Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. J. Schulte am Esch

Untersuchung zur Bedeutung des Lokalanästhetikums Dibucain in der Diagnostik und als Triggersubstanz der Malignen Hyperthermie

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Georg Weiß

aus Freising

Hamburg, 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 23.03.2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. F. Wappler

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Priv. Doz. Dr. D. Kluth

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. St. Hockertz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis....2

Abkürzungen....4

1. Einleitung....5

1.1. Die Maligne Hyperthermie....5

1.2. Lokalanästhetika....12

1.2.1. Dibucain....16

1.3. Lokalanästhetika und Maligne Hyperthermie....18

1.4. Ziel der Arbeit....22

2. Methodik....23

2.1. In-vivo Experimente....23

2.1.1. Versuchstiere....23

2.1.2. Versuchsdurchführung....23

2.1.3. MH-Induktion mit Dibucain....26

2.2. In-vitro-Experimente....26

2.2.1. Standard-Diagnostik der MH....26

2.2.1.1. In-vitro Kontrakturtest mit Halothan....28

2.2.1.2. In-vitro Kontrakturtest mit Koffein....29

2.2.1.3. Definiton des MH-Status....29

2.2.2. Zusatzdiagnostik mit kumulativer Dibucain-Gabe....29

2.3. Statistische Auswertung....30

3. Resultate....31

3.1. In-vivo Experimente....31

3.2. In-vitro Experimente....41

3.2.1. Standard-Diagnostik der MH....41

3.2.2. In-vitro Kontrakturtest mit kumulativer Dibucain-Gabe....41

4. Diskussion.....45

4.1. In-vivo Experimente……47

4.2. In-vitro Experimente……51

4.3. Schlußfolgerungen……60

5. Zusammenfassung…….....……...61

6. Literaturverzeichnis…….……62

7. Danksagung……...……75

8. Lebenslauf…….....……76

9. Erklärung…….....…….……77

Abkürzungen

4-CmC	4-Chloro-m-Cresol
AP	Aktionspotential
Ca^{2+}	Calcium
CGS	Clinical Grading Scale
CK	Creatinphosphokinase
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
EMHG	European Malignant Hyperthermia Group
$etCO_2$	Endtidale CO_2 -Konzentration
FiO_2	Fraction of inspired oxygen
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
IP_3	1,4,5-Inositoltriphosphat
IVKT	In-vitro Kontrakturtest
K^+	Kalium
LA	Lokalanästhetikum/a
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MH	Maligne Hyperthermie
MH-E	Maligne Hyperthermie Equivokal
MH-N	Maligne Hyperthermie Normal
MH-S	Maligne Hyperthermie Suszeptibel
MHAUS	Malignant Hyperthermia Association of the United States
NAMHG	North American Malignant Hyperthermia Group
pCO_2	CO_2 –Partialdruck
RYR1	Ryanodin-Rezeptor 1
SaO_2	arterielle O_2 -Sättigung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SVES	Supraventrikuläre Extrasystole
VES	Ventrikuläre Extrasystole
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVD	Zentral-venöser Druck

1. Einleitung

1.1. Die Maligne Hyperthermie (MH)

Definition

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine potentiell lebensgefährliche, hereditäre und akut verlaufende pharmakogenetische Erkrankung, der eine Dysregulation der intrazellulären Calciumhomöostase zugrunde liegt [40, 70, 79, 112]. Der Vererbungsgang beim Menschen wird als autosomal dominant mit variabler Penetranz beschrieben [6]. Bei vorhandener Disposition können verschiedene Faktoren Auslöser einer MH-Krise sein. Beim Menschen sind dies vor allem volatile Inhalationsanästhetika und depolarisierende Muskelrelaxanzien, wie sie bei Allgemeinanästhesien zum Einsatz kommen. Die MH äußert sich in einer hypermetabolen Stoffwechsellage [40, 112]. Das MH-Syndrom ist auch in der Veterinärmedizin im Zusammenhang mit Streß-induzierten „Hitzeschäden“ (z.B. beim Schwein) bekannt.

Geschichte

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts finden sich erste Literaturhinweise zu einem hyperthermen Syndrom während operativer Eingriffe in Allgemeinanästhesie, welches als „Hitzeschlag“ interpretiert wurde [38, 83]. Im Jahre 1960 fanden Denborough und Lovell zum ersten Mal einen Zusammenhang dieses Syndroms mit einer genetischen Prädisposition und der Allgemeinanästhesie als auslösendem Faktor [24]. In den 60er Jahren wurde gezeigt, dass englische Landrassenschweine nach der Gabe des depolarisierenden Muskelrelaxans Succhinylcholin und des Inhalationsanästhetikums Halothan unter den Symptomen Hyperthermie und Muskelrigor verstarben [11, 43]. Diese Beobachtungen führten zur Entwicklung des experimentellen Tiermodells, welches sich hinsichtlich klinischer und laborchemischer Parameter nur gering von der menschlichen MH unterscheidet. In den frühen 70er Jahren gewann die MH auch hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz zunehmend an Bedeutung und zu Beginn der 80er Jahre galt sie sowohl in den USA als auch Europa als häufigste Todesursache bei Narkosen [22, 27, 101].

Zur Untersuchung der menschlichen MH-Suszeptibiltität dient der in den sechziger Jahren entwickelte in-vitro-Kontrakturtest (IVKT) mit Skelettmuskelpräparaten unter Zugabe von Koffein und Halothan [28, 58]. Dieser Test erfolgt in Europa standardisiert nach dem Protokoll der „European Malignant Hyperthermia Group“ (EMHG) [29]. Im nordamerikanischen Raum kommt

das Protokoll der „North American Malignant Hyperthermia Group“ (NAMHG) zur Anwendung [66].

Epidemiologie

Die Maligne Hyperthermie kommt bei allen Menschenrassen vor und ist zudem unabhängig von Alter und Geschlecht [101]. In Nordamerika wird die Inzidenz bei Kindern mit 1:15.000, bei Erwachsenen mit 1:50.000 – 1:150.000 angegeben [14]. Eine dänische Studie gibt die Inzidenz bei der Gesamtheit aller Allgemeinanästhesien mit 1:220.000, bei Narkosen unter Verwendung volatiler Anästhetika und depolarisierender Muskelrelaxanzien, den bekannten potenten Triggersubstanzen der MH, mit 1:62.000 an [88]. Für Deutschland wurde die Inzidenz der Malignen Hyperthermie mit 1:60.000 errechnet [63]. Diese stark divergierenden Werte lassen sich zum einen durch Unterschiede in den MH-Diagnose-Protokollen erklären, zum anderen durch schwer diagnostizierbare abortive MH-Krisen und durch den extrem variablen klinischen Verlauf [63].

Pathophysiologie

Die physiologische Kontraktion der Skelettmuskelzelle wird durch Ca^{2+}-Ionen gesteuert. Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR), die in den transversalen Tubuli der Skelettmuskelmembran lokalisiert sind, werden über ein Aktionspotential (AP) aktiviert und durchlaufen eine Konformationsänderung. Dadurch erfolgt ein langsamer Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle. Dies und die vermutete Kopplung von DHP-Rezeptoren und den Ryanodinrezeptoren (RyR1) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), bewirken den Calziumausstrom aus dem SR in das Cytoplasma [40, 112, 119]. Die freie, ionisierte cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration steigt hierbei von 10^{-7} auf $5 \cdot 10^{-5}$ M an. Das Calcium führt zu einer Konformationsänderung des Troponins der Aktin-Filamente. Daraus resultiert die Aktivierung des kontraktilen Apparates durch Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten. Nach Dissoziation der Ca^{2+}-Ionen vom Troponin bewirken ATP-abhängige Calcium-Pumpen (Ca^{2+}-ATPase) im longitudinalen System des SR eine rasche Wiederaufnahme von Calcium und somit die Relaxation des Muskels.

Der myoplasmatische Calciumanstieg übersteigt nach Gabe bekannter MH-Triggersubstanzen (volatile Anästhetika und Succinylcholin) die physiologischen Konzentrationen um ein Vielfaches. Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt. Bei Schweinen

ließ sich ein Defekt des Ryanodin-Rezeptors nachweisen, hervorgerufen durch eine Punktmutation auf dem Chromosom 6 [36, 93].

Bei MH-S-Schweinen (Maligne Hyperthermie suszeptibel) konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu MH-N (Maligne Hyperthermie normal) geringere cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentrationen zur Aktivierung des Ry-Rezeptors und damit zur Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR notwendig sind [85]. Zudem ist die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ry-Rezeptors bei Schweinen und Menschen für MH-S signifikant höher als für MH-N [30]. Bei menschlichen MH-S-Anlageträgern ließ sich eine Mutation des Ry-Rezeptors, lokalisiert auf dem Chromosom 19, nur in weniger als 20% der untersuchten MH-Fälle nachweisen [42]. Andere mit MH assoziierte Mutationen betreffen den DHP-Rezeptor und sind auf den Chromosomen 1, 3, 5, 7 und 17 lokalisiert [23]. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei der menschlichen MH um ein heterogenetisches Geschehen mit dominantem Erbgang handelt [6, 98, 112].

Der erhöhte Gehalt an myoplasmatischem Calcium führt zu einer verlängerten und verstärkten Interaktion der kontraktilen Filamente in der Skelettmuskulatur. Auch die Ca^{2+}-abhängigen Stoffwechselprozesse werden verstärkt aktiviert [70]. Dies mündet in die bei MH beobachteten Symptome, wie CO_2- und Temperaturanstieg, hypermetabole Stoffwechselentgleisung und Lactatazidose. Die inadäquate Versorgung der Zellen mit Sauerstoff führt zu einer Verschlechterung der initial gesteigerten aeroben Energiegewinnung. Lactatazidose und intramitochondriale Ca^{2+}-Akkumulation mit konsekutiver Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung wirken schließlich zytotoxisch [112]. Im Rahmen einer fulminanten MH-Krise kommt es bei Verlust der Zellintegrität zu einer zunehmenden Membranpermeabilität für Ionen, Moleküle bzw. Enzyme. Dies führt dann bei ausbleibender therapeutischer Intervention letztendlich zum irreversiblen Zelluntergang und konsekutiv auch zum Zusammenbruch der Organfunktionen [101, 112].

Neben der Aktivierung der intrazellulären Ca^{2+}-Freisetzung über den Ryanodin-Dihydropyridin-Rezeptorkomplex werden noch weitere Einflussmechanismen auf die intrazelluläre Ca-Regulation diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass der Inositolphosphat-Stoffwechsel in der Skelettmuskulatur MH-disponierter Schweine und Menschen gesteigert ist [106]. Schlüsselsubstanz ist hierbei der intrazelluläre Botenstoff 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP_3), welcher bei MH-Disposition signifikant erhöht ist und seinerseits Ca^{2+}-freisetzende Eigenschaften besitzt [12]. Es ist somit vorstellbar, dass durch eine gesteigerte IP_3-Synthese vermehrt Ca^{2+} in das Cytoplasma freigesetzt wird.

