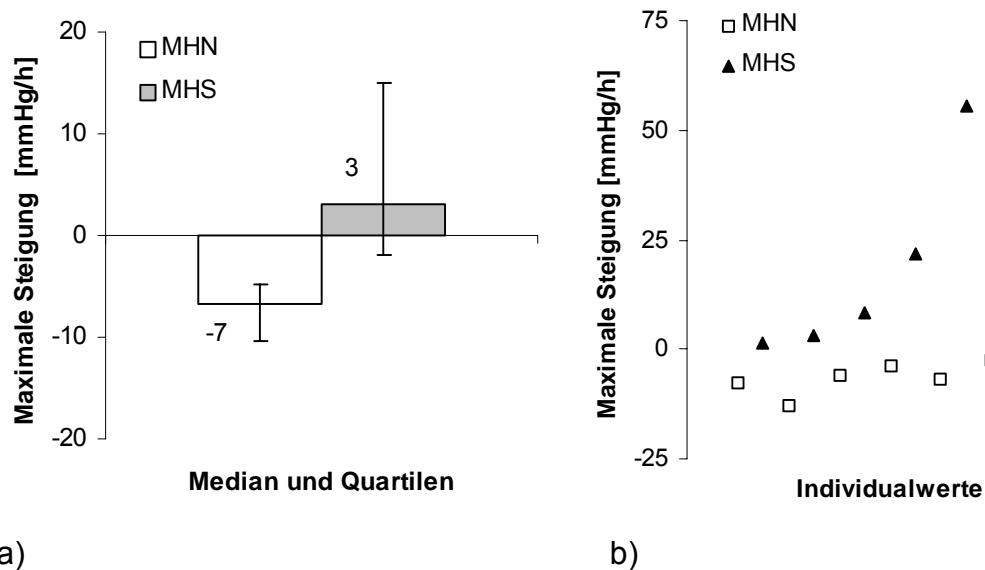


Abb. 4.9 a) Maximale Steigung für die Stimulation mit Koffein 80 mmol/l.
 Daten als Median und Quartilen, $p < 0,05$. MHN $n=7$, MHS $n=7$
 b) Individualwerte.

4.2 Weitere Daten

4.2.1 Alter und Body Mass Index (BMI)

BMI-Werte zwischen 18,5 und 24,9 kg/m^2 werden als normgewichtig bezeichnet. Die Gruppen im Protokoll 1 unterscheiden sich hinsichtlich der Merkmale Alter und BMI nicht signifikant voneinander.

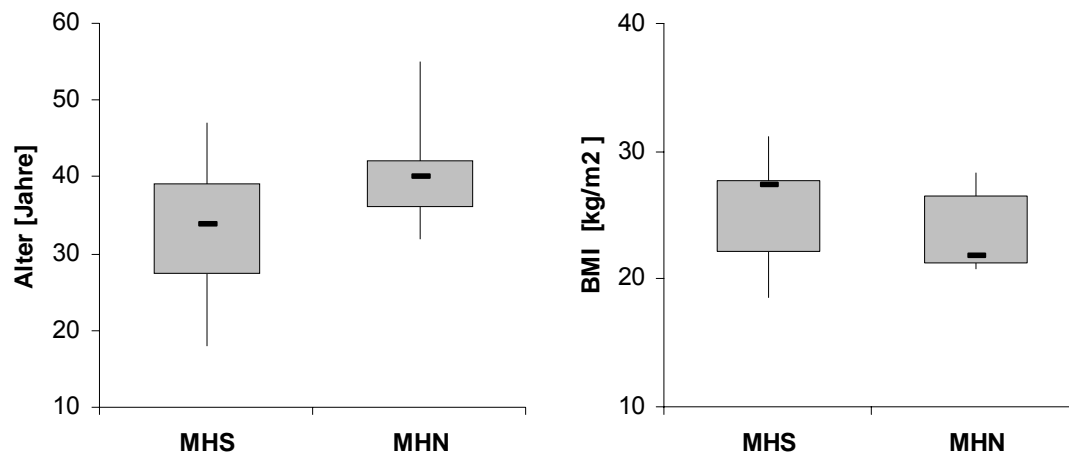


Abb. 4.10 Alter und Body Mass Index der Probanden

4.2.2 Schmerzskala

Ein für die Akzeptanz eines neuen Diagnoseverfahrens bei den Probanden wichtiger Parameter ist die subjektiv wahrgenommene Schmerzempfindung während der Diagnostik. Für deren Objektivierung kam eine visuelle Analogskala (VAS) mit einer Ablese skala von 0 (kein Schmerz) bis 10 (stärkster vorstellbarer Schmerz) zum Einsatz. Die Schmerzangaben der Probanden sind in den Abbildungen 4.11 für das Ereignis (Platzieren der Kanülen und die Injektionen) und 15 min danach zu entnehmen. Die Angaben der Probanden in den verschiedenen Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

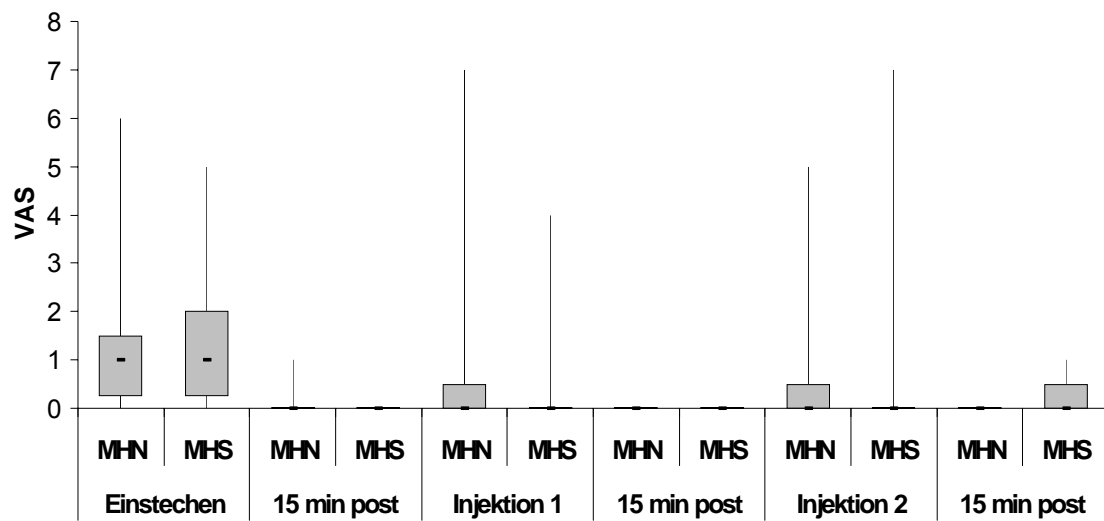


Abb. 4.11 Angaben der Probanden auf der Schmerzskala. Daten als Median (–) mit Quartilen (Rahmen) und Minimal- und Maximalwerten. Schmerzintensität von 0 (kein Schmerz) bis 10 (stärkster vorstellbarer Schmerz, MHN n=7, MHS n=7)

4.2.3 Vitalparameter

Während der Untersuchung wurden die Vitalparameter Puls, mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) und Sauerstoffsättigung erfasst. Alle Probanden waren zu jeder Zeit kreislaufstabil und zeigten insbesondere keinerlei Anzeichen für eine systemische Auswirkung der Untersuchung. Die Aufzeichnungen der Vitaldaten der Probanden sind in den Abbildungen 4.12 und 4.13 im Verlauf der Untersuchung alle 15 min dargestellt.

4 ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

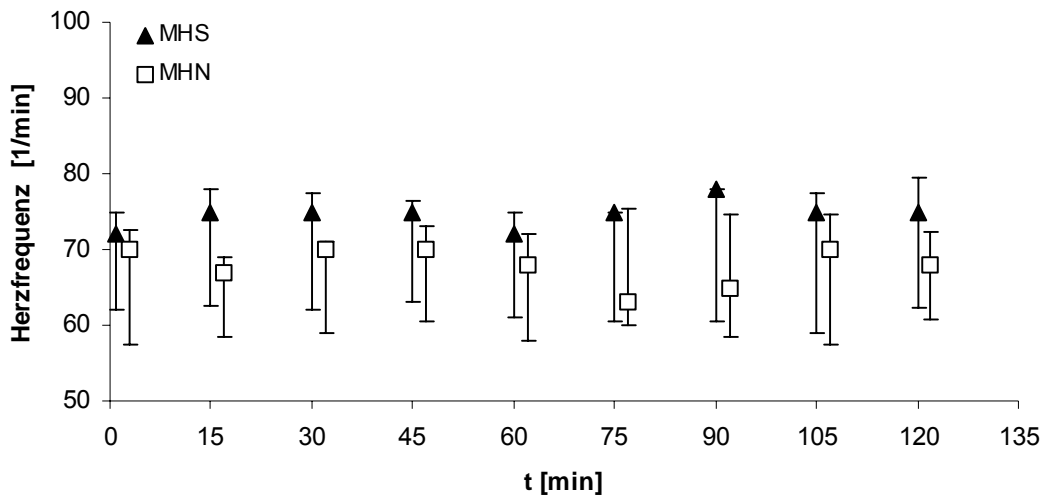


Abb. 4.12 Herzfrequenz der Probanden. Daten als Median und Quartilen.

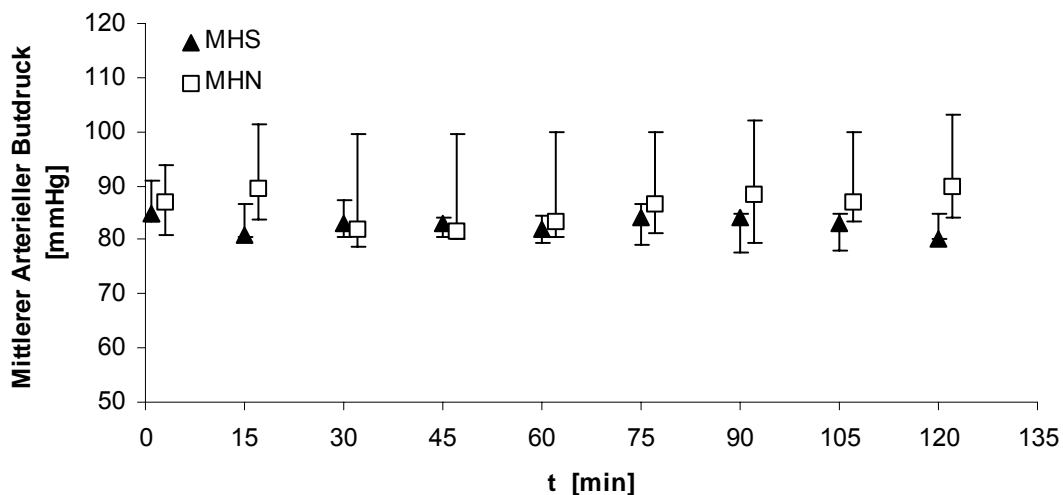


Abb.4.13 Mittlere arterielle Blutdruckwerte (MAP) der Probanden. Daten als Median und Quartilen.

4.2.4 Laborparameter

Die für die Maligne Hyperthermie sowie eine relevante Muskelschädigung wichtigen Laborparameter CK und Myoglobin wurden vor Beginn der Untersuchung und nach Abschluss bestimmt. Weiterhin wurde in der venösen Blutgasanalyse der pH-Wert sowie der Kohlendioxidpartialdruck bestimmt, um eine systemische Reaktion bei den Probanden auszuschließen.

4 ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

Für die Kreatinkinase (CK) und für das Myoglobin vor der Untersuchung (prä) sowie danach (post) ergab sich kein signifikanter Anstieg (Wilcoxon-Test) (Abbildungen 4.14 und 4.15). Die MH-veranlagten Probanden zeigten höhere Werte vor und nach der Untersuchung als die MH-nichtveranlagten. In der venösen Blutgasanalyse nach der Untersuchung ließ sich kein Unterschied im pH-Wert oder im CO₂-Partialdruck zwischen den Gruppen feststellen.

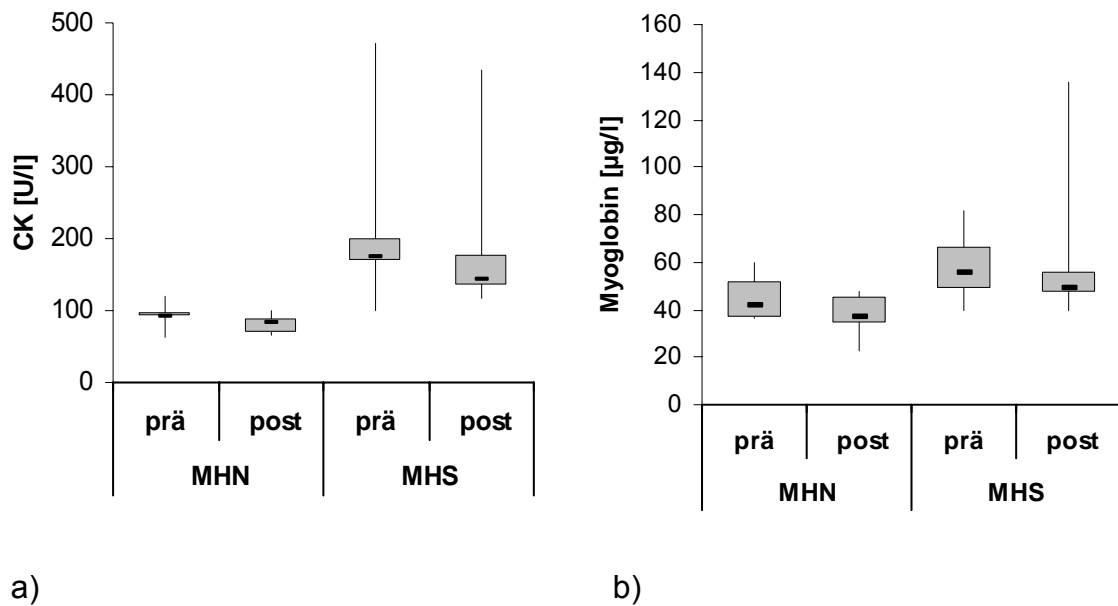


Abb. 4.14 a) Creatinkinase-Werte [U/l] für beide Gruppen vor und nach der Untersuchung.
b) Myoglobin-Werte [µg/l]. Daten als Median (–) mit Quartilen (Rahmen) und Minimal- und Maximalwerten.

4 ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

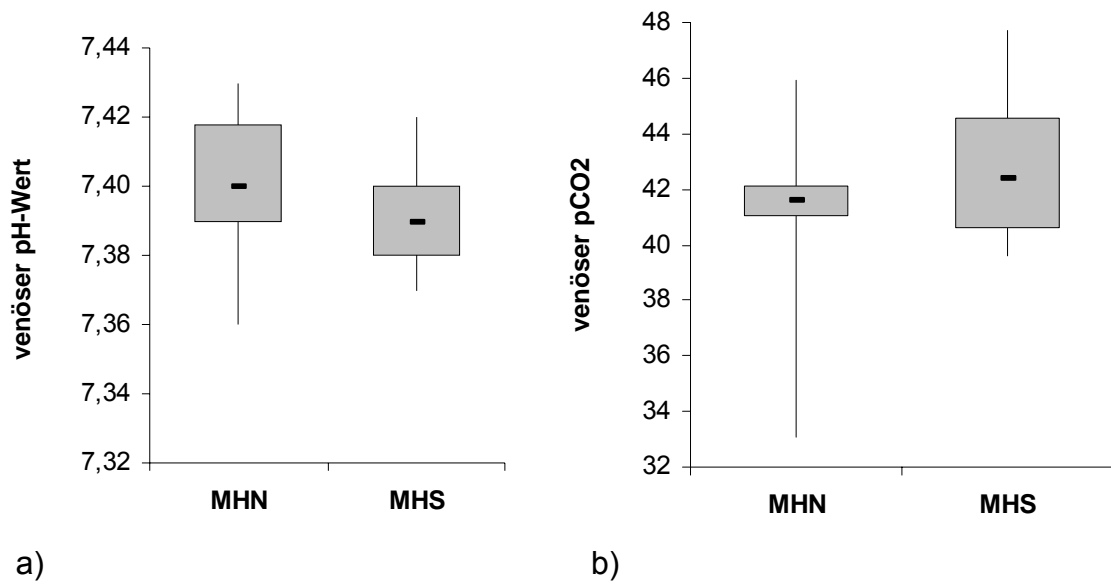


Abb. 4.15 a) Venöser pH-Wert nach Abschluss der Untersuchung
 b) Venöser pCO₂ [mmHg]. Daten als Median (–) mit Quartilen (Rahmen) und Minimal- und Maximalwerten.

4.2.5 Fragebogen zur Patientenzufriedenheit

Vier Wochen nach der Untersuchung wurde bei allen Probanden mittels standardisiertem Fragebogen die subjektive Einschätzung zu Vorbereitung, Durchführung und der Verlauf nach der Untersuchung erhoben. Die Skala der möglichen Antworten reichte von 1 (sehr gut/kein Schmerz) bis 10 (sehr schlecht/stärkster Schmerz).

Die Antworten aller Probanden sind in Abbildung 4.16 jeweils als Median mit Quartilen dargestellt. Die Antwortquote der Probanden lag bei 93%.

Frage	Protokoll 1	
	MHN	MHS
1. Waren Sie mit dem Verlauf der Untersuchung zufrieden?	1,5 [1;2]	1 [1;1,75]
2. Fühlten Sie sich im Vorfeld vor der Untersuchungstag ausreichend informiert?	1 [1;2]	2 [1,25;2]
3. Wie empfanden Sie die Betreuung während der Untersuchung?	1 [1;1,5]	1 [1;1,75]

4 ERGEBNISSE PROTOKOLL 1 (MIKROPERFUSION)

4. Wie stark waren die Schmerzen...		
- beim Legen bzw. Entfernen der Kanüle in der Ellenbeuge?	2 [1;2]	2 [1,25;2,75]
- bei der örtlichen Betäubung?	2 [1,5;2]	2,5 [1,25;3]
- beim Einstechen der Messkatheter im Bein?	2 [2;2,5]	1,5 [1;2,75]
- nach dem Spritzen der Medikamente im Bein?	2 [1,5;2]	2,5 [2;3,75]
- direkt nach Entfernung der Messkatheter im Bein?	2 [1,5;2,5]	2 [2;2,75]
- am selben Tag nach Untersuchung?	2 [1;2]	3 [3;3]
- am Tag nach Untersuchung?	1 [1;1,5]	2 [2;2]
5. Wie stark fühlten Sie sich am Tag nach der Untersuchung noch bei Ihrer täglichen Beschäftigung beeinträchtigt?	1 [1;1,5]	2 [1,25;2]
6. Wie verlief die Wundheilung an den Einstichstellen der Nadeln?		
- Rötung?	1 [1;1,5]	1 [1;1]
- Bluterguss?	1 [1;1]	1 [1;1]
7. Wie viele Tage hat Sie die Untersuchung durch Schmerzen etc. beeinträchtigt? [d]	0 [0;0]	1 [1;1]
8. Wie lange hielten die durch das Spritzen der Medikamente erzeugten Schmerzen an? [min]	0 [0;5,5]	1,5 [1;8]
9. Nach wie vielen Tagen waren die Einstichstellen verheilt? [d]	3 [3;5]	4,5 [4;6,5]

Abb. 4.16 Antworten der Probanden im Fragebogen vier Wochen nach der Untersuchung.
Daten als Median und Quartilen.

5 ERGEBNISSE PROTOKOLL 2 (DIREKT I.M)

5.1 CO₂-Partialdruck

5.1.1 CO₂-Partialdruck nach Stimulation mit Halothan

Nach intramuskulärer Platzierung und Äquilibration der Messsonden wurden 320 µl Halothan 8 Vol% injiziert. Dabei konnte ein durch den Verdünnungseffekt hervorgerufener unmittelbarer Abfall der CO₂-Werte beobachtet werden. Im weiteren Verlauf stieg der individuelle CO₂-Wert auf ein Maximum innerhalb von 30 min an. Diese individuell erreichten Maxima wurden ohne Berücksichtigung der Zeit des Anstiegs statistisch evaluiert. Die Grafiken zeigen die Maxima und den Verlauf des pCO₂ gegen die Zeit. Nach gleichen Ausgangswerten (MHN 39 [36; 40] gegen MHS 39 [36; 41]) erreichte die MH-negative Gruppe einen Maximalwert von 68 [55; 75] mmHg, die MH-positive Gruppe 90 [69; 113] mmHg. Allerdings unterschieden sich die erreichten Maxima nicht signifikant.

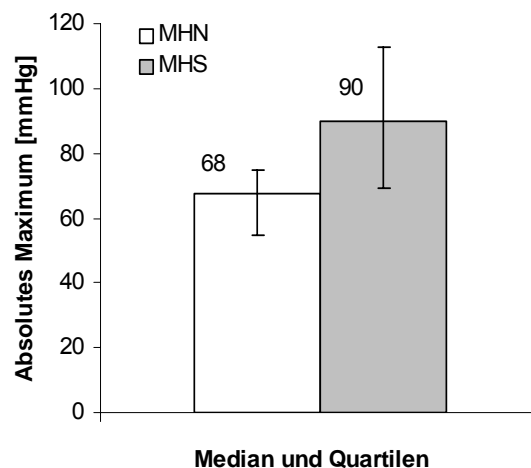


Abb. 5.1

Absolute pCO₂-Maxima nach Stimulation mit Halothan 8 Vol%.
p=0,14. MHN n=8, MHS n=9

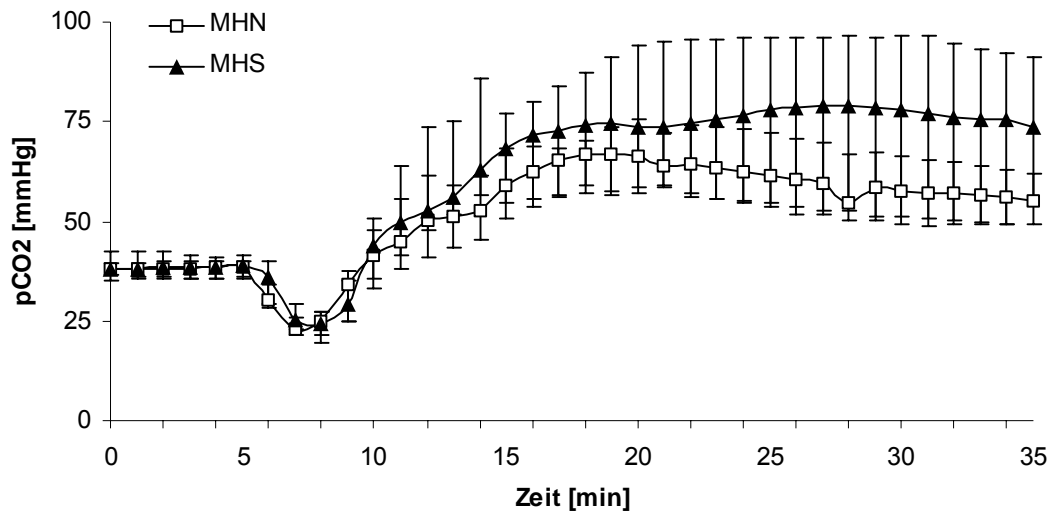


Abb. 5.2 $p\text{CO}_2$ -Verlauf nach Stimulation mit Halothan 8 Vol% zum Zeitpunkt 5 min. Daten als Median und Quartilen. MHN $n=8$, MHS $n=9$

5.1.2 Maximale Steigung nach Stimulation mit Halothan

Für die Stimulation mit Halothan 8 Vol% betrug die maximale Steigung 223 [124; 352] mmHg/h für MHS-Probanden beziehungsweise 159 [94; 217] mmHg/h (MHN). Die Gruppen unterschieden sich im Anstieg nicht signifikant, da bei 8 Vol% Halothan als Triggersubstanz auch die MHN-Gruppe deutlich anstieg.