Ein weiterer Faktor für die Entwicklung der Malignen Hyperthermie scheint physischer und psychischer Streß zu sein. Auch wenn die tierexperimentellen Untersuchungen bislang keine eindeutigen Befunde ergaben und bei MH-S-Patienten bislang kein direkter Nachweis einer Stressinduktion der MH geführt werden konnte, muß aufgrund der klinischen Beobachtung von einer möglichen Gefährdung durch Streß ausgegangen werden. Der Anteil der hiervon betroffenen MH-S-Patienten scheint allerdings äußerst gering zu sein [112].

Die pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der MH beschränken sich nicht nur auf die Skelettmuskulatur, sondern manifestieren sich zudem auch an anderen Organsystemen, wie Herz, Zentrales Nervensystem (ZNS) und Leber. Bereits in der Frühphase einer MH-Krise kommt es zu Störungen der Herz-Kreislauffunktion, wie komplexen Rhythmusstörungen, Reduktion des HZV und des systemischen Druckes. Bislang ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Störungen primärer Natur sind, oder Folge von Hyperthermie, Azidose und Elektrolytentgleisungen. Für eine primäre Myokardbeteiligung sprechen jedoch Veränderungen im Inositolphosphatgehalt im Herzmuskel von MH-S-Schweinen sowie eine erhöhte Empfindlichkeit des Myokard gegenüber β-adrenerger Stimulation. Für eine Beteiligung des ZNS sprechen EEG-Veränderungen, die bei beginnender MH-Krise regelmäßig vor Veränderungen systemischer Parameter bei Schweinen gemessen werden konnten. Durch Gabe von Dantrolen, dem Goldstandard in der medikamentösen Therapie der MH, ließ sich die hirnelektrische Aktivität wieder normalisieren. Die gestörte Ca^{2+}-Homöostase manifestiert sich bei MH-S-Schweinen auch an den Hepatozyten. Hier konnte nach Exposition mit Halothan eine im Vergleich zu MH-N signifikant höhere Ca^{2+}-Freisetzung gemessen werden [112]. Diese pathophysiologischen MH-Veränderungen sind somit im Sinne einer Systemerkrankung zu interpretieren [112].

Klinik und Therapie

Das klinische Erscheinungsbild der MH ist sehr variabel. Es reicht von abortiven Verlaufsformen mit gering ausgeprägter klinischer Symptomatik über fulminante Verläufe bis hin zu perioperativen Todesfällen und Herzstillständen [101, 112]. Die Ursachen für die klinische Variabilität der MH sind in der unterschiedlichen Potenz und Konzentration der triggernden Substanz und der Expositionsdauer begründet, aber auch in individuellen Eigenschaften, die vermutlich auf die multigenetische Vererblichkeit zurückgehen.

Der Begriff „abortive Verlaufsform“ beschreibt eine klinische Situation, die neben einem möglichen, aber nicht obligaten, Trismus weitere Symptome, wie metabolische Azidose, Arrhythmien, Tachykardien und einen im Verlauf deutlichen CK-Anstieg mit einschließen [119]. Bei der abortiven MH-Krise können die in Tabelle 1 aufgeführten Symptome abgeschwächt sein oder gänzlich fehlen. Die klinische Symptomatik kann derart unspezifisch bleiben, dass diese Verlaufsformen oftmals nicht als MH erkannt werden [40, 112].

Tabelle 1: Klinische Symptome der Malignen Hyperthermie

Frühzeichen der MH	Spätzeichen der MH
- endexpiratorischer CO_2-Anstieg	- komplexe Arrhythmien
- metabolische Azidose	- Zyanose und Hypoxämie
- Muskelrigor und/oder Trismus	- Hypotension
- fleckige Rötung der Haut („flush“)	- Elektrolytverschiebungen
- Sinustachykardie	- Rhabdomyolyse
	- Hyperthermie

Modifiziert nach: Urwyler A [119]

Die fulminante MH-Krise (etwa 6,5% aller MH-Fälle) ist definiert als Symptomenkomplex, der klinisch unzweifelhaft die Diagnose einer MH zulässt [112, 119]. Dabei kommt es nach Gabe der Triggersubstanz zu einer Calcium-vermittelten Steigerung des aeroben und anaeroben Stoffwechsels, der sogenannten hypermetabolen Stoffwechsellage. Calcium steigert den Körpermetabolismus sowohl direkt durch die gesteigerte Glykolyse, als auch indirekt durch den erhöhten Bedarf an ATP [48]. Es kommt zu einer gesteigerten Wärme-, CO_2- und Lactatproduktion. Dies führt konsekutiv zu einer metabolischen und respiratorischen Azidose. Zusammen mit dem Anstieg der endexpiratorischen CO_2-Konzentration gilt dies als sehr spezifisches Frühzeichen einer sich abzeichnenden MH-Krise [112]. Die gesteigerte CO_2-Produktion äußert sich als Hyperkapnie beim beatmeten, und als Hyperventilation beim spontan atmenden Patienten. Ein weiteres zuverlässiges Frühzeichen kann der Spasmus des M. masseter – Trismus genannt – nach der Gabe von Succinylcholin sein, wenn dieser länger als 30 Sekunden anhält [112]. Die Inzidenz des Trismus als Frühzeichen wird mit 40 – 80% angegeben [14]. Muskelrigor und Sinustachykardie sind in mehr als 80% der MH-Episoden nachweisbar, jedoch keinesfalls als obligat anzusehen [75].

Die Hyperthermie gilt als spätes Symptom. Als Folge der Rhabdomyolyse kann es zu Hyperkaliämie, Myoglobämie und einem Anstieg der Transaminasen sowie der Creatinphosphokinase (CK) kommen. Diese Zeichen werden ebenfalls zu den Spätsymptomen gerechnet. Zusätzlich können Verbrauchskoagulopathie, Lungen- und Hirnödem, sowie Leber und Nierenversagen

hinzutreten [101, 112, 119]. Als unmittelbare Todesursache ist zumeist die Asystolie zu nennen [40].

Generell gilt, dass bei der Verdachtsdiagnose MH differentialdiagnostisch klinisch ähnliche Krankheitsbilder, wie Hyperthyreoidismus, Phäochromozytom, Bakteriämie, Porphyrie, Hypoxämie, Hypovolämie und das Maligne Neuroleptische Syndrom (MNS) in Betracht gezogen werden sollten [40, 112, 119].

Ist die Diagnose MH bei einer Allgemeinanästhesie gestellt, oder gilt sie als sehr wahrscheinlich, so ist wie folgt zu verfahren: Als sofortige Maßnahme wird die Anästhesie auf triggerfreie Substanzen umgestellt und mit Opioiden und Sedativa vertieft, die Relaxierung erfolgt mit einem nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans. Die kontrollierte Beatmung wird zur Aufrechterhaltung bzw. Normalisierung der Sauerstoffsättigung mit reinem Sauerstoff (FiO_2 = 1,0) und einem Frischgasfluß von mindestens 10 l/min fortgeführt. Die endtidale CO_2-Konzentration wird durch Hyperventilation (ca. 3-4faches Atemvolumen) auf Normalwerte eingestellt. Parallel hierzu müssen erste Blutproben (Blutgasanalyse, Elektrolyte, CK, Transaminasen, Lactat und Myoglobin) zur Sicherung der Diagnose entnommen werden. Ein Austausch des Narkosegerätes ist nicht erforderlich, lediglich der Narkosegasverdampfer soll entfernt werden [40]. Als Therapeutikum ist Dantrolen das Mittel der Wahl, ein direkt wirkendes Muskelrelaxans, das die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR verhindert, ohne die Wiederaufnahme zu beeinflussen. Darüber hinaus senkt Dantrolen die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration auch in Ruhe und wirkt somit gering muskelrelaxierend [43]. Dantrolen, welches direkt am RYR1 bindet, blockiert dabei unspezifisch die Signaltransduktion vom Dihydropyridinrezeptor auf den RYR1 [96]. Zunächst sollten 2,5 mg/kg/KG Dantrolen als Schnellinfusion appliziert werden. Die Bolusgabe von Dantrolen muß eventuell mehrmals in fünfminütigen Abständen wiederholt werden, bis sich die hypermetabole Stoffwechsellage wieder normalisiert hat und keine MH-Symptome mehr nachweisbar sind. Sollten allerdings Dantrolenbolusgaben von mehr als 20 mg/kg/KG ohne Erfolg bleiben, so ist die Diagnose MH als fraglich anzusehen [112]. Anschließend wird die Dantrolentherapie in einer Dosierung von 10 mg/kg/KG über die ersten 24 Stunden bei intensivmedizinischer Überwachung fortgeführt, um nach initial erfolgreicher Primärtherapie ein erneutes Auftreten von MH-Symptomen zu verhindern. Eine metabolische Azidose sollte frühzeitig mit Natriumhydrogencarbonat (1-2 mval/l) nach Maßgabe des Säure-Basen-Status korrigiert werden. Da Lactat nur sehr langsam durch die Zellmembran austritt, kann dies zu wiederholtem Bedarf an Natriumhydrogencarbonat führen. Kardiale Arrhythmien bessern sich meist unter Gabe von Dantrolen, Steigerung der Ventilation

und Korrektur der Azidose. Bei therapierefraktären Herzrhythmusstörungen auch unter Dantrolentherapie ist eine antiarrhythmische Therapie mit Lidocain oder Betablockern indiziert. Vom Einsatz von Calciumantagonisten wird abgeraten, da durch eine Interaktion mit Dantrolen eine Hyperkaliämie induziert werden kann [104]. Der Anstieg der Körpertemperatur ist selten ein Frühsymptom der MH-Krise, daher gehören Oberflächenkühlung, Infusion von kalten Lösungen und Eiswasserspülungen in der Regel zu den Sekundärmaßnahmen. Ein dieser Situation angemessenes Monitoring umfasst neben zusätzlichen perivenösen Zugängen das Einlegen einer arteriellen Kanüle und eines zentralvenösen Katheters. Zur Therapie einer Hyperkaliämie empfiehlt sich neben einer forcierten Diurese mittels Schleifendiuretika die Gabe einer Glucose-Insulin-Lösung. Durch Schleifendiuretika kann zusätzlich einem durch Rhabdomyolyse und Schocksymptomatik bedingten Nierenversagen vorgebeugt werden. Die Urinproduktion sollte hierbei auf Werte von mindestens 1-2 ml/kg/KG/h gesteigert werden. Zum Monitoring der Nierenfunktion muß ein Blasenkatheter gelegt werden. Bei schwerer Schocksymptomatik sind Fälle von disseminierter intravasaler Verbrauchskoagulopathie beschrieben worden. Daher sollten diese Patienten eine frühzeitige low-dose-Heparinisierung erhalten.

Bei rechtzeitiger Diagnosestellung kann die MH in den meisten Fällen erfolgreich therapiert werden, die Mortalität sank in den letzten Jahren auf Werte unter 10% [112].