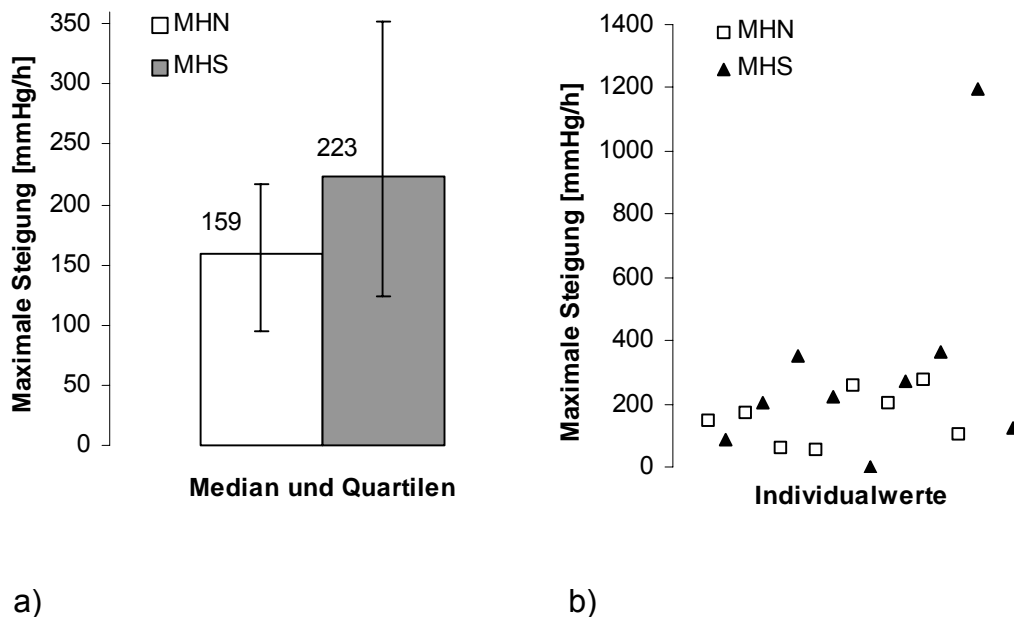


Abb. 5.3 a) Maximale Steigung nach Stimulation mit Halothan 8 Vol%.
 Daten als Median und Quartilen, $p=0,289$. MHN $n=8$, MHS $n=9$
 b) Individualwerte

5.1.3 CO₂-Partialdruck nach Stimulation mit Koffein

Nach Injektion von raumluftäquilibrierter Koffeidlösung kam es, wie bei Halothan beschrieben, zum Abfall des pCO₂. MH-negative Probanden kehrten danach lediglich langsam zum Ausgangswert zurück, während die Kohlendioxidpartialdrücke der MH-positiven Probanden über diesen anstiegen. Die Gruppen starteten bei identischen Ausgangswerten von 38 [36; 40] bei MHN und 38 [34; 40] bei MHS. Der maximale pCO₂ nach Stimulation mit Koffein betrug für die Gruppe MHN gegenüber MHS 38 [36; 42] mmHg gegen 59 [56; 74] mmHg. Damit unterschieden sich die Maxima signifikant voneinander.

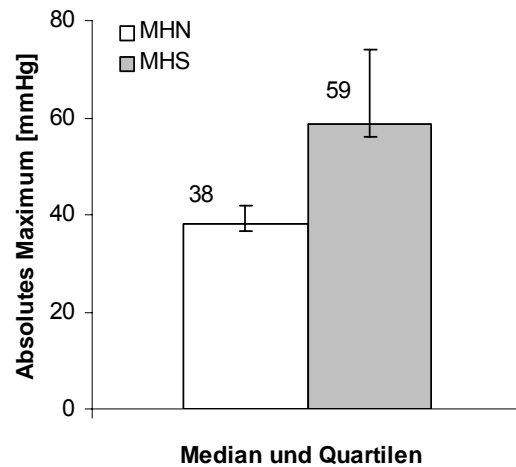


Abb. 5.4 Absolute pCO₂-Maxima nach Stimulation mit Koffein 80 mmol/l. $p=0,001$. MHN $n=8$, MHS $n=9$

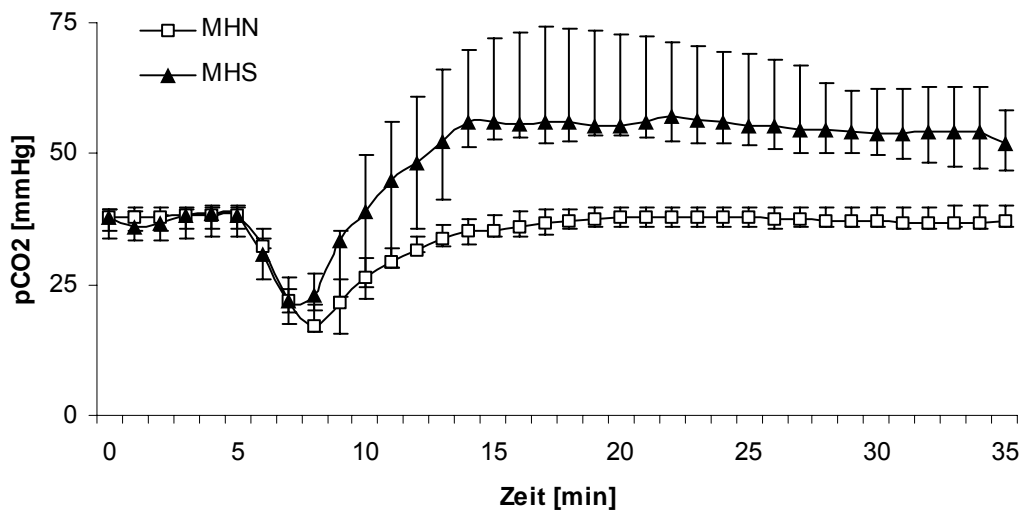


Abb. 5.5 pCO₂-Verlauf nach Stimulation mit Koffein 80 mmol/l. Daten als Median und Quartilen. MHN $n=8$, MHS $n=9$

5.1.4 Maximale Steigung nach Stimulation mit Koffein

Nach der Stimulation mit Koffein errechnete sich für die MH-positiven Probanden ein Anstieg von 126 [93; 209] mmHg/h und für die MH-negativen eine Steigung von 8 [-1; 22] mmHg/h. Die MH-positiven Probanden zeigten einen signifikant höheren Anstieg als die MH-negativen.

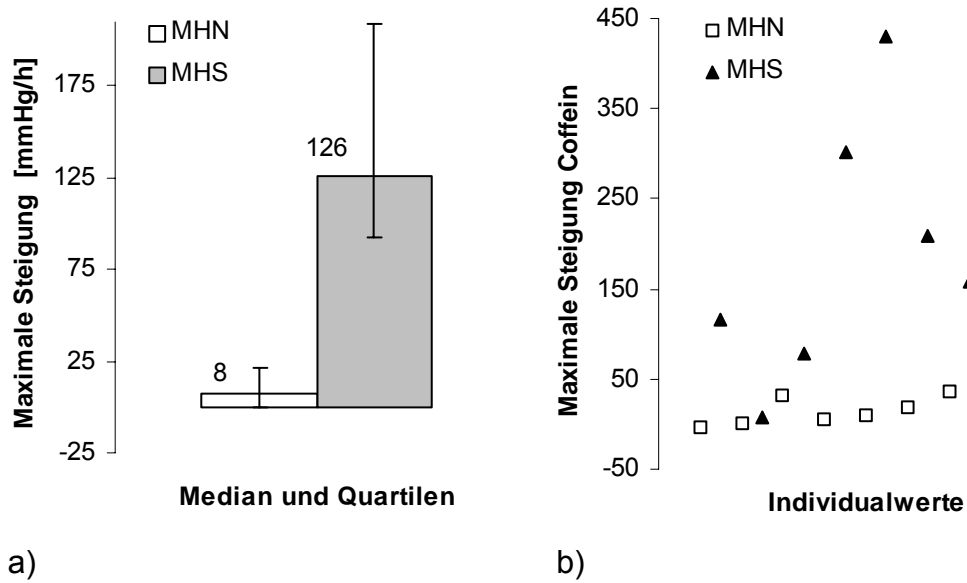


Abb.5.6 a) Maximale Steigung nach Stimulation mit Koffein 80 mmol/l.
 Daten als Median und Quartilen. $p=0.002$. MHN $n=8$, MHS $n=9$
 b) Individualwerte

5.2 Weitere Daten

5.2.1 Alter und Body Mass Index (BMI) der Probanden

Die Gruppen im Protokoll 2 (direkte i.m. Injektion) unterschieden sich hinsichtlich der Altersverteilung und des BMI nicht signifikant.

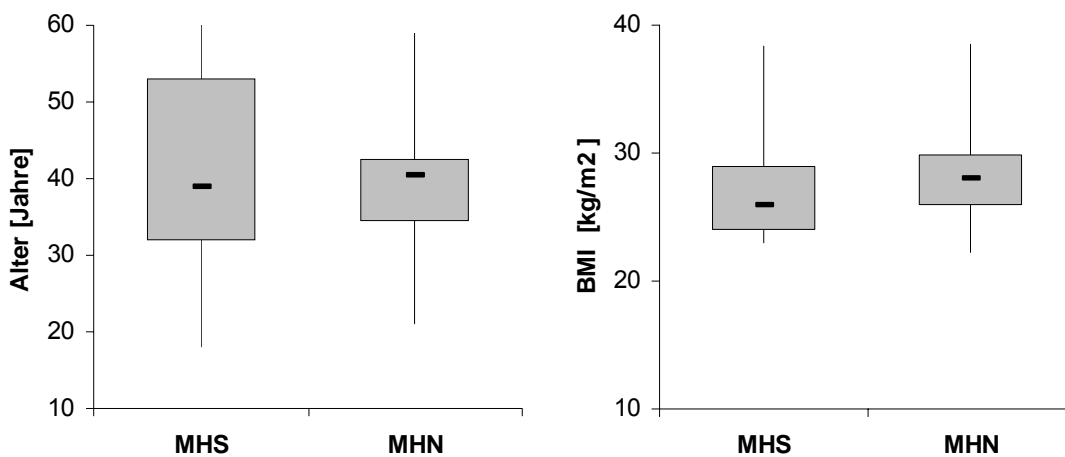


Abb. 5.7 Altersverteilung und Body Mass Index der Probanden

5.2.2 Schmerzskala

Für die Messung der Schmerzintensität wurde eine visuelle Analogskala (VAS) mit einer Ablese skala von 0 (kein Schmerz) bis 10 (stärkster vorstellbarer Schmerz) verwendet. Die Schmerzangaben der Probanden sind jeweils für das Ereignis (Platzieren der Kanülen und die Injektion) und 15 min danach dargestellt.

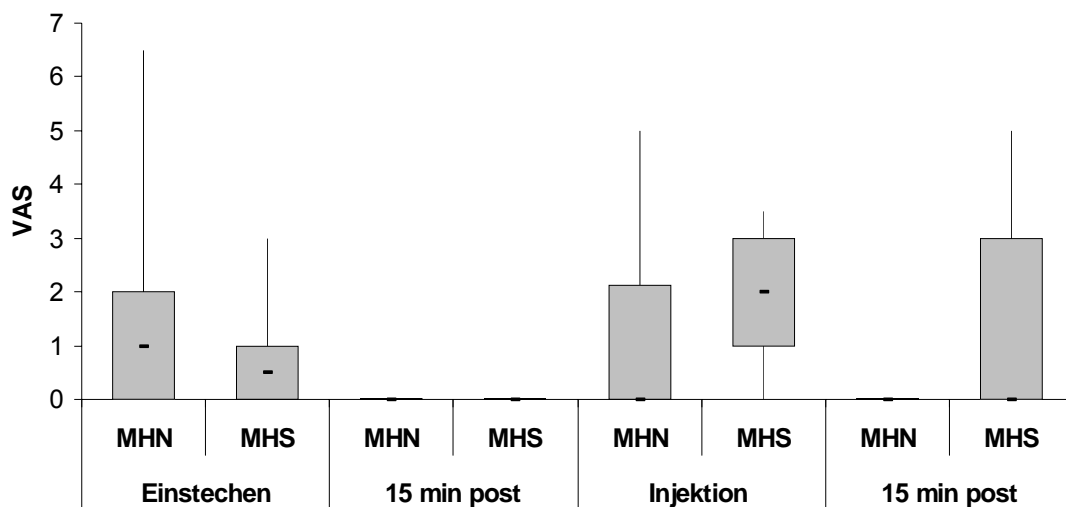


Abb. 5.8 Angaben der Probanden auf der Schmerzskala. Daten als Median (-) mit Quartilen (Rahmen) und Minimal- und Maximalwerten. Schmerzintensität von 0 (kein Schmerz) bis 10 (stärkster vorstellbarer Schmerz). MHN n=8, MHS n=9

5.2.3 Vitalparameter

Die erfassten Vitalparameter Puls, Blutdruck (MAP) und Sauerstoffsättigung waren zu jeder Zeit stabil. Die Daten sind in den Abbildungen 5.9 und 5.10 dargestellt.

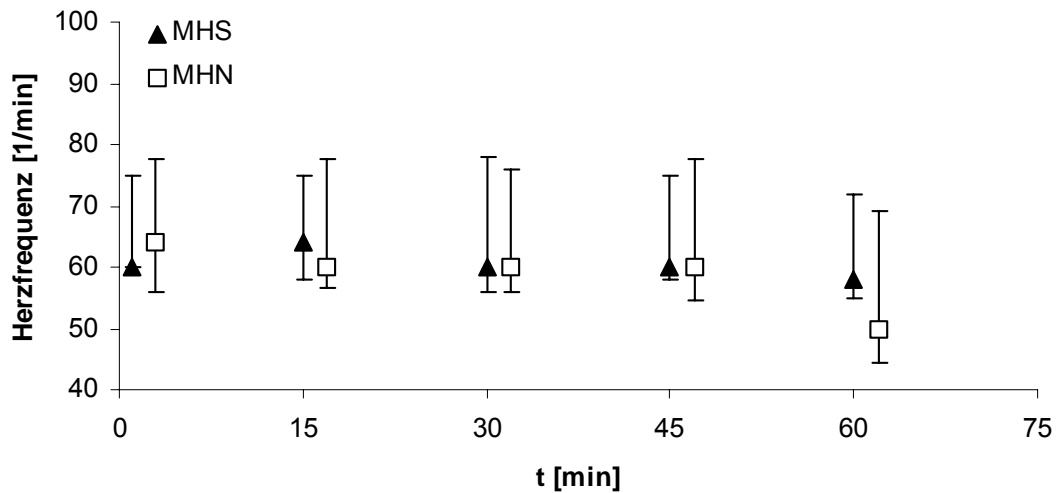


Abb. 5.9 Herzfrequenz der Probanden. Daten als Median und Quartilen.

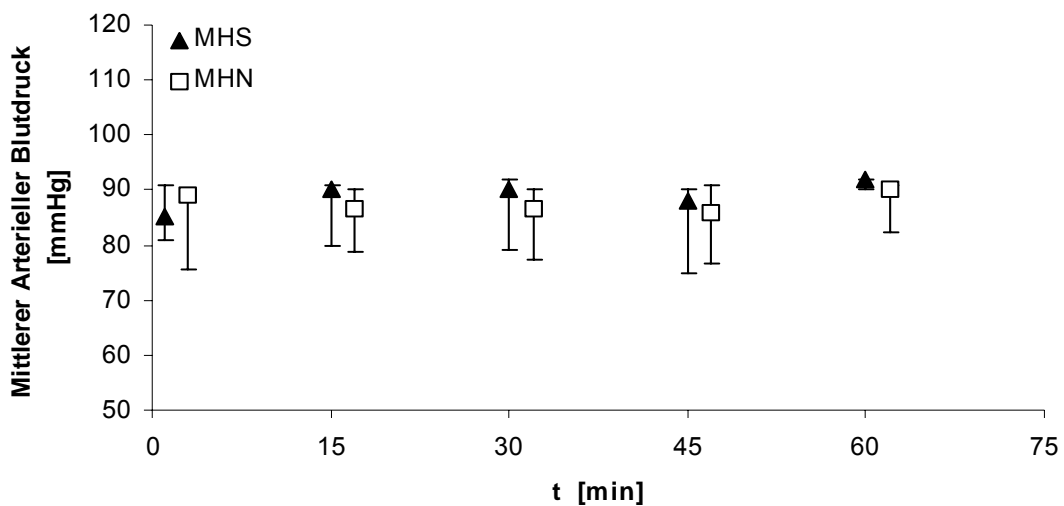


Abb. 5.10 Mittlere arterielle Blutdruckwerte (MAP) der Probanden. Daten als Median und Quartilen.

5.2.4 Laborparameter

Kreatinkinase (CK) und Myoglobin sowie die Ergebnisse der venösen Blutgasanalyse sind in den Abbildungen 5.11 und 5.12 gezeigt. Für CK und Myoglobin ergab sich kein signifikanter Anstieg (Wilcoxon-Test) nach der Untersuchung. Die venöse Blutgasanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede.

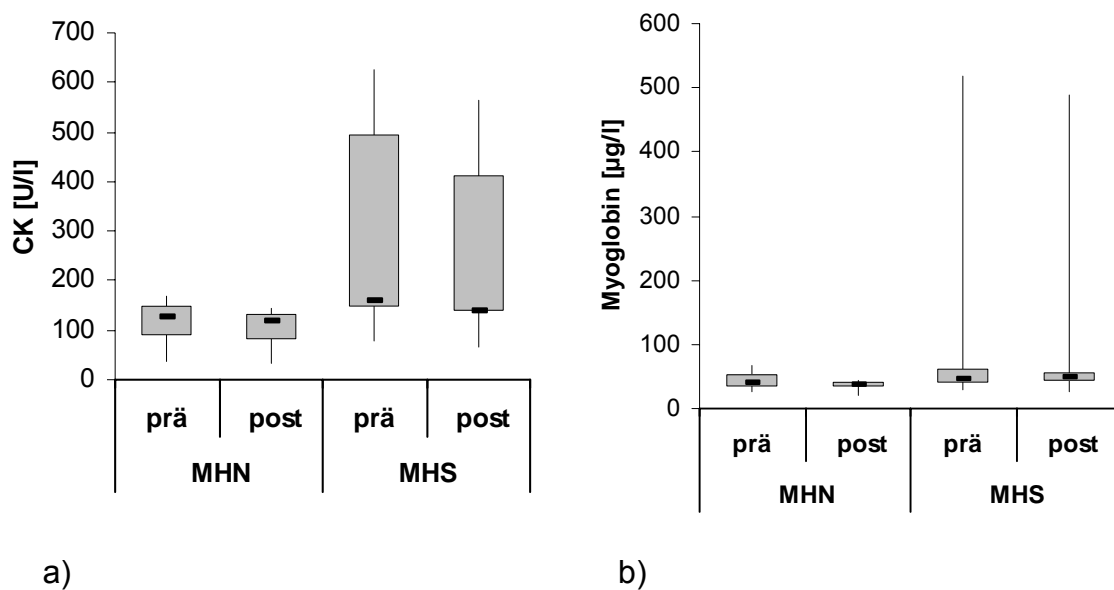


Abb. 5.11 a) Creatinkinase-Werte [U/l] für beide Gruppen vor und nach der Untersuchung.
 b) Myoglobin-Werte [$\mu\text{g/l}$]. Daten als Median (–) mit Quartilen (Rahmen) und Minimal- und Maximalwerten.

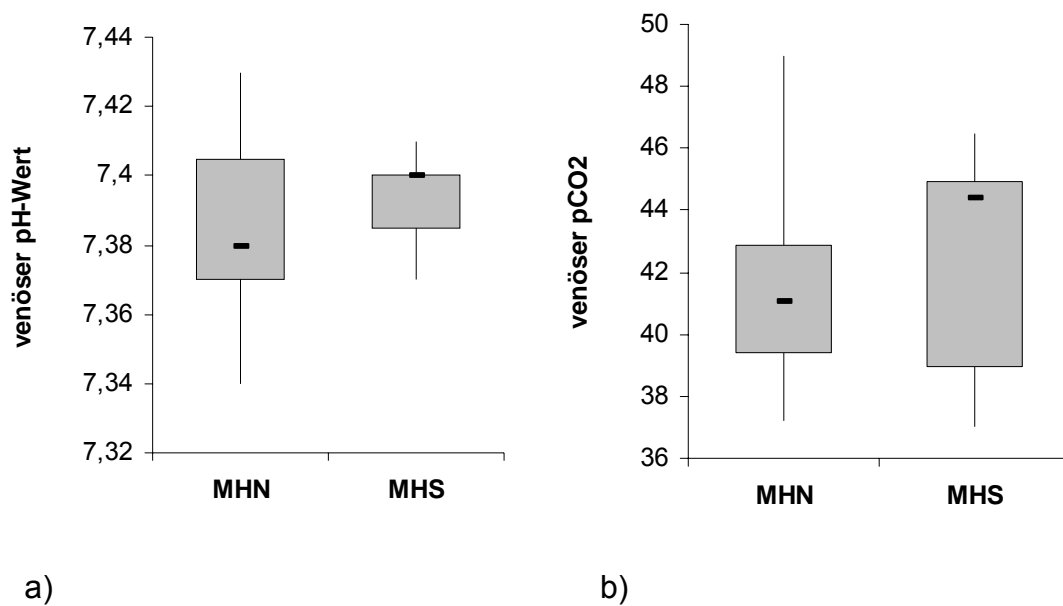


Abb. 5.12 a) Venöser pH-Wert nach Abschluss der Untersuchung.
 b) Venöser pCO₂ [mmHg]. Daten als Median (-) mit Quartilen (Rahmen) und Minimal- und Maximalwerten.

5.2.5 Fragebogen zur Patientenzufriedenheit

Auch im Protokoll 2 wurde vier Wochen nach der Untersuchung mittels standardisiertem Fragebogen der Verlauf und die Patientenzufriedenheit erfasst (Abbildung 5.13). Die Skala der möglichen Antworten reichte von 1 (sehr gut/kein Schmerz) bis 10 (sehr schlecht/stärkster Schmerz). Die Rücklaufquote lag bei 94%.