Triggersubstanzen der MH

Die maligne Hyperthermie wird beim Menschen vor allem durch alle bekannten volatilen Inhalationsanästhetika, wie Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran, sowie depolarisierende Muskelrelaxanzien vom Succhinylcholin-Typ ausgelöst [40, 101]. Wenn Succhinylcholin verwandt wird, kann die Zeit bis zum Auftreten erster Symptome besonders kurz sein [40]. Es sind jedoch einige Fälle publiziert, in denen Patienten nach diversen komplikationslosen Allgemeinanästhesien in ihrer Vorgeschichte unter Verwendung potenter MH-Triggersubstanzen Maligne Hyperthermie entwickelten [8]. Der Mechanismus der MH-Triggerung ist nach wie vor nicht in allen Einzelheiten geklärt [40]. Weitere Substanzen stehen im Verdacht, ebenfalls als MH-Trigger zu wirken. So löst 4-Chloro-m-Cresol (4-CmC) die MH im Tiermodell aus. Cresolhaltige Medikamente sind daher bei Patienten mit MH-Disposition kontraindiziert [124]. MAO-Hemmer und tricyclische Antidepressiva gelten zwar nicht als Triggersubstanzen, können aber klinisch ähnliche Symptome auslösen und sollten daher vermieden werden [32]. Der Einsatz von Barbituraten, Antihistaminika, Antibiotika, nicht-depolarisierenden Muskelrelaxanzien, Katecho-

laminen, i.v. Narkotika und Lokalanästhetika vom Ester-Typ ist hinsichtlich einer MH unbedenklich [6, 60, 94].

Präsymptomatische Diagnostik

Die präsymptomatische Diagnostik erfolgt weltweit anhand des „in-vitro-Kontrakturtestes“ (IVKT), in Europa standardisiert nach dem Protokoll der „European Malignant Hyperthermia Group“ [29]. Durch Biopsie aus dem M. vastus lateralis gewonnene Muskelfasern werden dazu supramaximal elektrisch gereizt, die hierdurch ausgelösten Kontraktionen protokolliert. Durch Zugabe von Halothan sowie Koffein werden Kontraktur-Schwellenwerte ermittelt. Diese ermöglichen dann die Einteilung der Patienten in verschiedene diagnostische Gruppen. Die Diagnose einer MH-Disposition (MH-S, MH-susceptible) erfolgt nach pathologischer Kontraktur bei Koffein und Halothan. Eine MH-Disposition ist ausgeschlossen (MH-N, MH-normal), wenn auf keine der beiden Testsubstanzen Kontrakturen oberhalb der Schwellenwerte gemessen wurden. Die Diagnose MH-E (MH-equivocal) wird gestellt, wenn entweder auf Halothan oder Koffein pathologische Kontrakturen gemessen wurden. Hierbei wird weder eine MH-Disposition diagnostiziert, noch kann sie ausgeschlossen werden. Diese Patienten werden klinisch dennoch vorsichtshalber wie MH-S Patienten behandelt.

Der IVKT mit Halothan und Koffein gilt als sicheres Verfahren. Die Sensitivität wird mit 99,0%, die Spezifität mit 93,6% angegeben [90]. Somit sind falsch negative Testresultate nicht in allen Fällen auszuschließen [55].

1.2. Lokalanästhetika

Lokalanästhetika (LA) sind chemische Verbindungen, die drei Komponenten enthalten. Sie bestehen aus einer lipophilen Gruppe, dem aromatischen Rest und einer hydrophilen Gruppe, zumeist ein tertiäres-, in seltenen Fällen auch ein sekundäres Amin. Verbunden sind diese beiden Gruppen durch die sogenannte Verbindungskette, Ester oder Amid, wodurch sich eine Einteilung der LA in solche vom Ester- oder Amid-Typ ergibt. Amide gelten im Gegensatz zu Estern als in Lösung relativ stabil, erstere werden in der Leber enzymatisch metabolisiert oder unverändert renal ausgeschieden. Ester-Typ LA sind hingegen instabile Substanzen, die schnell von der Plasmacholinesterase hydrolytisch metabolisiert werden [19].

Die klinische Bedeutung der LA besteht in ihrer Fähigkeit, die Reizfortleitung in peripheren Nerven temporär zu blockieren [19]. Dies geschieht durch Interaktion mit spannungsabhängigen Natrium-Kanälen der Nervenmembran, deren Öffnungswahrscheinlichkeit herabgesetzt wird [46, 47]. Die Blockade setzt zuerst in autonomen, dann in sensorischen und schließlich in motorischen Nervenfasern ein und bildet sich in umgekehrter Reihenfolge zurück. Generell gilt, dass sowohl der Nervenfasertyp als auch die Nervenfasergröße die Wirkung von LA beeinflussen. Dünne und nicht-myelinisierte Fasern werden am schnellsten blockiert. Der genaue Mechanismus, über den LA wirken, ist nicht letztlich geklärt [9, 15]. Folgendes Modell wird aber favorisiert: LA durchdringen die Nervenmembran und equilibrieren im Axoplasma. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses hängt wesentlich vom pK_a-Wert des Pharmakons und von der Lipophilie seiner Base ab. Die Bindung der LA an spannungsgesteuerte Na^+-Kanäle bewirkt eine Änderung in deren Konformation, die die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kanäle herabsetzt [9]. Ein Modell der Struktur und Funktionsweise eines spannungsgesteuerten Na^+-Kanals kann Abbildung 1 entnommen werden.

Lokalanästhetika sind schwache Basen, die nur als saure Salze (z.B. als Hydrochloride) wasserlöslich sind. Der pH-Wert der Injektionslösungen variiert von pH 4-6, der pKa-Wert liegt zwischen 7,8 und 9. Demzufolge liegen bei einem physiologischem pH von 7,35 - 7,45 nur 3-20% der LA in nicht-ionisierter und somit lipidlöslicher Form vor [33]. Nur so kann die Nervenmembran durchdrungen werden. Die Bindung der LA an den Natrium-Kanal ist umso stärker, je mehr Kanäle aktiviert sind. Daraus lässt sich folgern, dass LA vermittels ihrer Lipophilität an den Rezeptor gelangen und durch Ladung dort gehalten werden. Beginn und Dauer der Nervenblockade hängen hauptsächlich von der Diffusionsgeschwindigkeit der LA durch die Nervenmembran, in geringerem Ausmaß von ihrer vergleichsweise entschieden schnelleren Bindung an die Rezeptoren ab [9].

Cocain kam in Europa 1884 durch *Koller* zum erstenmal als Lokalanänesthetikum bei Augenoperationen zur klinischen Anwendung. Das suchterzeugende Potential von Cocain, sowie die kurze Haltbarkeit führten zur Suche nach neuen Substanzen. Dies gelang 1905 mit der Synthese von Procain durch *Einhorn* [33, 122]. Dibucain fand 1930 erstmals für Spinalanästhesien Verwendung [53]. Lidocain wurde 1944, Bupivacain im Jahre 1963 in die Klinik eingeführt [122].

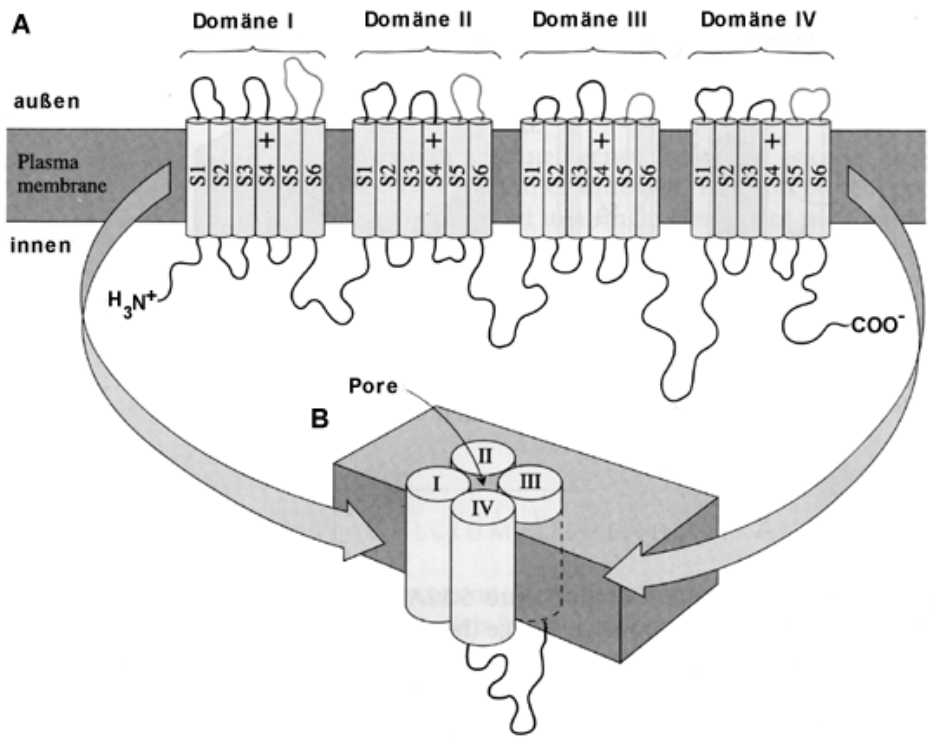

Abbildung 1

Modell eines spannungsgesteuerten Na^+-Kanals. Modifiziert nach: *Matthews GG [74]*

A: Die Primärsequenz der großen Untereinheit des Na^+–Kanals enthält vier repetitive Domänen die jeweils 6 Helices (S1-S6) enthalten und welche in die Zellmembran eingelagert sind. Eine Helix ist eine stabförmige Struktur aus Polypeptiden, deren Hauptkette den inneren Teil des Stabes bildet, während die Seitenketten in schraubenartiger Anordnung nach außen weisen. Als Domänen bezeichnet man kompakte globuläre Einheiten mehrerer Helices, die zwischen 200 und 400 Aminosäuren enthalten und räumlich sehr vielgestaltig sein können.

B: Die Primärsequenzen sind so angeordnet, dass jeweils die Helix „S3“ einer Domäne die innere Begrenzung der Kanalpore bildet. Helix „S4“ ist an die Kanal-bildende Helix „S3“ gekoppelt und enthält überwiegend positiv geladene Aminosäuren. Diese Ladungen werden in der Zellmembran durch die überwiegend negativ geladenen Aminosäuren der Helix „S5“ stabilisiert. Bei Depolarisierung der Zellmembran kommt es zu einer seitlichen Verschiebung der Helices „S3“ und „S4“. Daraus resultiert ein Auseinanderweichen der 4 „S3“-Helices der Domänen I-IV, der Kanal öffnet sich. Es wird vermutet, dass dieser Öffnungsmechanismus durch Bindung von Lokalanästhetika an Helix „S4“ und „S5“ blockiert wird [15].

Lokalanästhetika gelten als gut verträgliche und, wenn in therapeutischen Dosen gegeben, nebenwirkungsarme Substanzen [9, 33]. Unerwünschte Wirkungen zeigen sich bei Unverträglichkeitsreaktionen und Überdosierung. Symptome zeigen sich dann vor allem an ZNS und Herzkreislaufsystem, bei ersterem bereits bei niedrigeren Dosen als am Herzen. Es treten primär Schwindel, Benommenheit und Übelkeit auf, gefolgt von Akkomodationsstörungen und Tinnitus. Zeichen von Toxizität am ZNS sind meist zunächst exzitatorischer Natur, wie Tremor, gefolgt von generalisierter ZNS-Depression bis hin zum Atemstillstand [9, 33]. In niedrigen Dosen führen LA zu Vasokonstriktion, in hohen Dosen zu Vasodilatation. Das allergene Potential von Amid-Lokalanästhetika ist im Vergleich zu LA vom Ester-Typ als gering einzuschätzen. Hierfür wird das Abbauprodukt der Ester-LA, die p-Aminobenzoesäure verantwortlich gemacht [9].