Frage	Protokoll 2	
	MHN	MHS
1. Waren Sie mit dem Verlauf der Untersuchung zufrieden?	1,5 [1;2]	1 [1;1,25]
2. Fühlten Sie sich im Vorfeld vor der Untersuchungstag ausreichend informiert?	1 [1;1]	1 [1;1,25]
3. Wie empfanden Sie die Betreuung während der Untersuchung?	1 [1;1]	1 [1;1,25]

5 ERGEBNISSE PROTOKOLL 2 (DIREKT I.M.)

4. Wie stark waren die Schmerzen...		
- beim Legen bzw. Entfernen der Kanüle in der Ellenbeuge?	1 [1;2]	1 [1;2]
- bei der örtlichen Betäubung?	3 [2;3,25]	2 [1;3]
- beim Einstechen der Messkatheter im Bein?	2 [1,75;2,25]	2,5 [1,75;3]
- nach dem Spritzen der Medikamente im Bein?	2 [1,75;3]	4 [3;5]
- direkt nach Entfernung der Messkatheter im Bein?	1,5 [1;2]	3 [1,75;3]
- am selben Tag nach Untersuchung?	1,5 [1;2]	1,5 [1;2,25]
- am Tag nach Untersuchung?	1 [1;1,5]	1 [1;1,5]
5. Wie stark fühlten Sie sich am Tag nach der Untersuchung noch bei Ihrer täglichen Beschäftigung beeinträchtigt?	1 [1;1]	1 [1;2]
6. Wie verlief die Wundheilung an den Einstichstellen der Nadeln?		
- Rötung?	1 [1;1,5]	1 [1;1,5]
- Bluterguss?	1 [1;3,5]	1 [1;3,25]
7. Wie viele Tage hat Sie die Untersuchung durch Schmerzen etc. beeinträchtigt? [d]	0 [0;0]	0 [0;1,5]
8. Wie lange hielten die durch das Spritzen der Medikamente erzeugten Schmerzen an? [min]	1 [0,25;1,75]	10 [10;22,5]
9. Nach wie vielen Tagen waren die Einstichstellen verheilt? [d]	3 [2;4]	4 [3;5]

Abb. 5.13 Antworten der Probanden im Fragebogen vier Wochen nach der Untersuchung. Daten als Median und Quartilen.

6 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war, zwei verschiedene methodische Ansätze für einen minimal-invasiven metabolischen Test zur Diagnose einer Maligne-Hyperthermie-Veranlagung hinsichtlich technischer Umsetzung, diagnostischem Potential, Durchführbarkeit und Akzeptanz bei den Probanden zu vergleichen und den Einsatz der Verfahren für die Diagnostik der MH-Veranlagung zu evaluieren. Hierzu wurde an freiwilligen Probanden die Injektion der Triggersubstanzen Halothan und Koffein einmal in eine im Muskel liegende Mikroperfusionskanüle und einmal direkt in die Muskulatur mit kontinuierlicher Messung des Kohlendioxidpartialdruckes im Muskel untersucht.

Dabei konnten die theoretischen Vorteile der Triggerapplikation durch die perforierten Kanülen in der Praxis nicht bestätigt werden, jedoch war in beiden Protokollen die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen MHN und MHS-Probanden gegeben. Die Durchführung der Untersuchung konnte standardisiert und die Untersuchungsdauer verkürzt werden. Weiterhin ist es gelungen, die Ergebnisse früherer Studien zu bestätigen.

Die minimal-invasive pCO₂-Messung nach lokaler Triggerapplikation könnte in Zukunft eine Alternative zum Kontrakturtest in der MH-Diagnostik darstellen.

6.1 Methodenkritik

Die Diagnostik zur Disposition zur Malignen Hyperthermie basiert zur Zeit auf dem in-vitro Kontrakturtest. Als Alternative wird in der vorliegenden Arbeit der minimal-invasive metabolische Test untersucht. Entgegen früherer Studien zu dem Thema, in denen via Mikrodialyse der Laktatanstieg gemessen wurde, fokussieren die Untersuchungsprotokolle jetzt auf die Messung von Kohlendioxid, da sich eine gute Korrelation mit dem Laktatanstieg in der Muskulatur zeigte und in Voruntersuchungen die CO₂-Partialdruckmessung als sensitivere Methode gewertet wurde.⁴¹ Kohlendioxid entsteht als direktes Produkt einer Stoffwechselsteigerung und ist hinsichtlich seiner Diffusionseigenschaften dem Laktat überlegen. Daher wurde das aufwendigere Verfahren zur Laktatmessung verlassen.

Die kontinuierliche intramuskuläre Partialdruckmessung mittels $p\text{CO}_2$ -Sensoren wurde bereits in vorangegangenen Studien von ANETSEDER et al. etabliert.⁴² Auch in anderen Geweben wie Gehirn und Leber wurde der Kohlendioxid-Partialdruck mit Paratrend®-Sonden gemessen und es zeigte sich eine gute Validität der intraparenchymatösen Messungen.⁴³

Zur Injektion der Triggersubstanzen wurde im Protokoll 1 eine modifizierte Version der Mikroperfusionskanülen nach ELLMERER und SCHAUPP^{34,35} verwendet. Die Kombination dieser selbst entwickelten Kanüle mit der $p\text{CO}_2$ -Sonde stellt eine neuartige Messvorrichtung für die in-vivo-Messung des Kohlendioxidpartialdruckes in der Muskulatur dar. Die Reinigung der Kanülen nach dem Einbringen der Perforationen durch den Laser stellt sicher, dass Fremdkörper sowie lipo- und hydrophile Anlagerungen entfernt werden. Die Sterilisation mit Ethylenoxid ist besonders für die komplexe Geometrie und das enge Lumen der Kanülen geeignet.

Die Verwendung der so hergestellten Mikroperfusionskanülen bietet theoretisch gegenüber der direkten intramuskulären Injektion verschiedene Vorteile.

So ist durch die große Anzahl der Perforationen der Kanüle sowohl der Kontakt der injizierten Substanzen mit dem Muskel als auch die Diffusion des entstehenden Kohlendioxids zur Messsonde weitgehend unbehindert möglich, weiterhin bietet das Lumen der Mikroperfusionskanüle mit der darin stehenden Flüssigkeitssäule einen definierten Reaktionsraum in der Muskulatur mit guten Diffusionseigenschaften. Bei der direkten intramuskulären Injektion ist der Reaktionsraum und die Ausbreitung der injizierten Substanzen nicht exakt bekannt, da zum Beispiel durch Bindegewebssepten die Ausbreitung im Muskel behindert werden kann.

Da im Verlauf der Untersuchung im Protokoll 1 sequentiell verschiedene Trigger- und Spüllösungen in die Kanüle injiziert werden, ist mit der Bohrung im Ansatzbereich der Mikroperfusionskanüle eine Möglichkeit des Abflusses der jeweils vorher verwendeten Flüssigkeit geschaffen worden. Ein definitiver Nachweis für den vollständigen Austausch der Substanzen an der Messsonde bei der sequentiellen Injektion ist allerdings nicht möglich. Auch eine Vermischung der Substanzen Koffein und Ringer und damit eine Verdünnung

der Triggersubstanz ist nicht auszuschließen. Diesem Problem kann durch ein ausreichend hohes Injektionsvolumen von Koffein begegnet werden. Die Vermischung von Halothan und Ringerlösung ist dagegen weniger wahrscheinlich, da das als Trägerlösung verwendete Lipofundin stark lipophil ist. Daher wurde bei der direkten intramuskulären Injektion im Protokoll 2 die sequentielle Injektion wieder verlassen. Ein positiver Nebeneffekt dieser Maßnahme ist sicher die im Vergleich zum Protokoll 1 stark verkürzte Untersuchungszeit.

Die intramuskuläre Injektion von Halothan in Lipidlösung und Koffein erwies sich in bisher publizierten und selbst durchgeführten Untersuchungen als ungefährlich. Für ungebundenes Halothan ist eine schwere Zellschädigung bekannt,⁴⁴ weswegen die Lösung in einer Lipidlösung notwendig ist. Die Injektion von lipidgelöstem Halothan zeigt die erwartete narkotische Reaktion bei Schweinen,⁴⁵ so dass die Wirkung auch in dieser Form sichergestellt ist. Allerdings muss vor Injektion des Halothangemischs auf die gute Vermischung der Lipofundin- und Halothan-Komponenten geachtet werden, da diese sich nach einiger Zeit wieder trennen. Der häufig eingesetzte Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid (DMSO) als Alternative zu Lipofundin konnte jedoch die Phasentrennung nicht verhindern.

Durch die Kontrolle der Vitalparameter, der Kreatinkinase und des Myoglobins sowie die Blutgasanalyse können systemische Nebenwirkungen im Sinne einer generalisierten MH-Reaktion oder eines größeren Muskelschadens ausgeschlossen werden.

Bei der Platzierung der Sonden in der Muskulatur sind Kontraindikationen zu beachten, so dass das Verfahren nicht für alle Patienten, wohl aber für die überwiegende Mehrheit in Frage kommt. Besonders auf Störungen der Blutgerinnung sollte wegen der Gefahr eines intramuskulären Hämatoms geachtet werden. Prophylaktisch wurde bei allen Patienten nach der Untersuchung ein elastischer Verband angelegt. Das Verfahren verlangt von den Patienten, mindestens eine Stunde den Oberschenkel ruhig liegen zu lassen. Kinder und Patienten, die nur eingeschränkt kooperieren können daher nur bedingt untersucht werden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse eignet sich am besten die Darstellung der Kohlendioxidpartialdrücke als maximale Steigung. Aus physiologischer Sicht wird eine Stoffwechselsteigerung nicht nur durch ihr erreichtes CO₂-Maximum, sondern ebenso durch die Zeit bis zum Erreichen des Maximums dargestellt. Der Parameter „maximale Steigung“ ist bei physiologischen Ausgangswerten unabhängig vom Ausgangswert, was die Ergebnisse verschiedener Probanden sehr gut vergleichbar macht. Ein unphysiologisch erhöhter Ausgangswert führt allerdings aufgrund der nicht beliebig hohen CO₂-Produktion zu einer Reduktion der maximalen Steigung. Weiterhin bildet die Steigung sowohl Anstiegsgeschwindigkeit als auch den maximal erreichten Partialdruck ab und erlaubt so die bessere Unterscheidung zwischen MHS und MHN-Probanden.

6.2 Ergebnisdiskussion

Nach Auswertung der Ergebnisse der pCO₂-Messungen im Protokoll 1 können verschiedene Rückschlüsse gezogen werden.

Der unzureichende pCO₂-Anstieg nach Koffeininjektion zeigt, dass mit der gewählten Konzentration von Koffein in Kombination mit den perforierten Kanülen keine ausreichende Stimulation des Muskelstoffwechsels erreichbar ist. Die Kombination aus der perforierten Kanüle und der Koffeinapplikation ist daher zur Unterscheidung von MH-negativen und MH-positiven Probanden nicht geeignet. Die pCO₂-Werte der Gruppe MHN erreichen nach dem durch die Injektion bedingten Abfall nicht mehr das Ausgangsniveau, so dass die errechnete Steigung negativ ist. Auch bei den MH-veranlagten Probanden lässt sich nur ein sehr geringer Anstieg verzeichnen. Die Verdünnungseffekte im Interstitium überwiegen die Stoffwechselanregung durch Koffein. Wir nehmen an, dass durch die Trennung der Koffeinsäule von der Muskulatur durch die Kanüle die Konzentration an der Muskelzelle zu niedrig ist für eine messbare Stoffwechselantwort. Die Koffeinkonzentration kann aus Gründen der Löslichkeit nicht weiter erhöht werden. Dass die gewählte Konzentration von 80 mmol/l ausreichend hoch für eine Stimulation des Muskelstoffwechsels ist, wird

aus den Ergebnissen der direkten intramuskulären Koffeinapplikation im Protokoll 2 ersichtlich.