Neben Ihrem Einsatz als Lokalanästhetika kommen Natriumkanalblocker auch als Antiarrhythmika zur klinischen Anwendung. Pharmakologischer Wirkort sind hierbei, ähnlich wie am Nerven, spannungsabhängige Natriumkanäle des Myokards. Folge dieser Kanalblockierung ist die Verlängerung der relativen Refraktärzeit, der Zeit also, die vergeht bis sich der Natriumkanal wieder vollständig von seiner Inaktivierung erholt hat. Dies dient der Unterdrückung frühzeitig einfallender Extrasystolen. Die antiarrhythmische Wirkung ist hierbei umso größer, je häufiger ein Natriumkanal pro Zeiteinheit aktiviert, je größer somit also die Herzfrequenz ist („use-dependent block“) [16, 33]. Lidocain und die chemisch verwandten Substanzen Mexiletin und Tocainid, Antiarrhythmika der Klasse Ib nach *Vaughan* und *Williams*, werden zur Akuttherapie komplexer ventrikulärer Arrhythmien eingesetzt. Den antiarrhythmischen Eigenschaften der Klasse-I-Substanzen steht allerdings deren proarrhythmogenes Potential gegenüber. Durch myokardiale Leitungsverzögerung wird die Auslösung kreisender Erregungen begünstigt. Die Folge können irreversible Tachykardien, ventrikuläre und supraventrikuläre Extrasystolen, sowie Kammerflattern und –flimmern sein [16, 33]. Im Tierversuch zeigte sich das ausgeprägte proarrhythmogene Potential von Bupivacain und Etidocain. Ventrikuläre Arrhythmien ausgelöst durch Lidocain, Mepivacain und Tetracain treten vergleichsweise seltener auf, sind jedoch in der Literatur beschrieben [99, 116]. Bedingt durch die Natriumkanal-Blockade können noch zwei weitere hämodynamisch ungünstige Eigenschaften hinzutreten. Zum einen wirken Natriumkanal-Blocker dosisabhängig negativ inotrop, zum anderen auch vasodilatierend [9, 69].

1.2.1. Dibucain

Dibucain (Handelsnamen: Dibucain®, Nupercain®, Percain®, Cinchocain®), ein Chinolin-Derivat, stellt das erste Lokalanästhetikum vom Amid-Typ dar, welches von *Mescher, Uhlmann* und *Hassner* im Jahre 1929 synthetisiert wurde [122]. Die Strukturformel von Dibucain ist in Abbildung 2 dargestellt.

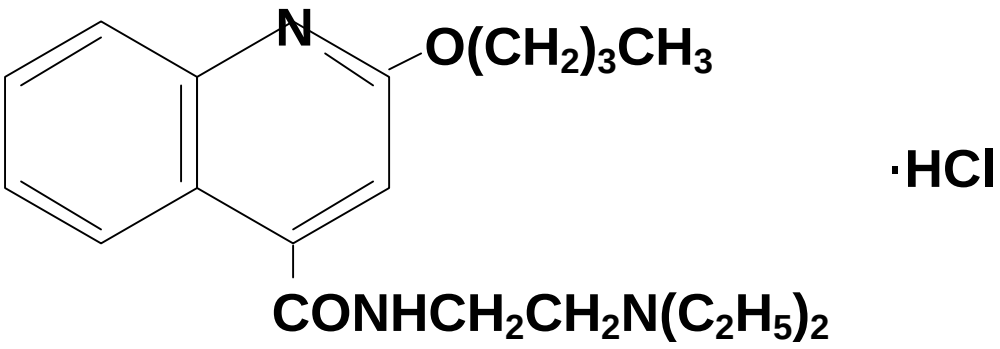

Abbildung 2

Strukturformel von 2-Butoxy-N-[2-(diethylamino)ethyl]-4-Chinolincarboxamid-monohydrochlorid (Dibucain); Summenformel: $C_{20}H_{29}N_3O_2$

Dibucain wird zur Spinalanästhesie in 0,25% und 0,5% hyperbaren Lösungen mit Glucose (5% oder 6%) verwandt, ebenso in hypobarer Bereitung von 0,0667%. In den USA ist es hierzu aufgrund seiner Toxizität nicht mehr zugelassen, außerhalb der USA kommt es weiterhin klinisch zur Anwendung [19, 39]. Dosierungsempfehlungen und die der zeitliche Wirkungsverlauf von Dibucain können den Tabellen 2 und 3 entnommen werden. Dibucain in hypobarer Lösung wurde 1930 erstmals für Spinalanästhesien verwandt, in hyperbarer Lösung kam es ab 1934 zur Anwendung [53, 108].

Verglichen mit dem Spinalanästhetikum Tetracain 0,5% weist Dibucain 0,25% einen ähnlichen Beginn der Wirkung bei längerer Wirkdauer und etwas geringer ausgeprägter motorischer Blockade auf [19, 100]. Die analgetische Potenz von Dibucain ist verglichen mit Tetracain doppelt so hoch [100]. Weiter wird Dibucain topisch angewandt, als Salbenzubereitung bei Schmerzen, wie leichten Verbrennungen und Pruritus [26].

Tabelle 2: Dosierungsempfehlungen für Dibucain

Dermatom T_4	10 – 15 mg entspr. 2,0 – 3,0 ml
Dermatom T_{10}	5 – 8 mg entspr. 1,0 – 1,6 ml

Tabelle 3: Dibucain im zeitlichen Wirkungsverlauf

Beginn der Analgesie	5,3 ± 1,7 min
Maximale Analgesie	13,9 ± 3,1 min
Beginn des Wirkverlustes	88,0 ± 26,5 min
Vollständiger Wirkverlust	127,0 ± 31,6 min

Modifiziert nach: Fisher A, Bryce-Smith R [31]

Die lange Wirkdauer ist durch die hohe Lipophilie und Proteinbindung von Dibucain zu erklären. Hieraus resultiert die längste Eliminierungshalbwertszeit aller Lokalanästhetika vom Amidtyp. Dibucain wird wie andere Amidtyp-Lokalanästhetika auch in der Leber metabolisiert, der größte Teil jedoch wird unverändert renal ausgeschieden.

In der Literatur finden sich für Dibucain die für Spinalänasthetika typischen Nebenwirkungen, wie Bradykardie, Übelkeit und Erbrechen. Postoperativ können Kopfschmerz und Harnverhalt mit konsekutiver Cystistis auftreten [102]. Zusätzlich zu den Nebenwirkungen am ZNS und am Herzen wird bei Dibucain über Veränderungen an Thrombozyten mit konsekutiver Hypokoagulabilität berichtet [97]. Es traten Todesfälle durch Herz-Kreislaufstillstand nach Einnahme topischer Dibucain-Präparate auf [20]. Dibucain in Salbenform scheint auch photosensibilisierende Effekte zu haben [52, 118].

Als relative Kontraindikationen für den Einsatz von Dibucain gelten kardiale Grundleiden, wie ausgeprägte Bradykardien, schwere Überleitungsstörungen sowie die dekompensierte Herzinsuffizienz. Daneben sind noch hypovolämische Kreislaufsituationen und Schock zu nennen. Bei ausgeprägter Leber- sowie Niereninsuffizienz sollte der Einsatz von Dibucain ebenfalls sorgfältig abgewogen werden.

1.3. Lokalanästhetika und Maligne Hyperthermie

Ester-Typ Lokalanästhetika werden hinsichtlich einer möglichen MH-Triggerung als unbedenklich eingestuft, hingegen wird das Gefahrenpotential von Amid-Typ-Lokalanästhetika für MH-S Patienten in der Literatur widersprüchlich diskutiert.

Nach *Ørding* trat in Dänemark bei 300.000 Lokalanästhesien keine einzige MH-Episode auf [88]. *Berkowitz* und *Rosenberg* verwandten 1985 Mepivacain bei 103 Patienten für Regionalanästhesien bei Muskelbiopsien, von denen im Anschluß 52 als MH-S-positiv diagnostiziert wurden, die sämtlich komplikationsfrei verliefen. Sie schlossen daraus, dass die MH durch Lokalanästhetika in therapeutischen Dosen nicht getriggert wird [10]. Im gleichen Jahr erklärte die MHAUS („Malignant Hyperthermia Association of the United States“), eine Patientenorganisation in den USA, Lokalanästhetika mangels ausreichender klinischer Beweise als unbedenklich im Zusammenhang mit MH [78]. Diverse Veröffentlichungen kommen bis heute zu demselben Ergebnis [25, 80, 94].

Die Schwierigkeit, die MH zu diagnostizieren, ist jedoch nicht zuletzt in der großen Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes zu suchen, welches sich von milden, abortiven Verläufen mit sehr unspezifischer Symptomatik bis zu fulminanten und lebensbedrohlichen Verläufen erstrecken kann [40, 112]. Es ist somit nicht sicher auszuschließen, dass milde MH-Verläufe übersehen und als solche nicht diagnostiziert wurden. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass MH-Episoden bei Narkosen bekannt sind, denen Allgemeinanästhesien mit Triggersubstanzen vorausgingen, welche symptomfrei verliefen [8].

In der Literatur finden sich außerdem zahlreiche Hinweise, die einen Einfluß von Amid-LA auf die Ca^{2+}-Homöostase der Skelettmuskulatur erkennen lassen. Hierbei wird deutlich, dass Amid-LA keine pharmakologisch homogene Gruppe darstellen, sondern vielmehr als jeweilige Einzelsubstanzen differenziert betrachtet werden sollten.

Der Einfluß von Amid-LA auf die Ca^{2+}-Homöostase konnte bereits in den 70er Jahren durch *Bianchi* und *Strobel* in in-vitro Experimenten nachgewiesen werden [113]. Für Lidocain wurde gezeigt, dass es bei 37°C Muskelkontrakturen verursacht und Koffein- und Koffein / Halothan getriggerte Kontrakturen verstärkt. Die durch Lidocain getriggerten Kontrakturen sind konzentrationsabhängig. In niedrigen Dosierungen interagiert Lidocain mit dem Tranversalen-Tubu-

lussystem der Skelettmuskelzelle, steigert somit den Ca^{2+}-Efflux, in höheren Dosierungen wird zusätzlich die Ca^{2+}-Wiederaufnahme in das SR inhibiert [113]. Lidocain erhöht desweiteren den Sauerstoffbedarf der Skelettmuskulatur [86].

Die Fähigkeit von Amid-LA, Kontrakturen auszulösen, scheint von vielen Faktoren, wie z. B. Temperatur und pH-Wert, abhängig zu sein. Während Procain, Lidocain und Tetracain bei 20° C bei der Skelettmuskulatur des Frosches Koffein-getriggerte Kontrakturen kompetitiv inhibieren, vermitteln die vorgenannten Substanzen, wie für Lidocain auch von *Bianchi* und *Strobel* gezeigt, bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C selbst deutlich ausgeprägte Kontrakturen. Die Lidocain getriggerten Kontrakturen fielen bei pH 7,2 deutlich stärker aus als bei pH 6,0. Procain löst darüber hinaus bei der Skelettmuskulatur der Ratte sowohl bei 20° als auch bei 37°C Kontrakturen aus [56].

Ähnlich verhält sich das Amid-Lokalanästhetikum Dibucain, welches am Skelettmuskel des Frosches sowohl bei 20° als auch bei 37°C eine deutliche Kontrakturentwicklung auslöst [56]. Zahlreiche Fallberichte geben zusätzlich Hinweise, daß LA, wie Lidocain und Bupivacain, auch in-vivo eine MH auslösen könnten.

Beschrieben ist der Fall einer Patientin, die während einer Epiduralanästhesie mit Lidocain und Bupivacain Symptome der MH, wie Muskelrigidität, Hyperthermie, Zyanose, Tachykardie und Hyperpyrexie zeigte [61]. Ein IVKT war nicht durchgeführt worden. Die Diagnose MH konnte somit nicht abschließend gesichert werden [94].

Ein weiterer Patient, der auf dem Boden eines chronischen Nierenversagens mit Oligurie und drohenden kardialen Pumpversagens aufgrund erheblicher Hyperhydratation ventrikuläre Tachyarrhythmien zeigte, wurde initial erfolgreich mit 50 mg Lidocain als i.v.-Bolusgabe anbehandelt. Bei erneut aufgetretenen ventrikulären Tachyarrhythmien erwies sich die weitere Gabe von insgesamt 400 mg Lidocain i.v. als wirkungslos. Der Patient bot hierauf einen massiven Anstieg der Körpertemperatur auf 41,7 °C. Es trat generalisiertes Muskelzucken auf, kurz darauf verlor der Patient bei wiederholten generalisierten Krampfanfällen das Bewusstsein. Die Serumspiegel der Creatininphosphokinase sowie des Myoglobins waren massiv erhöht. Die Symptome bildeten sich erst nach Beendigung der Lidocain-Zufuhr und mit Beginn einer intravenösen Therapie mit Dantrolen zurück [117].

Weitere Veröffentlichungen berichten ebenfalls über MH-ähnliche Symptome bei Regionalanästhesien [37, 59, 129]. Ein Patient, der bereits in seiner Vorgeschichte im Rahmen eines operativen Eingriffes in Allgemeinanästhesie nach Gabe von Succhinylcholin eine Hyperthermie

und Azidose geboten hatte, entwickelte bei einer Spinalanästhesie mit Bupivacain wierderum eine ausgeprägte Hyperthermie. Der Serumspiegel der Creatininphosphokinase zeigte sich deutlich erhöht. In einer weiteren Veröffentlichung wird der Fall eines Patienten geschildert, der nach zunächst unauffälliger Epiduralanästhesie mit Lidocain postoperativ einen deutlichen Temperaturanstieg auf 40° C innerhalb einer Stunde in Kombination mit generalisiertem Muskelzittern bot. Auch hier war die Creatininphosphokinase erhöht. Durch forcierte Kühlungsmaßnahmen konnte die Körpertemperatur innerhalb von zwei Stunden auf 38° C gesenkt werden, jedoch kehrte diese erst drei Tage später wieder auf Normalwerte zurück. Anhand dieser Daten wurde spekuliert, dass zumindest in einzelnen Fällen möglicherweise auch Amid-LA als MH-Trigger wirken können [82]. Die Einstufung von Amid-LA als generell unbedenklich im Bezug auf mögliches MH-Triggerpotential erscheint unter kritischer Würdigung der vorliegenden Literatur zweifelhaft.

Zu dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Amid-Lokalanästhetikum Dibucain findet sich in der Literatur kein direkter Hinweis auf eine in-vivo-Triggerung der MH. Bislang sind jedoch auch keine kontrollierten Studien zur Überprüfung des MH-Risikos durch Dibucain publiziert worden. Die Beeinflussung des Ca^{2+}-Haushalts der Skelettmuskelzelle durch Dibucain ist in der Literatur experimentell hingegen vielfach nachgewiesen [3, 84, 127, 128]. Demnach steigert es die Freisetzung von Calcium aus dem SR von Muskelzellen [3, 128] um den Faktor 5-10 [127] und hemmt dessen Wiederaufnahme [3, 84]. Diese Prozesse scheinen konzentrationsabhängig zu sein. Dibucain zeigt in niedrigen Konzentrationen (0,08–0,64 mM) membranstabilisierende Eigenschaften [84] und inhibiert somit den Ca^{2+}-Efflux [5, 87, 95]. In hohen Dosen von > 0,9 mM appliziert, führt Dibucain hingegen zu Leckagen in der SR-Membran (Membranlyse) [17, 115, 128] und zu Inhibierung der SR-eigenen Ca^{2+}-ATPase [4, 17, 41, 73, 115], somit also zu gesteigertem Auswärtsstrom von Calcium aus dem SR und verminderter Wiederaufnahme [17, 21 , 64]. Dibucain senkt zusätzlich dosisabhängig die cytoplasmatische Ca^{2+}-Schwellenkonzentration, die zur Ca^{2+}-induzierten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR notwendig ist, steigert also folglich die Ca^{2+}–Sensitivität der Muskelzelle [3, 128]. Volle Reversibilität dieser Effekte bleibt bei Dosen von < 3 mM erhalten. Diese Beobachtungen sind voneinander unabhängig und bedingen sich nicht gegenseitig [128].

Das Bindungsverhalten von Ryanodin an den Ryanodin-Rezeptor (RYR1), dem Ca^{2+}-Freisetzungskanal des SR, wird durch Dibucain biphasisch beeinflusst. Niedrige Dibucain Konzentrationen führen zu einer Stimulierung, höhere Konzentrationen zur Inhibierung der Ryanodin-Bindung an den RYR1 [107]. Dibucain erhöht im Tierexperiment signifikant das Abdissoziieren von 1,4-Dihydropyridin von neuronalen Dihydropyridinrezeptoren [65]. Beide Rezeptoren spielen

sowohl bei der physiologischen Erregungsübertragung auf die Skelettmuskelzelle als auch in der Pathogenese der Malignen Hyperthermie eine entscheidende Rolle.

Der Einfluß des geänderten Calcium-Haushalts durch Dibucain bei MH-S-Trägern kann hinsichtlich des Triggerpotentials für eine MH-Episode, der ursächlich ein Defekt der Calciumhomöostase zugrunde liegt, nach vorliegender Literatur nicht sicher abgeschätzt werden. Ein Gefahrenpotential von Dibucain für MH-S-Träger ist nicht sicher auszuschließen. Es erscheint nach Auswertung der verfügbaren Literatur durchaus möglich, dass es sich bei Dibucain um einen potentiellen Trigger der MH handeln könnte [3, 4, 17, 21, 41, 56, 64, 65, 73, 84, 107, 115, 127, 128].

1.4. Ziel der Arbeit

Das Gefahrenpotential von Amid-Typ-Lokalanästhetika für MH-S Patienten wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Während Lokalanästhetika allgemein als sicher bezüglich einer möglichen MH-Triggerung eingestuft werden, finden sich jedoch Fallberichte, die einen Zusammenhang zwischen Lokalanästhetika und MH-Episoden nahe legen [37, 59, 62, 78, 82, 86, 117, 129].

Für das Amid-Typ Lokalanästhetikum Dibucain konnte experimentell die Beeinflussung der Ca^{2+}–Homöostase der Skelettmuskelzelle in-vitro nachgewiesen werden [3, 4, 17, 41, 56, 73, 84, 87, 115, 127, 128]. Es erscheint daher möglich, dass Lokalanästhetika MH-Triggerpotential besitzen. Aufgrund dieser Befunde ist Dibucain hinsichtlich der Abschätzung eines möglichen MH-Risikos von Lokalanästhetika von besonderem Interesse.

Im ersten Teil der Arbeit wurden in-vivo Untersuchungen am etablierten und validierten Schweinemodell durchgeführt. Ziel war es, die MH-Triggerpotenz von Dibucain zu bestimmen und zu klären, ob Dibucain bei MH-Disposition kontraindiziert ist, oder unbedenklich gegeben werden kann.

Im zweiten Teil wurden die Effekte des Lokalanästhetikums Dibucain auf die Skelettmuskelzelle genetisch determinierter MH-Schweine untersucht. Im in-vitro Kontrakturtestmodell (IVKT) sollten die Wirkungen von Dibucain auf Präparate von MH-N- und MH-S-Skelettmuskeln überprüft und die Frage geklärt werden, ob Skelettmuskelpräparate von MH-S im Gegensatz zu MH-N Kontrakturen entwickeln. Es sollte untersucht werden, ob sich Dibucain, zusätzlich zum etablierten Goldstandard mit Halothan und Koffein, als additive Testsubstanz im IVKT eignen würde, mit dem Ziel, die Patientensicherheit weiter zu verbessern.

2. Methodik

2.1. In-vivo Experimente

2.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ein genetisch determinierter MH-S-Stamm des Pietrain Schweines und ein genetisch determinierter MH-N-Stamm des Hampshire Schweines aus der Züchtungszentrale des Bundeshybridprogrammes (Mölln, Schleswig Holstein). Die Genehmigung der Tierschutzkomission lag für alle Experimente vor. Die Untersuchungen wurden an 7 MH-S und 7 MH-N Schweinen vorgenommen. Bei Versuchsdurchführung waren die Tiere 6-9 Monate alt. Das mittlere Körpergewicht der MH-S Schweine betrug bei Versuchsbeginn 39,5 ± 4,8 kg, das der MH-N Schweine 37,3 ± 4,2 kg. Die Versuchstiere waren weiblichen Geschlechts und klinisch gesund, sie wurden mindestens 8 Tage nach Lieferung durch die Versuchstierhaltung des UKE nach standardisierten Bedingungen betreut. Vor Versuchsbeginn wurde eine zwölfstündige Nahrungskarenz und Leitungswasser ad-libitum verordnet.