Die Injektion von Halothan 10 Vol% dagegen kann eine Steigerung des Muskelstoffwechsels auslösen. In der gewählten Konzentration sind hiervon jedoch sowohl MHS als auch MHN-Probanden betroffen, was wiederum für die Dosisabhängigkeit der MH spricht, die auch in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte.⁴¹

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Halothanapplikation in der sequentiellen Injektionsabfolge vor oder nach Koffein fällt auf, dass nach Vorinjektion von Koffein trotz der dazwischen durchgeführten Spülung mit Ringerlösung die maximale Anstiegsgeschwindigkeit in beiden Gruppen höher ist. Dies könnte für eine latent gesteigerte Stoffwechsellage nach Koffeininjektion sprechen, obwohl auf Koffein kein Anstieg des CO₂-Partialdruck festgestellt werden konnten.

Nach direkter intramuskulärer Injektion im Protokoll 2 konnten sowohl für die Koffein- als auch für die Halothanapplikation höhere maximale Anstiegsgeschwindigkeiten gemessen werden als im Protokoll 1. Die direkte Injektion verkürzt die Diffusionsdauer ins Muskelgewebe und erhöht die Konzentration der Triggersubstanzen an der Muskelzelle, auch wenn wegen Verdünnungseffekten im Extrazellulärraum die absolute Konzentration unbekannt bleibt. Die Beobachtung, dass Koffein 80 mmol/l bei Applikation in die perforierten Kanülen keine Stoffwechselsteigerung auszulösen vermag, bei direkter Injektion allerdings eine sehr gute Differenzierung zwischen den Gruppen ermöglicht, unterstützt diese These. Sowohl die absolut erreichten CO₂-Partialdrücke nach Koffein als auch die errechneten Anstiegsgeschwindigkeiten erlauben eine optimale Differenzierung, da die MH-negativen Probanden lediglich knapp den Ausgangswert erreichen, während die MH-positiven Probanden deutlich darüber ansteigen. Lediglich ein MH-veranlagter Proband bleibt nach Koffeinapplikation unter der gewählten Schwelle und wird damit falsch negativ diagnostiziert. Der Grund hierfür kann in der nicht exakt bestimmaren Ausbreitung der Substanz im Muskel liegen. Auch durch größere Bewegung des Probanden kann die Messsonde vom

Ausbreitungsgebiet der Substanz entfernt und somit die Stoffwechselsteigerung nicht mehr exakt gemessen werden. In diesem Einzelfall zeigte die parallele Messung nach Applikation von Halothan einen Anstieg über die Schwelle, so dass der Proband als MHS klassifiziert worden wäre. Die Aussagekraft der Halothanapplikation ist allerdings eingeschränkt, da bei der Stimulation mit Halothan 8 Vol% die Konzentration in einem Bereich liegt, in dem auch die pCO₂-Werte der MH-negativen Probanden deutlich ansteigen. Die Differenzierungsfähigkeit der lokalen Stimulation geht somit verloren. Weitere Untersuchungen mit niedrigerer Halothandosierung sind notwendig.

Die erhobenen Vitalparameter und die Laboruntersuchungen machen deutlich, dass nach der lokalen Applikation der Trigger keine systemischen Nebenwirkungen, insbesondere keine generalisierte Stoffwechselsteigerung auftreten. Blutdruck- und Pulswerte blieben während der Untersuchung bei allen Probanden im Normbereich, die Sauerstoffsättigung ebenfalls. In der laborchemischen Bestimmung der für die Muskulatur relevanten Marker Kreatinkinase (CK) und Myoglobin kann nach der Untersuchung keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Werten davor festgestellt werden. Die venöse Blutgasanalyse nach Abschluss der Untersuchung ergibt keine Unterschiede zwischen den Gruppen und liegt bei allen Probanden im Normbereich, so dass sich auch hier kein Hinweis für eine systemisch-metabolische Veränderung durch die lokale Stimulation ergibt.

Die Akzeptanz eines neuen Diagnoseverfahrens hängt auch von der subjektiven Schmerzempfindung der Probanden ab. Die Visuelle-Analog-Skala (VAS) kann hier die subjektiven Schmerzen und Mißempfindungen abbilden. Die stärksten Schmerzen verspüren die Probanden bei der Platzierung der Kanülen in der Muskulatur. Hierbei steht in beiden Gruppen und beiden Protokollen der Schmerz bei der Perforation der Muskelfaszie im Vordergrund, die Haut und die Subkutis konnten ausreichend mit Lokalanästhetikum infiltriert werden. Eine Lokalanästhesie der Muskelfaszie und des Muskels selbst war wegen der möglichen Beeinflussung der Calciumfreisetzung und der Stoffwechselsteigerung durch das Lokalanästhetikum nicht möglich. Im

Vergleich der beiden Protokolle fällt auf, dass bei der direkten Injektion im Protokoll 2 die Schmerzangaben nach Injektion höher sind als bei der Injektion in die Mikroperfusionskanüle im Protokoll 1. Dies beruht auf dem direkten Kontakt der Muskulatur mit der Triggersubstanz und der damit vermuteten höheren Konzentration, die sich auch in höheren CO₂-Werten nach Stimulation widerspiegelt. Weiterhin kann festgestellt werden, dass nach der direkten Injektion die MHS-Gruppe stärkere Schmerzen angibt, was die stärkere Aktivierung des Stoffwechsels wiedergibt. 15 min nach Platzierung der Kanülen beziehungsweise einer Injektion sind die Patienten schmerzfrei. Eine Ausnahme bilden MHS-Probanden im Protokoll 2, die auch nach 15 Minuten noch Schmerzen empfinden. Alle Probanden waren bei Abschluss der Untersuchung beschwerdefrei und konnten ohne Beeinträchtigung nach Hause entlassen werden. Die Akzeptanz des neuen Verfahrens ist hoch. Alle Probanden würden sich für das neue Verfahren anstatt der Muskelbiopsie entscheiden. Die Auswertung der Fragebögen zeigt außerdem das insgesamt sehr niedrige Schmerzniveau und die sehr kurze Dauer der Beeinträchtigung der Probanden. Lediglich die MH-positiven Probanden geben eine Schmerzdauer nach Injektion von 10 min an. Alle Teilnehmer an der Untersuchung konnten am Folgetag problemlos ihrer Beschäftigung bzw. einer sportlichen Betätigung nachgehen, was im Vergleich zur Muskelbiopsie (im Mittel 9,4 Fehltage)³⁹ die Krankheitszeiten verkürzt und die daraus entstehenden Kosten mindert.

6.3 Spezifität und Sensitivität

Für die diagnostische Zuordnung der Probanden zur Diagnose MHN oder MHS wurden wegen der unterschiedlichen Methodik für beide Protokolle unterschiedliche empirische Schwellenwerte post hoc festgelegt. Um eine hohe Sicherheit des Testverfahrens zu erreichen, wurden die Probanden in Analogie zum Kontrakturtest bereits bei *einem* (von zwei) positiven Testergebnis als MH-positiv diagnostiziert. Die hohe Sensitivität des Testverfahrens ist hierbei das vorrangige Ziel, da für falsch negativ diagnostizierte Patienten gravierende

Folgen drohen bei nur geringen Konsequenzen für falsch positiv diagnostizierte Personen.

Als empirischer Schwellenwert wurde daher im Protokoll 1 für Halothan ein maximaler Partialdruckanstieg von 70 mmHg/h festgelegt. Für Koffein kann der Schwellenwert 0 mmHg/h definiert werden. Im Protokoll 2 liegt die Schwelle bei 200 mmHg/h für Halothan und 50 mmHg/h für Koffein.

Im Protokoll 1 konnte mit diesen Schwellenwerten eine Sensitivität von 100% bei einer eingeschränkten Spezifität von 71% erreicht werden.

Für die Untersuchungen im Protokoll 2 kann eine Sensitivität von 100% errechnet werden, die Spezifität liegt dabei bei 62,5%. Dies beruht weitgehend auf der zu hoch gewählten Halothandosierung, die zu einer Stoffwechselsteigerung selbst bei MHN-Probanden führt.

Einschränkend ist zu sagen, dass die hier vorliegenden Daten auf einer relativ kleinen Zahl an Probanden beruhen. Um verlässlichere Aussagen zu Sensitivität und Spezifität zu machen sind weitere Untersuchungen notwendig.

6.4 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen können unter Berücksichtigung der Fragestellung folgende Schlüsse gezogen werden:

Die modifizierten Mikroperfusionskanülen sind im Hinblick auf die maximal erreichbare Stimulation des Muskelstoffwechsels der direkten intramuskulären Injektion im Protokoll 2 unterlegen. Im Gegensatz zu den theoretischen Vorteilen der perforierten Kanülen zeigen die Ergebnisse einen deutlichen Vorteil der direkten Stimulation bezüglich der Diskriminierung zwischen MH-positiven und MH-negativen Probanden. Ein wesentlicher Aspekt hierbei ist die Dosierung der zur Stimulation verwendeten Substanzen. Da Koffein nicht höher als 80 mmol/l konzentriert werden kann, ist es für die indirekte Injektion in die perforierten Kanülen nicht geeignet. Bei direkter Injektion ist die Dosisfindung bei optimaler Unterscheidung zwischen MHS- und MHN-Probanden damit abgeschlossen. Die optimale Halothandosis ist Gegenstand weiterer Studien,

da bei den gewählten Konzentrationen die MHN-Gruppen ebenfalls mit einer deutlichen Steigerung des Muskelstoffwechsels reagierten.

Die Durchführbarkeit konnte vor allem durch die Beschränkung auf die weniger aufwendige Partialdruckmessung und den Verzicht auf die Laktatmessung vereinfacht werden. Die einmalige Injektion im Protokoll 2 zeigt sowohl in der Handhabung als auch in der Akzeptanz der Patienten Vorteile gegenüber der sequentiellen Injektion im Protokoll 1. Insgesamt konnte im Vergleich zu Voruntersuchungen die Untersuchungsdauer auf ca. 90 Minuten reduziert und die Handhabung der Messinstrumente vereinfacht werden, so dass das Verfahren als neue diagnostische Alternative leichter und somit sicherer anzuwenden ist. Der Ablauf konnte gut standardisiert werden, so dass die Ergebnisse gut reproduzierbar waren und verfahrenstechnisch bedingte Artefakte minimiert werden konnten.

Die Sensitivität des Verfahrens ist im Protokoll 1 mit 100 % sehr gut, dies geht allerdings mit einer eingeschränkten Spezifität einher. Im Protokoll 2 wird aufgrund der zu hohen Konzentration des Halothans nur eine niedrige Spezifität erreicht, die Ergebnisse für Koffein sind allerdings viel versprechend.

Auf Basis der hier vorliegenden Daten erscheint eine Kombination aus einer einmaligen Halothaninjektion in die perforierte Kanüle wie im Protokoll 1 in Kombination mit der direkten Koffeininjektion als viel versprechende diagnostische Methode zur Zuweisung der Probanden zu der Diagnose MHS oder MHN.

Im Protokoll 2 konnten die Ergebnisse früherer Studien nicht nur bestätigt, sondern sogar noch verbessert werden. Die Unterscheidung zwischen den Gruppen ist im Protokoll 2 für Koffein im Vergleich zur Studie von ANETSEDER et al.⁴² bei größerer Differenz des maximalen Anstiegs besser und sicherer möglich.

Mit dem metabolischen Test steht eine Ergänzung beziehungsweise Alternative zum IVCT zur Verfügung, welche zwar noch Modifikationen und weitere Evaluation benötigt, aber ein großes Potential in der Diagnostik der MH-Disposition innehat.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine autosomal-dominant vererbte Myopathie, der eine Störung des Kalziumstoffwechsels der quergestreiften Skelettmuskulatur zugrunde liegt. Nach Applikation von Triggersubstanzen wie volatilen Anästhetika oder Succinylcholin kommt es zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsbild mit massiv gesteigerten Muskelstoffwechsel mit Hyperkapnie, Azidose und Hyperthermie. Die Diagnose einer Veranlagung zur MH wird im In-vitro-Kontraktur-Test (IVCT) gestellt. In vorliegender Arbeit wird als diagnostische Alternative die minimal-invasive metabolische Stimulation mit intramuskulär appliziertem Halothan und Koffein untersucht.