2.1.2. Versuchsdurchführung

Die Narkose wurde bei den Tieren durch die intramuskuläre Gabe von 15 mg/kg/KG Ketamin (Ketanest®, Parke-Davis, Freiburg) eingeleitet. Nach ca. 5-10 Minuten war bei den Tieren eine gute Hypnose bei erhaltener Spontanatmung eingetreten. Anschließend wurde ein intravenöser Zugang über eine Ohrvene angelegt, die Tiere auf den Rücken gelegt, die Hufe locker fixiert und ein EKG abgeleitet. Nach Vertiefung der Narkose durch Bolusgabe von Propofol (Disoprivan® 2%, Astra Zeneca, Wedel) und 10 µg/kg/KG Fentanyl (Fentanyl®, Janssen, Neuss) und topischer Analgesie von Larynx und Trachea erfolgte die endotracheale Intubation mit einem blockbaren Endotrachealtubus (32 Charr). Der korrekte Sitz des Tubus wurde durch Auskultieren über beiden Lungenflügeln überprüft. Die Narkose wurde durch kontinuierliche Gabe von 12-15 mg/kg/KG/h Propofol und 50 µg/kg/KG/h Fentanyl aufrechterhalten. Um im MH-Triggerversuch nicht die eventuelle Ausbildung von Muskelrigor und/oder Trismus zu überdecken, wurde auf den Einsatz von Muskelrelaxanzien verzichtet. Die Tiere wurden mit einem volumenkonstanten Respirator (Narkosespiromat, Drägerwerk AG, Lübeck) kontrolliert beatmet. Die Beatmung erfolgte mit einem Lachgas/Sauerstoff Gemisch (2:1) mit einem Tidalvolumen von 10 ml/kg/KG und einer Beatmungsfrequenz von 14-18/min, die so gewählt wurde, dass die zentralvenös gemessene CO_2-

Konzentration 36-40 mmHg betrug. Die Normoventilation wurde durch wiederholte arterielle Blutgasanalysen überprüft. Zur Korrektur des durch Flüssigkeitskarenz bedingten Defizits erhielten die Tiere über den peripher venösen Zugang zunächst 300-500 ml Ringer-Lösung. Physiologische Flüssigkeitsverluste wurden durch intravenöse Infusion einer bilanzierten Elektrolytlösung (5-10 ml/kg/KG/h) ausgeglichen, wobei ein zentraler Venendruck von 8-10 cm H_2O angestrebt wurde. Der Ausgleich der geschätzten Blutverluste während der Präparation sowie durch Blutentnahmen erfolgte durch die Gabe 6%iger Hydroxyethylstärke. Störungen im Säuren-Basen sowie Elektrolythaushalt wurden vor Beginn der Untersuchungen korrigiert. Die rektale und ösophageale Temperatur wurde kontinuierlich gemessen und durch einen Infrarotstrahler zwischen 37 und 38° C konstant gehalten.

Für die in-vitro Experimente wurden nun Muskelproben aus dem Musculus vastus lateralis, wie unter 2.2.1. beschrieben, entnommen.

Ein Dreilumenkatheter wurde durch offene Präparation in die rechte V. jugularis interna eingelegt und in die V. cava superior vorgeschoben. Über diesen erfolgte die kontinuierliche Messung des zentralvenösen Druckes (ZVD) (distales Lumen), die Entnahme von Blutproben (mediales Lumen), sowie die Applikation der Medikamente und der Testsubstanz (proximales Lumen). Ebenfalls durch offene Präparation erfolgte die Kanülierung der A. femoralis rechts mittels Seldinger Technik. Über diesen Katheter wurde der Blutdruck kontinuierlich gemessen sowie Blutentnahmen durchgeführt.

Das Monitoring umfasste die Herzfrequenz (HF), den mittleren arteriellen Druck (MAP), das Herzzeitvolumen (HZV), den zentralvenösen Druck (ZVD), die Sauerstoffsättigung (sO_2), die endtidale CO_2-Konzentration ($etCO_2$), sowie die rektale Temperatur. Die genannten Parameter wurden im fünfminütigen Abstand protokolliert.

Blut wurde zeitgleich im zehnminütigen Abstand zentralvenös und arteriell entnommen. Mit einem Analysegerät wurden sofort Blutgase (pO_2, pCO_2), Säuren-Basen-Parameter (pH, HCO_3^-, base-excess (BE)), Serumelektrolyt-Konzentrationen (K^+, Na^+), Glucose und der Lactatspiegel gemessen. Zusätzliche Blutproben wurden zur Messung der Creatinphosphokinase (CK) entnommen.

Nach Einleitung der Narkose und Katheterisierungen wurden Abweichungen der Blutgase, Säuren-Basen-Parameter und Elektrolyte korrigiert und für mindestens 30 Minuten ein „steady state“ eingehalten. Anschließend wurde der Ausgangsstatus erhoben. Der schematisierte Versuchsablauf kann Abbildung 3 entnommen werden.

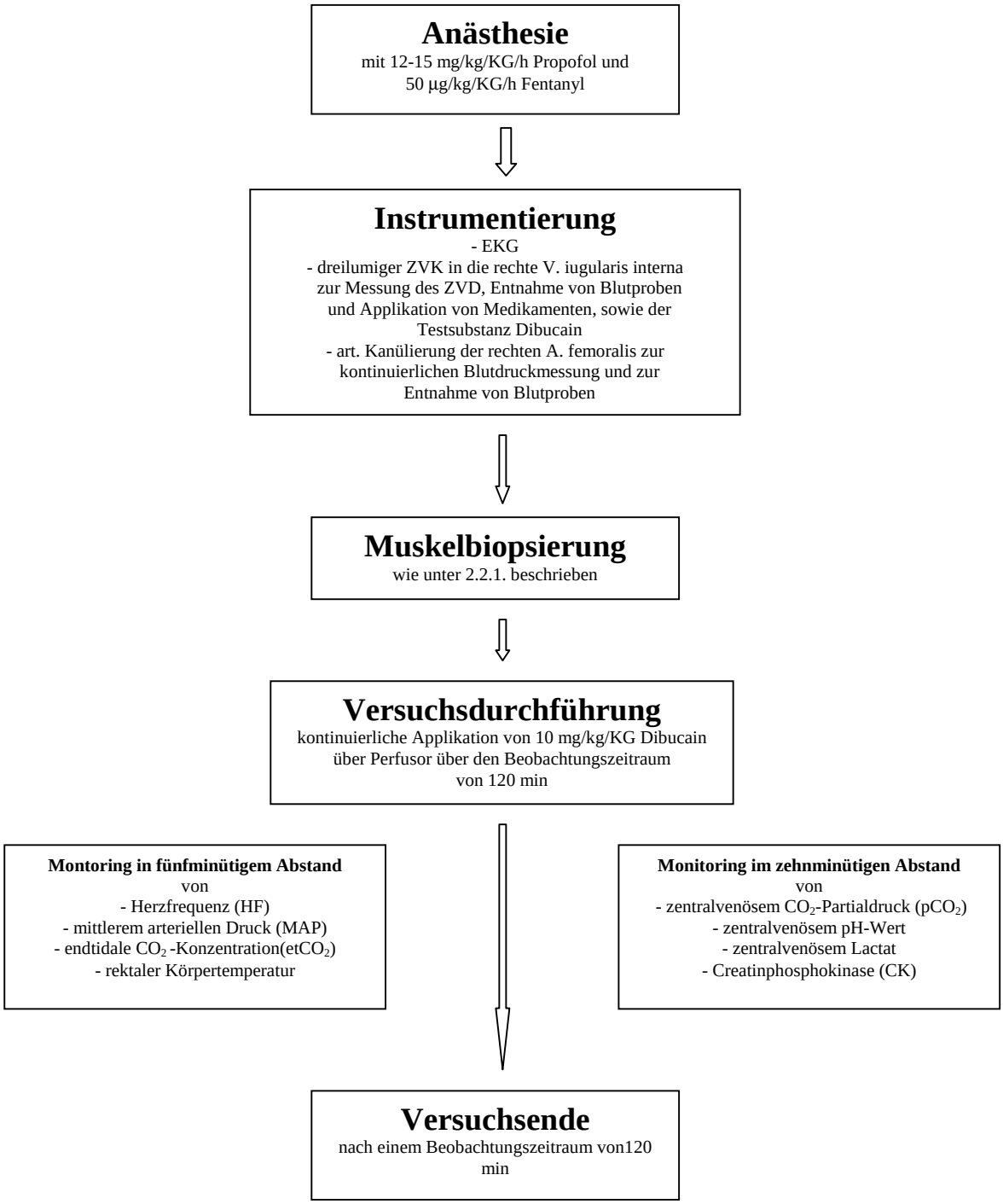

Abbildung 3

Schematisierter Ablauf der in-vivo- und in-vitro-Versuchsdurchführung

2.1.3. MH-Induktion mit Dibucain

Die Untersuchungen zur Malignen Hyperthermie-Induktion mit Dibucain wurden bei insgesamt 7 MH-S- und 7 MH-N-Tieren durchgeführt. Dibucain wurde hierbei mit einer konstanten Flussrate über einen Perfusor gegeben und die Dosis so gewählt, dass nach 120 Minuten eine Konzentration von 10 mg/kg/KG Dibucain erreicht war. Die Ventilation wurde während der gesamten Versuchsdauer nicht verändert. Die Kriterien zur Feststellung einer MH-Entwicklung waren in Übereinstimmung mit der internationalen Literatur wie folgt festgelegt: venöse CO_2-Konzentration $\geq$ 70 mmHg, ein pH $\leq$ 7,2 oder ein Temperaturanstieg $\geq$ 2° C. Zwei der drei Indikatoren waren ausreichend für die Diagnose MH. Bei Auslösung einer MH-Krise sollte die Dibucain-Zufuhr beendet und ein Therapieversuch mit 3,5 mg/kg/KG Dantrolen unternommen werden. Bei einem der Tiere der MH-S-Gruppe wurde nach erfolgter Dibucain-Zufuhr, im Sinne einer Qualitätskontrolle zur Überprüfung der MH-Suszeptibilität, eine MH-Triggerung durch Halothan versucht. Nach Abschluß der Untersuchungen wurden die Tiere durch Injektion von 10%iger Kaliumchlorid-Lösung getötet. Der Beobachtungszeitraum betrug maximal 120 Minuten.

2.2. In-vitro Experimente

2.2.1 Standard-Diagnostik der MH

Als Versuchstiere dienten ein genetisch determinierter MH-S-Stamm des Pietrain Schweines und ein genetisch determinierter MH-N-Stamm des Hampshire Schweines aus der Züchtungszentrale des Bundeshybridprogrammes (Mölln, Schleswig Holstein). Die Genehmigung der Tierschutzkomission lag für alle Experimente vor. Die Untersuchungen wurden an 8 MH-S und 8 MH-N Schweinen vorgenommen.

In allen Fällen wurde der vastus lateralis des M. quadriceps femoris im medialen Anteil biopsiert. Nach scharfer Präparation unter Vermeidung jeglicher Traumatisierung wurden 1 – 2 Längsfaserbündel mit einer Länge von 2 – 2,5 cm und einem Durchmesser von 0,5 – 1 cm exzidiert. Die Gewebeproben wurden sofort in eine mit Carbogen (5% Kohlendioxid, 95% Sauerstoff) äqulibrierte Krebs-Ringer Lösung (Zusammensetzung in mmol/l: NaCl 118,1, KCl 3,4, $CaCl_2$ 2,5, $MgSO_4$ 0,8, KH_2PO_4 1,2, $NaHCO_2$ 25,0, Glucose 11,1) eingebracht. Im Testlabor wurden randständige, offensichtlich alterierte Muskelfaszikel, Fett und Bindegewebe abgetrennt und verworfen. Die Präparation und der Versuchsablauf erfolgten standardisiert nach dem Protokoll der Eu-

ropean MH Group (EMHG) [29, 90]. Die Biopsate wurden in Muskelbündel mit einer Länge von 12-26 mm, einem Durchmesser von 2-3 mm und einem Gewicht von 80-250 mg aufgespalten, die jeweils an beiden Enden mit Seitenligaturen eingeschlungen wurden. Alle Muskelbündel wurden bis zur Untersuchung in mit Carbogen begaster Krebs-Ringer Lösung bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von fünf Stunden nach Entnahme der Biopsate untersucht.

Das MH-Testlabor ermöglicht die parallele Untersuchung von vier Muskelbündeln in einzelnen Organbädern. Der Testaufbau ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Die Organbäder waren mit 20 ml Krebs-Ringer-Lösung gefüllt und wurden ständig mit Carbogen begast.

Die Temperatur der Lösung wurde im Wasserbad bei 37 °C konstant gehalten. Das Muskelbündel wurde mit dem am unteren Ende angeschlungenen Seidenfaden fixiert, das obere Ende wurde mit einem flexiblen Stahldraht mit einem induktiven Kraftaufnehmer (Lectromed, Welwyn Garden City, Great Britain) verbunden und das so vertikal im Organbad aufgehängte Muskelbündel im oberen und unteren Anteil mit zwei Platinreizelektroden in Kontakt gebracht.

Die Muskelreizung erfolgte bei einer Frequenz von 0,2 Hz mit Rechteckimpulsen von 1 ms Dauer mit supramaximaler Stromstärke (HSE Stimulator Typ 215/I, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland). Das vom Kraftaufnehmer gemessene Potential wurde verstärkt, in einem Analog-Digital-Wandler umgewandelt und graphisch dargestellt (MusCO™, RS BioMedTech, Sinzing, Deutschland). Nach Einbringung der Muskelbündel in die Organbäder wurde deren Länge gemessen und der Muskel mit einer Geschwindigkeit von 4 mm/s auf 150% seiner Ausgangslänge gedehnt. Die Messung der Grundspannung des Muskels erfolgte kontinuierlich. Nach Erreichen einer konstanten Grundspannung (Abnahme < 2 mN über eine Zeitspanne von 10 min.) wurde die Muskelkontraktionskraft bei Stimulation des Muskelbündels bestimmt. Muskelpräparate mit einer Muskelkontraktionskraft < 10 mN wurden wegen unzureichender Vitalität von der Untersuchung ausgeschlossen und verworfen.

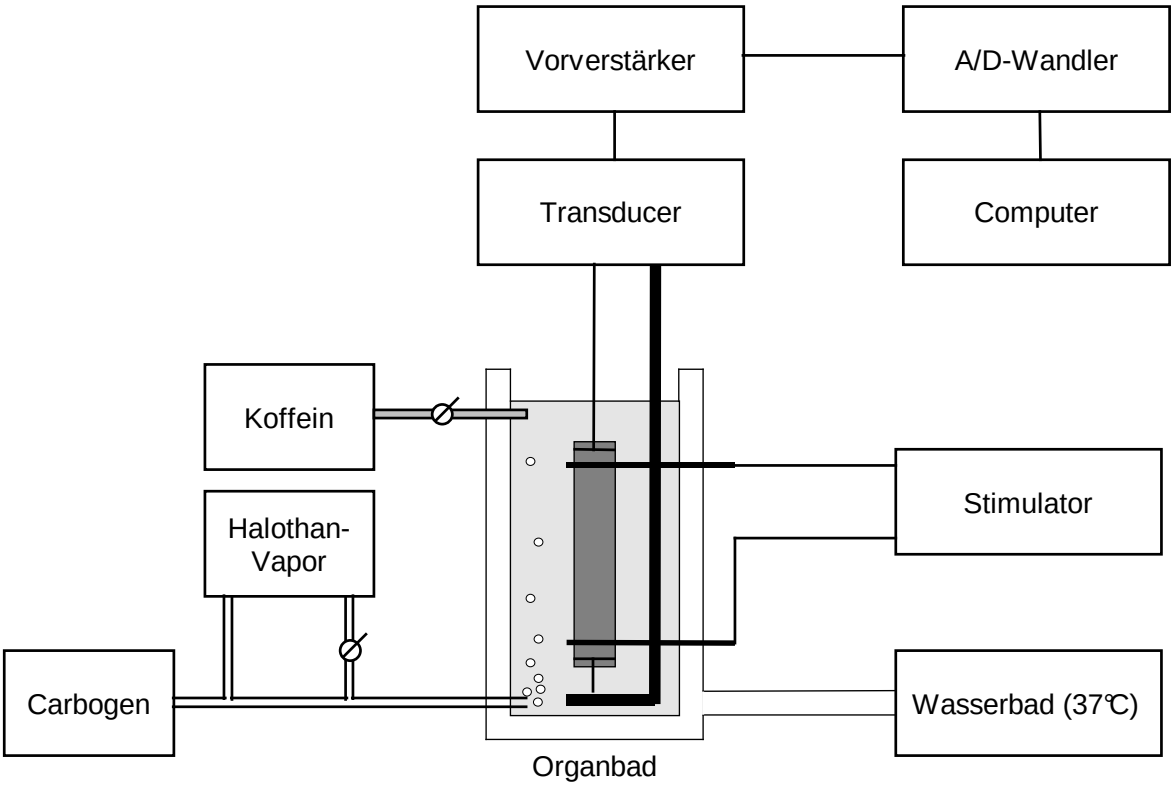

Abbildung 4

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur in-vitro-Kontrakturtestung. Das Skelettmuskelpräparat ist in einem mit 20 ml Krebs-Ringer-Lösung gefüllten, auf 37° C erwärmten Organbad eingehängt und wird mit Carbogen begast. Das am unteren Ende fixierte Muskelpräparat ist an einem Kraftaufnehmer (Transducer) spannungsfrei aufgehängt und wird supramaximal elektrisch stimuliert. Das vom Kraftaufnehmer erfaßte Signal wird verstärkt, in einem Analog-Digital-Wandler ungewandelt, per Computer aufgezeichnet und graphisch dargestellt.

2.2.1.1. In-vitro Kontrakturtest mit Halothan

Für den IVKT mit Halothan wurde den Muskelbündeln kumulativ 0,11 mmol/l (3 min Expositionsdauer), 0,22 mmol/l (3 min Expositionsdauer) und 0,44 mmol/l (9 min Expositionsdauer) Halothan® (Hoechst, Frankfurt) zugeführt. Anschließend wurde die Halothanzufuhr für 3 min unterbrochen, danach Koffein in einer Badkonzentration von 32 mmol/l dem Organbad zur Prüfung der Vitalität der Muskelprobe zugeführt. Halothan wurde dem Carbogen durch einen kalibrierten Narkoseverdampfer (Vapor 19.1, Dräger AG, Lübeck) zugemischt, die Überwachung der Halothankonzentration erfolgte kontinuierlich mit einem Anästhesiegasmonitor (Normac, Datex, Helsinki, Finnland). Die gemessenen Werte wurden zusätzlich regelmäßig gaschromatographisch in den Organbad-Lösungen überprüft [130]. Während der Untersuchung wurde die Grundspan-

nung (mN), sowie die Muskelkontraktionskraft bei Stimulation (mN), kontinuierlich aufgezeichnet. Von jedem Tier wurden mindestens zwei Muskelbündel mit Halothan-Exposition untersucht.

2.2.1.2. In-vitro Kontrakturtest mit Koffein

Koffein (Sigma, Deisenhofen) wurde in destilliertem Wasser gelöst, die Lösung an jedem Untersuchungstag neu angesetzt und kumulativ in die Organbäder pipettiert. Für jeweils drei Minuten wurden damit die Organbadkonzentrationen von 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 3,0 – 4,0 – 32,0 mmol/l erreicht. Während der Untersuchung wurde ebenfalls die Grundspannung (mN) sowie die Muskelkontraktionskraft bei Stimulation (mN) kontinuierlich aufgezeichnet. Von jedem Versuchstier wurden mindestens zwei Muskelbündel mit Koffein-Exposition untersucht.

2.2.1.3. Definition des MH-Status

Nach Bestimmung der sog. Schwellenkonzentration von Halothan und Koffein, bei denen die Muskelpräparate eine Kontraktur > 2 mN, d.h. einen Anstieg der Grundspannung vom Ausgangswert, entwickelten, wurden die Tiere anhand der Schwellenkonzentrationen den drei diagnostischen Kategorien zugeordnet:

- MH-S („susceptible“ = Disposition zur MH): Kontraktur ≥ 2 mN bei Halothan ≤ 0,44 mmol/l und Koffein ≤ 2 mmol/l
- MH-N („normal“ = keine Disposition zur MH): keine Kontraktur von ≥ 2 mN bei Halothan ≤ 0,44 mmol/l und Koffein ≤ 2 mmol/l
- MH-E („equivocal“ = MH-Disposition ungeklärt): ≥ 2 mN nur bei Halothan ≤ 0,44 mmol/l (MH-Eh) oder Koffein ≤ 2 mmol/l (MH-Ec).

2.2.2. Zusatzdiagnostik mit kumulativer Dibucain-Gabe

Nach Beendigung der MH-Diagnostik wurden verbliebene, vitale Muskelfaszikel für die Untersuchungen mit Dibucain verwendet. Muskelfaszikel mit einer Muskelkontraktionskraft < 10 mN und damit nicht ausreichender Vitalität wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Als Testsubstanz wurde Dibucain (Sigma, Gaithersburg, USA) in einer Stammlösung frisch an jedem Versuchstag angesetzt. Für jede Testung wurden frische Muskeln verwendet, nach Testdurchführung wurden die Muskeln verworfen. Nach Einbringung der Muskelbündel in die Organbäder wurde deren Länge gemessen und der Muskel mit einer Geschwindigkeit von 4 mm/s auf 150%

seiner Ausgangslänge gedehnt. Die Messung der Grundspannung des Muskels erfolgte kontinuierlich. Nach Erreichen einer konstanten Grundspannung (Abnahme < 2 mN über eine Zeitspanne von 10 min) wurde die Muskelkontraktionskraft bei Stimulation des Muskelbündels bestimmt. Muskelpräparate mit einer Muskelkontraktionskraft < 10 mN wurden wegen unzureichender Vitalität von der Untersuchung ausgeschlossen und verworfen.

Der Versuchsaufbau und die Untersuchungstechnik entsprachen dem in 2.2.1. beschriebenen Halothan-Koffein Kontrakturtest. Dibucain wurde den Organbädern kumulativ in fünfminütigen Abständen zugeführt, so dass Organbadkonzentrationen von 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 1,0 mmol/l erreicht wurden. Der gesamte Beobachtungszeitraum betrug 90 Minuten. Gemessen wurde die nach jeder Konzentrationsänderung aufgetretene maximale Kontraktur, sowie jeweils die maximale Muskelkontraktionskraft.