Hierzu wurden mit Zustimmung der Ethikkommission in zwei Protokollen insgesamt 16 MH-positive und 15 MH-negative Probanden untersucht. Im Protokoll 1 (Mikroperfusion) wurden nach Lokalanästhesie sonographisch gesteuert zwei auf 15 mm Länge multipel perforierte G16-Kanülen im M. vastus lateralis platziert und in diese jeweils eine Sonde zur CO₂-Messung sowie ein G27-Katheter eingelegt. Nach Äquilibration wurden 500 µl Halothan 10 Vol% injiziert. Nach Erreichen der maximalen Stoffwechselstimulation wurde mit Ringerlösung gespült, die erneute Äquilibration abgewartet und dann 500 µl Koffein 80 mmol/l appliziert. In der zweiten Kanüle war die Injektionsabfolge umgekehrt.

Im Protokoll 2 (direkt i.m) wurden über zwei G18-Kanülen die CO₂-Messsonde und der G27-Zuspritzkatheter direkt in die Muskulatur eingebracht. Über eine Kanüle wurden nach Äquilibration 200 µl Halothan 8Vol%, über die andere 200 µl Koffein 80 mmol/l in den Muskel appliziert. Die Stoffwechselaktivierung und der damit verbundene CO₂-Anstieg wurden aufgezeichnet. Als diagnostisches Kriterium wurde die maximale Anstiegsgeschwindigkeit der CO₂-Entstehung herangezogen.

Für die Applikation von Halothan vor Koffein im Protokoll 1 zeigten sich signifikant unterschiedliche Anstiegsgeschwindigkeiten von 91 mmHg/h (MHS)

gegen 21 mmHg/h (MHN). Halothan nach Koffein erbrachte signifikant höhere Werte von 100 mmHg/h (MHS) gegen 47 mmHg/h (MHN). Nach Stimulation mit Koffein in der maximalen Konzentration zeigten sich keine deutlichen CO₂-Anstiege.

Im Protokoll 2 konnten für die Applikation von Halothan für die MH-positiven Probanden eine nicht signifikant verschiedene Anstiegsgeschwindigkeit von 223 mmHg/h, für die MH-negative Gruppe eine von 159 mmHg/h errechnet werden. Nach Stimulation mit Koffein 80 mmol/l konnte ein maximaler Anstieg von 126 mmHg/h (MHS) beziehungsweise 8 mmHg/h (MHN) beobachtet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mittels der lokalen Stimulation und Messung des CO₂-Partialdruckes eine Unterscheidung zwischen MH-veranlagten und MH-nichtveranlagten Personen möglich ist. Die Stimulation mit Koffein 80 mmol/l direkt intramuskulär kann hierbei die beste Differenzierung gewährleisten, die Optimierung der Halothandosis ist Gegenstand weiterer Studien.

Der metabolische Test kann somit eine Alternative zum invasiveren IVCT darstellen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Gibson C, Tuttle J: Heat stroke as a post-operative complication. *Med News* 1900; 77:883-888.
2. Harrison GG, Isaacs H: Malignant hyperthermia. An historical vignette. *Anaesthesia* 1992; 47:54-56.
3. Denborough M, Lovell R: Anaesthetic death in a family. *Lancet* 1960; 2:45-50.
4. Anetseder M, Müller C: Maligne Hyperthermie. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2003; Band 40:324-335.
5. Steinfath M, Wappler F, Scholz J: Maligne Hyperthermie: Allgemeine, klinische und experimentelle Aspekte. *Anaesthesist* 2002; 51:328-347.
6. Harrison GG: Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br J Anaesth* 1975; 47:62-65.
7. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M: Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000; 80:1215-1265.
8. Brini M: Ryanodine receptor defects in muscle genetic diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322:1245-1255.
9. 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.
10. Avila G: Intracellular Ca²⁺ dynamics in malignant hyperthermia and central core disease: established concepts, new cellular mechanisms involved. *Cell Calcium* 2005; 37:121-127.
11. Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F: Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 2000; 23:4-17.
12. Wappler F, Roewer N, Köchling A: Effekte von Serotonin-2-Rezeptoragonisten auf Skelettmuskelpräparate von Patienten mit Disposition zu maligner Hyperthermie. *Anaesthesist* 1995; 44:238-244.
13. Duke AM, Hopkins PM, Halsal JP, Steele DS: Mg²⁺ dependence of halothane-induced Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in

- skeletal muscle from humans susceptible to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 2004; 101:1339-1346.
14. Schuster F, Muller R, Hartung E, Roewer N, Anetseder M: Inhibition of sarcoplasmic Ca²⁺-ATPase increases caffeine- and halothane-induced contractures in muscle bundles of malignant hyperthermia susceptible and healthy individuals. *BMC Anesthesiol* 2005; 5:8.
 15. Gerbershagen MU, Wappler F, Fiege M, Weihorn R, Kolodzie K, Schulte Esch J: Inhibition of sarcoplasmic Ca²⁺ adenosine triphosphatase in porcine skeletal muscle samples with cyclopiazonic acid enables in vitro malignant hyperthermia discrimination. *Anesthesiology* 2004; 101:1475-1477.
 16. Larach MG, Localio AR, Allen GC, et al.: A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 1994; 80:771-779.
 17. Kalow W, Britt B, Terrau M, Haist C: Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet* 1970; 11:895-898.
 18. Ellis F, Harriman DGF, Keaney NP, Kyei-Mensah K, JH T: Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 1971; 43:721-722.
 19. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. The European Malignant Hyperpyrexia Group. *Br J Anaesth* 1984; 56:1267-1269.
 20. Rueffert H, Olthoff D, Deutrich C, Froster UG: Aktuelle Aspekte der Diagnostik der malignen Hyperthermie. *Anaesthesist* 2002; 51:904–913.
 21. Wappler F, Anetseder M, Baur CP, et al.: Multicentre evaluation of in vitro contracture testing with bolus administration of 4-chloro-m-cresol for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. *Eur J Anaesthesiol* 2003; 20:528-536.
 22. Bendahan D, Guis S, Monnier N, et al.: Comparative analysis of in vitro contracture tests with ryanodine and a combination of ryanodine with either halothane or caffeine: a comparative investigation in malignant

- hyperthermia. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2004; 48:1019—1027.
23. Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S: Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 2001; 86:283-287.
24. Girard T, Treves S, Voronkov E, Siegemund M, Urwyler A: Molecular genetic testing for malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 2004; 100:1076-1080.
25. Klingler W, Baur C, Georgieff M, Lehmann-Horn F, Melzer W: Detection of proton release from cultured human myotubes to identify malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 2002; 97:1059-1066.
26. Girard T, Cavagna D, Padovan E, et al.: B-lymphocytes from malignant hyperthermia-susceptible patients have an increased sensitivity to skeletal muscle ryanodine receptor activators. *J Biol Chem* 2001; 276:48077-48082.
27. Sei Y, Brandom B, Bina S, et al.: Patients with malignant hyperthermia demonstrate an altered calcium control mechanism in B lymphocytes. *Anesthesiology* 2002; 97:1052–1058.
28. Girard T, Treves S, Censier K, Mueller CR, Zorzato F, Urwyler A: Phenotyping malignant hyperthermia susceptibility by measuring halothane-induced changes in myoplasmic calcium concentration in cultured human skeletal muscle cells. *Br J Anaesth* 2002; 89:571-579.
29. Sawynok J: Pharmacological rationale for the clinical use of caffeine. *Drugs* 1995; 49:37-50.
30. Thiel H, Roewer N. *Anästhesiologische Pharmakotherapie*. Stuttgart, New York: Thieme, 2004.
31. Skrabal F, Trajanoski Z, Kontschieder H, Kotanko P, Wach P: Portable system for on-line continuous ex vivo monitoring of subcutaneous tissue glucose using open-tissue perfusion. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1995; 33:116-118.
32. Trajanoski Z, Brunner GA, Schaupp L, et al.: Open-flow microperfusion of subcutaneous adipose tissue for on-line continuous ex vivo

- measurement of glucose concentration. *Diabetes Care* 1997; 20:1114-1121.
33. Schaupp L, Ellmerer M, Brunner GA, et al.: Direct access to interstitial fluid in adipose tissue in humans by use of open-flow microperfusion. *Am J Physiol* 1999; 276:E401-408.
34. Ellmerer M, Schaupp L, Trajanoski Z, et al.: Continuous measurement of subcutaneous lactate concentration during exercise by combining open-flow microperfusion and thin-film lactate sensors. *Biosens Bioelectron* 1998; 13:1007-1013.
35. Ellmerer M, Schaupp L, Sendlhofer G, et al.: Lactate metabolism of subcutaneous adipose tissue studied by open flow microperfusion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4394-4401.
36. Bodenlenz M, Schaupp LA, Druml T, et al.: Measurement of interstitial insulin in human adipose and muscle tissue under moderate hyperinsulinemia by means of direct interstitial access. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E296-300.
37. Ellmerer M, Schaupp L, Brunner GA, et al.: Measurement of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-flow microperfusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:E352-356.
38. DiametricsMedical: Paratrend continuous blood gas monitoring system – Technical overview.
39. Mueller R, Anetseder M, Hoyer A, Hartung E, Roewer N: Outcome Evaluation of Patients after Muscle Biopsy for Malignant Hyperthermia Testing. *ASA Meeting Abstracts* 2000.
40. Anetseder M, Hager M, Muller-Reible C, Roewer N: Regional lactate and carbon dioxide concentrations in a metabolic test for malignant hyperthermia. *Lancet* 2003; 362:494; discussion 494-495.
41. Hager M: Ein metabolischer Test zur Diagnose einer Maligne-Hyperthermie-Veranlagung. 2005; <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus.t3/volltexte/2005/1348/>.

42. Anetseder M, Hager M, Muller CR, Roewer N: Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test. *Lancet* 2002; 359:1579-1580.
43. Uhlmann D, Pietsch UC, Ludwig S, et al.: Paratrend sensor as a novel method for continuous monitoring of hepatic microperfusion. *Transplant Proc* 2002; 34:3339-3341.
44. Berman P, Tattersall M: Self-poisoning with intravenous halothane. *Lancet* 1982; 1:340.
45. Musser J, Fontana J, Mongan P: The anesthetic and physiologic effects of an intravenous administration of a halothane lipid emulsion (5% vol/vol). *T. Anesth. Analg.* 1999; 88:671-675.

9 ANHANG

Protokoll	Untersuchungstag	Proband	Diagnose	Größe	Gewicht	Alter
				[cm]	[kg]	[Jahre]
Protokoll 1	21.05.2004	126	MHN	160	70	42
Protokoll 1	21.05.2004	127	MHN	170	63	40
Protokoll 1	24.05.2004	128	MHN	171	63	40
Protokoll 1	27.05.2004	130	MHN	170	60	32
Protokoll 1	01.06.2004	131	MHN	169	60	34
Protokoll 1	28.09.2004	135	MHN	164	76	56
Protokoll 1	20.12.2004	137	MHN	179	82	38
Protokoll 1	30.03.2004	120	MHS	187	97	34
Protokoll 1	31.03.2004	121	MHS	172	92	47
Protokoll 1	26.04.2004	123	MHS	155	66	43
Protokoll 1	29.04.2004	124	MHS	195	88	25
Protokoll 1	10.05.2004	125	MHS	175	57	28
Protokoll 1	26.05.2004	129	MHS	180	90	33
Protokoll 1	10.12.2004	136	MHS	186	73	18
Protokoll 2	11.04.2005	144	MHN	160	68	43
Protokoll 2	19.04.2005	145	MHN	165	78	26
Protokoll 2	09.05.2005	148	MHN	180	125	40
Protokoll 2	16.06.2005	150	MHN	162	77	20
Protokoll 2	29.06.2005	153	MHN	171	65	41
Protokoll 2	08.07.2005	156	MHN	172	71	57
Protokoll 2	01.08.2005	157	MHN	162	83	36
Protokoll 2	05.08.2005	160	MHN	174	83	40
Protokoll 2	02.05.2005	146	MHS	170	75	62
Protokoll 2	09.05.2005	147	MHS	181	96	38
Protokoll 2	12.05.2005	149	MHS	190	85	42
Protokoll 2	21.06.2005	151	MHS	185	85	52
Protokoll 2	22.06.2005	152	MHS	164	103	55
Protokoll 2	08.07.2005	154	MHS	180	94	34
Protokoll 2	08.07.2005	155	MHS	172	71	31
Protokoll 2	05.08.2005	158	MHS	187	92	20
Protokoll 2	05.08.2005	159	MHS	168	65	18

Tabelle 1: Biometrische Daten der Probanden aus beiden Protokollen

9 ANHANG

Proband	Diagnose	Start	Min	Max	Ende	Zeit bis Max	Max-Start	Anstieg
		[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[min]	[mmHg]	[mmHg/h]
126	MHN	35	10	34	34	32	-1	-3
127	MHN	40	8	50	49	26	10	29
128	MHN	48	7	48	48	37	0	0
130	MHN	39	4	53	53	41	4	21
131	MHN	43	7	42	42	30	-1	-3
135	MHN	31	6	79	76	25	47	151
137	MHN	50	8	75	75	46	25	42
121	MHS	42	6	72	72	36	30	54
120	MHS	50	11	56	56	31	6	10
123	MHS	45	6	93	91	28	48	132
124	MHS	44	9	101	100	22	57	178
125	MHS	35	9	79	78	40	44	91
129	MHS	44	7	76	74	26	32	83
136	MHS	42	4	91	90	29	49	119

Tabelle 2: Rohdaten der CO₂-Messreihe: Initiale Injektion von Halothan (Protokoll 1)

Proband	Diagnose	Start	Min	Max	Ende	Zeit bis Max	Max-Start	Anstieg
		[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[min]	[mmHg]	[mmHg/h]
126	MHN	37	6	54	52	28	18	39
127	MHN	36	6	68	68	32	33	65
128	MHN	38	6	67	67	36	29	51
130	MHN	42	8	74	67	29	32	84
131	MHN	35	6	50	47	30	15	30
135	MHN	37	6	66	66	44	289	47
137	MHN	44	11	62	60	34	18	29
121	MHS	42	8	78	77	32	37	75
120	MHS	46	10	116	115	40	70	134
123	MHS	40	8	78	78	32	38	90
124	MHS	42	9	97	94	28	55	137
125	MHS	45	8	44	44	31	-2	-3
129	MHS	43	6	85	82	28	43	115
136	MHS	43	5	84	84	30	42	100

Tabelle 3: Rohdaten der CO₂-Messreihe: Injektion von Halothan nach Koffein und Ringer (Protokoll 1)

9 ANHANG

Proband	Diagnose	Start	Min	Max	Ende	Zeit bis Max	Max-Start	Anstieg
		[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[min]	[mmHg]	[mmHg/h]
126	MHN	37,4	7,1	33,4	33,4	31	-3	-8
127	MHN	43,8	7,4	36,2	36,2	35	-7,6	-13
128	MHN	42,2	8,3	39	38,9	35	-3,2	-5
130	MHN	39,5	7,2	39,1	37,9	39	-0,4	-4
131	MHN	38,6	9,3	35,3	35,3	31	-3,3	-7
135	MHN	34,6	5,2	33	33	36	-1,6	-3
137	MHN	44,9	11,1	41,1	41,1	47	-3,8	-16
121	MHS	42,5	10,3	44,3	44,3	37	1,8	3
120	MHS	44,7	14,2	45,6	45,6	29	0,9	1
123	MHS	37,5	10,6	41,6	41,6	30	4,1	8
124	MHS	39,3	7,6	46,1	44	21	6,8	22
125	MHS	38,9	7,9	76,5	76,4	44	37,6	55
129	MHS	50,1	8,3	45,8	45,5	24	-4,3	-9
136	MHS	44,5	10,8	42,6	42,6	37	-1,9	-5

Tabelle 4: Rohdaten der CO₂-Messreihe: Initiale Injektion von Koffein (Protokoll 1)

Proband	Diagnose	Start	Min	Max	Ende	Zeit bis Max	Max-Start	Anstieg
		[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[min]	[mmHg]	[mmHg/h]
144	MHN	40	15	66	44	12	25	145
145	MHN	36	10	100	97	30	64	174
148	MHN	40	15	55	49	15	15	64
150	MHN	35	22	42	36	9	7	55
153	MHN	43	25	73	45	7	30	256
156	MHN	34	22	69	61	13	35	204
157	MHN	40	26	81	59	11	41	278
160	MHN	38	24	54	54	11	17	104
146	MHS	43	27	58	46	11	15	89
147	MHS	36	24	90	84	23	54	202
149	MHS	41	29	125	95	17	84	352
151	MHS	38	15	113	104	26	75	223
152	MHS	40	25	41	41	30	1	3
154	MHS	39	25	73	50	9	34	273
155	MHS	33	16	95	86	14	61	362
158	MHS	43	15	199		9	156	1198
159	MHS	30	24	69	64	23	39	124

Tabelle 5: Rohdaten der CO₂-Messreihe: Injektion von Halothan (Protokoll 2)

9 ANHANG

Proband	Diagnose	Start	Min	Max	Ende	Zeit bis Max	Max-Start	Anstieg
		[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]	[min]	[mmHg]	[mmHg/h]
144	MHN	39,7	29,2	36,9	36,9	-3	35	-5
145	MHN	38,3	10,8	38,5	36,2	15	0,2	1
148	MHN	38,5	15,2	47,1	45	17	8,6	33
150	MHN	33,3	17,6	34,7	34,1	15	1,4	6
153	MHN	36,1	20,8	40,4	40,4	37	4,3	9
156	MHN	34,2	14,6	37,7	37,2	12	3,5	18
157	MHN	40,4	21,7	46	41,4	9	5,6	37
160	MHN	42,6	13,8	35,4	34,8	16	-7,2	-16
146	MHS	33,8	9	53,7	44,7	13	19,9	115
147	MHS	38,9	22,6	42,6	42,6	31	3,7	7
149	MHS	41,3	25,8	56,1	44	12	14,8	79
151	MHS	34,2	26,9	83,4	66,1	16	49,2	301
152	MHS	36,6	21,9	110	90,4	11	73,4	429
154	MHS	38,4	17,6	74,2	56,9	12	35,8	209
155	MHS	40,1	18,4	58,8	47,9	8	18,7	159
158	MHS	43,2	19,9	58,7	50,2	10	15,5	93
159	MHS	26,4	10,5	62,7	61	28	36,3	126

Tabelle 6: Rohdaten der CO₂-Messreihe: Injektion von Koffein (Protokoll 2)

Proband	Diagnose	Myo_prä	Myo_post	Ck_prä	CK_post	pH	BE	pCO ₂ venös
		[U/l]	[U/l]	[U/l]	[U/l]		[mmol/l]	[mmHg]
135	MHN	55	62	116	108	7,42	1,3	39,6
126	MHN	42	35	119	99			
127	MHN	52	45	92	65	7,39	1,3	42,6
128	MHN	60	48	97	88	7,39	-0,4	39,3
130	MHN	36	23	91	83	7,41	3	43
131	MHN	37	37	64	70	7,43	0,4	37,2
137	MHN	54	41	196	158	7,36	2,2	49
121	MHS	82	58	220	182	7,37	0,6	44,5
120	MHS	52	53	171	138	7,4	4	46,5
123	MHS	40	136	99	118	7,39	-1	38,4
124	MHS	56	48	181	170	7,38	1,8	45,4
125	MHS	67	47	472	434	7,4	-1,5	37
129	MHS	66	49	173	143	7,42	1,3	39,5
136	MHS	47	40	169	129	7,38	1,8	44,4

Tabelle 7: Laborwerte der Probanden im Protokoll 1 (CK und Myoglobin vor und nach der Untersuchung sowie venöse BGA nach der Untersuchung)

9 ANHANG

Proband	Diagnose	Myo prä	Myo post	Ck prä	CK post	pH	BE	pCO ₂ venös
		[U/l]	[U/l]	[U/l]	[U/l]		[mmol/l]	[mmHg]
144	MHN	52	42	109	94	7,34	-0,5	45,9
145	MHN	36	36	128	123	7,43	-1,5	33,1
148	MHN	41		158		7,37	-0,9	42
150	MHN	26	21	38	32	7,37	-0,4	42,3
153	MHN	54	56	80	74	7,38	4,7	50,5
156	MHN	68		142	121	7,41	2,1	41,3
157	MHN	37	34	72	67	7,38	-0,5	40,8
160	MHN	53	43	167	146	7,4	1,2	41,6
146	MHS	119	92	625	565	7,39	1,2	42,5
147	MHS	40	44	160	141	7,37	-1,3	40,7
149	MHS	517	488	501	410	7,4	4,5	47,7
151	MHS	61	56	156	138	7,4	2,9	44
152	MHS	35	41	239	213			
154	MHS	61	51	149	141	7,4	1,5	42,3
155	MHS	44	49	81	67	7,37	2	46,2
158	MHS	47	47	495	442	7,41	1,2	40,4
159	MHS	29	27	80	66	7,4	0	39,6

Tabelle 8: Laborwerte der Probanden im Protokoll 2 (CK und Myoglobin vor und nach der Untersuchung sowie venöse BGA nach der Untersuchung)

DANKSAGUNG

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

Herrn Prof. Dr. med. N. Roewer, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg möchte ich für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und die Übernahme des Koreferates danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Anetseder für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während und nach der Studie. Seine Anregungen und stete Bereitschaft zur Diskussion haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an das Team im MH- und Anästhesielabor und im Aufwachraum, das mir durch seine freundliche Unterstützung die Arbeit sehr erleichtert hat.

Für die großartige Unterstützung während des Studiums und der Promotion sowie für den Rückhalt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ohne meine Eltern und meine Frau wäre mir all dies nicht möglich gewesen.

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

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name : Daniel Mathias Holzheid

Geburtsdatum: 10. Februar 1980

Geburtsort: Erlangen

Anschrift: Goethestr. 20
97318 Kitzingen

Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1990-1999 Neusprachliches Gymnasium Frankenlandschulheim
Schloss Gaibach

06/1999 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1999 - 06/2000 Zivildienst beim Bayerischen Roten Kreuz Kitzingen

Hochschulbildung

10/2000 Aufnahme des Studiums der Medizin an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

09/2002 Ärztliche Vorprüfung

09/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10/2005 - 01/2006 Innere Medizin Spital Uster, Schweiz

02/2006 - 05/2006 Chirurgie Universitätsklinik Würzburg

06/2006 - 07/2006 Anästhesie John-Radcliffe-Hospital Oxford, GB

08/2006 - 09/2006 Anästhesie Universitätsklinik Würzburg

CURRICULUM VITAE

Famulaturen

- 03/2003 Innere Medizin; Kreiskrankenhaus Kitzingen
- 03/2004 Allgemeinmedizin; Praxis Rupin/Wütscher, Sulzheim
- 08/2004 Accident and Emergency; Poole General Hospital,
Poole, GB
- 03/2005 Anästhesie und Intensivmedizin; Universität Tübingen

Beruflicher Werdegang

- Seit 12/2006 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie der Universität Würzburg

Würzburg, im Mai 2007



Daniel Holzheid