2.3. Statistische Auswertung

Die Daten der in-vivo Untersuchungen sind, sofern nicht anders angezeigt, als Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) für Messwertwiederholung hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs und des Gruppenvergleichs. Bei Vorliegen signifikanter Unterschiede wurde der post-hoc Test nach Scheffé durchgeführt. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Bei den Kontrakturtest-Untersuchungen sind die Messresultate als Mediane und Variationsbreiten bzw. als Mittelwerte $\pm$ SD angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte bei Paarvergleichen nach Prüfung auf Normalverteilung mit dem Student’s t-Test für unabhängige Stichproben und dem U-Test nach Mann und Whitney. Die Messwerte für Experimente mit kumulativer Gabe von Substanzen wurden mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) für Messwertwiederholung hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs und des Gruppenvergleichs geprüft. Bei Vorliegen signifikanter Unterschiede wurde der post-hoc Test nach Scheffé durchgeführt. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p < 0,05$ festgelegt.

3. Resultate

3.1. In-vivo Experimente

Maligne-Hyperthermie-Induktion mit Dibucain

Nach Erreichen stabiler Ausgangsbedingungen über 30 Minuten wurde der Versuch nach Messung aller Beobachtungsdaten mit der intravenösen Gabe von Dibucain begonnen. Dibucain wurde dabei über ein Perfusor-System appliziert. Als zu applizierende Dosis wurden 10 mg/kg/KG Dibucain nach 120 Minuten Versuchsdauer mit einer Konzentration von 50 mg/ml gewählt. Diese Gabe führte bei keinem der untersuchten Tiere zur Entwicklung eines MH-Syndroms. Keines der drei definierten Kriterien für die klinische Diagnose einer MH (venöse CO_2-Kontentration > 70 mmHg, pH < 7,20 oder Temperaturanstieg > 2° C) wurde von einem der untersuchten Tiere erfüllt. Auch typische Symptome einer MH-Krise, wie Rigor und Zyanose, wurden nicht beobachtet.

Nach Gabe von 10 mg/kg/KG Dibucain waren alle Tiere verstorben. Ursächlich war bei allen Tieren ein Herz-Kreislaufversagen. Komplexe Herzrhythmusstörungen (VES, SVES, Schenkelblockbilder, Tachyarrhythmien und Asystolien) führten zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu einem kardialen Vorwärtsversagen mit Hypotension.

Die durchschnittliche Überlebenszeit der Tiere der MH-S-Gruppe betrug 95 ± 23 min, die der MH-N-Gruppe lag bei 75 ± 29 min. Daher wurde in den folgenden Darstellungen der Beobachtungszeitraum von 120 auf 80 min reduziert. Zu diesem Zeitpunkt waren in der MH-S-Gruppe noch 5, in der MH-N-Gruppe 3 Tiere am Leben.

Die Überlebenszeiten der einzelnen Tiere der beiden diagnostischen Gruppen können Abbildung 5 entnommen werden.

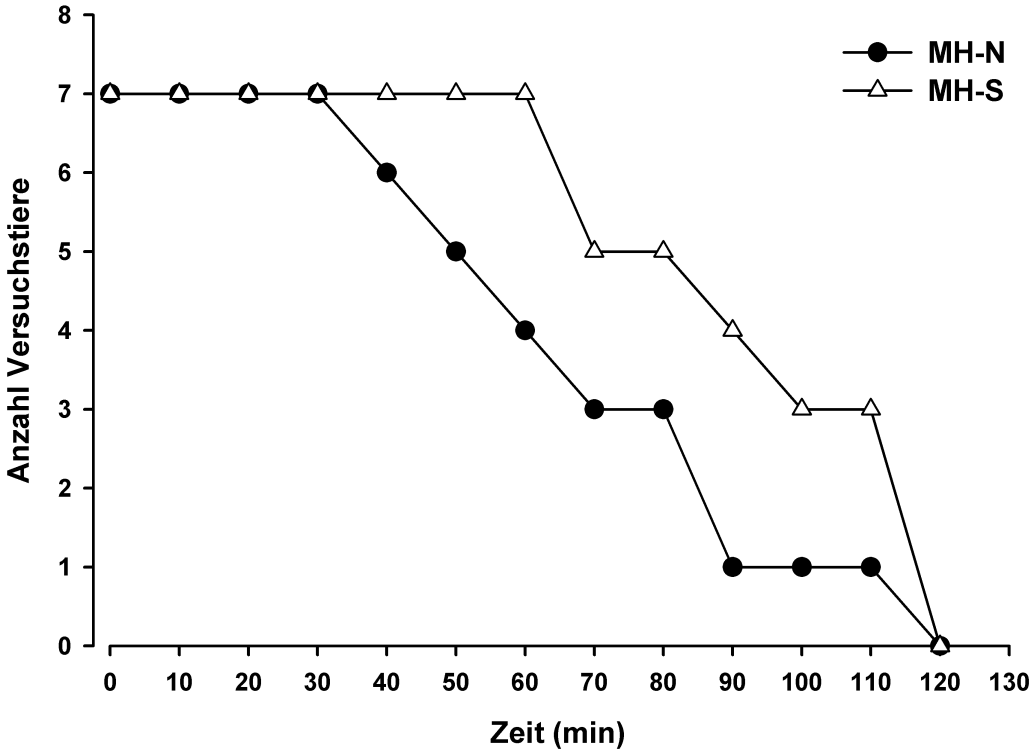

Abbildung 5

Überlebenszeiten der einzelnen Versuchstiere der diagnostischen Gruppen MH-N (n=7) und MH-S (n=7)

Bei einem Tier der MH-S Gruppe (p12) wurde nach Beendigung der Dibucain-Zufuhr der Versuch einer MH-Triggerung mit Halothan unternommen mit dem Ziel, die MH-Suszeptibilität dieser diagnostischen Gruppe nachzuweisen. Das Tier entwickelte eine Tachykardie und komplexe Herzrhythmusstörungen mit konsekutiv deutlichem Abfall des mittleren arteriellen Drucks (MAP). Außerdem zeigten sich eine Hyperthermie, Hyperkarbie und Azidose. Der Lactat-Spiegel stieg deutlich an. 15 Minuten nach Beginn der Halothan-Zufuhr hatte sich eine MH im Sinne der oben genannten Kriterien entwickelt.

Im Folgenden sind die wesentlichen Befunde der in-vivo Versuche dargestellt. Herzfrequenz (HF), Mittlerer Arterieller Druck (MAP), endtidales CO_2 ($etCO_2$) und die rektale Körpertemperatur wurden in Abständen von 5 Minuten gemessen, venöses Lactat, die Creatinphosphokinase (CK), venöses pCO_2 und der venöse pH in Abständen von 10 Minuten.

Herzfrequenz

Der Verlauf der Herzfrequenz nach kumulativer Gabe von Dibucain ist in Abbildung 6 dargestellt. Der Ausgangswert der Herzfrequenz in der MH-S Gruppe von 73 ± 12 min^{-1} war mit dem der MH-N Gruppe von 74 ± 13 min^{-1} vergleichbar. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes schwankten die Werte zwischen 90 ± 28 min^{-1} nach 60 min und 65 ± 20 min^{-1} nach 70 min. Diese Schwankungen lassen sich durch intermittierendes Auftreten komplexer Herzrhythmusstörungen wie SVES, VES, Bigemini, Tachyarrhythmien und kurzen Asystolie-Episoden erklären. In der MH-S Gruppe kam es zwischen der 40. und 60. Minute zu einem leichten Frequenzabfall auf 60 ± 25 min^{-1}. Über die gesamte Versuchsdauer gesehen blieben die Werte allerdings nahezu konstant.

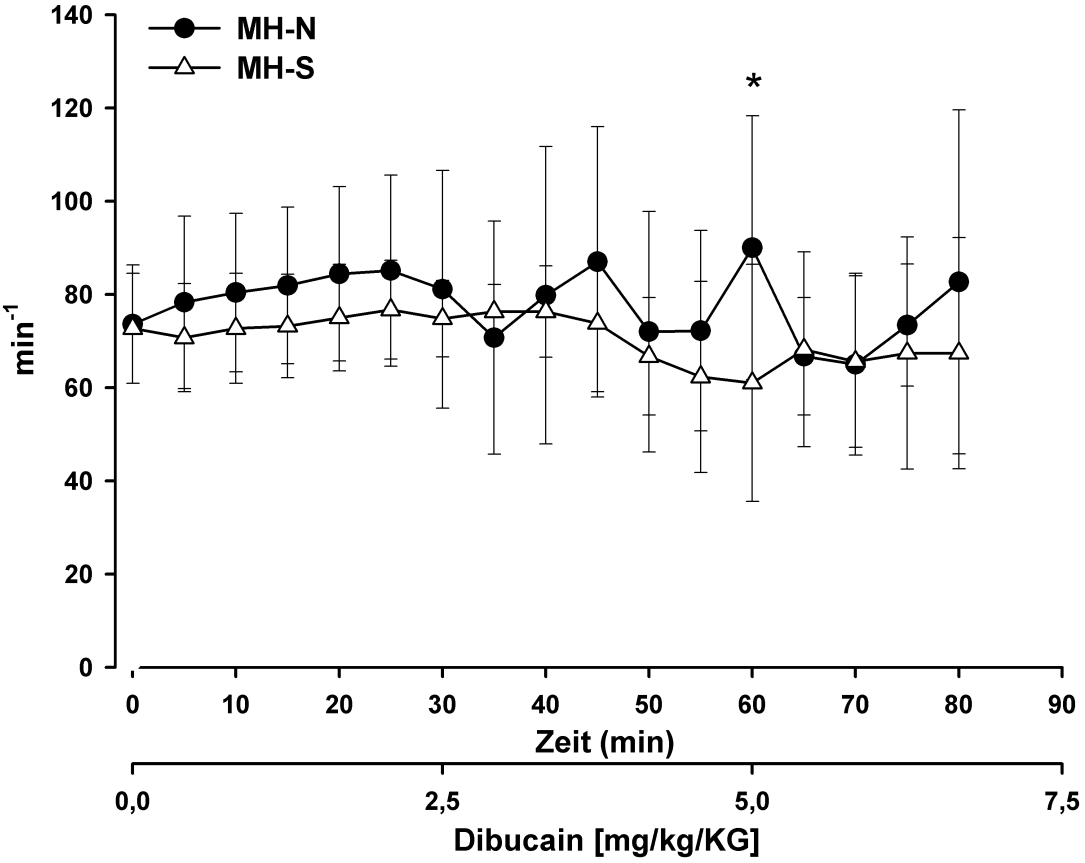

Abbildung 6

Herzfrequenz (HF) von Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und Schweinen ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumulativer Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten*

Mittlerer arterieller Blutdruck

In Abbildung 7 ist der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) nach kumulativer Gabe von Dibucain dargestellt. Der Ausgangswert des MAP in der MH-S-Gruppe war mit 79 ± 17 mmHg mit dem der MH-N-Gruppe von 78 ± 12 mmHg vergleichbar. Der MAP veränderte sich in beiden diagnostischen Gruppen bis zu einer Dibucain-Konzentration von 2,5 mg/kg/KG kaum. Im weiteren Versuchsverlauf führte die kumulative Gabe von Dibucain sowohl in der MH-S- als auch in der MH-N-Gruppe zu einem leichten Abfall des MAP. Unterschiede beim Vergleich der beiden Gruppen konnten nicht festgestellt werden.

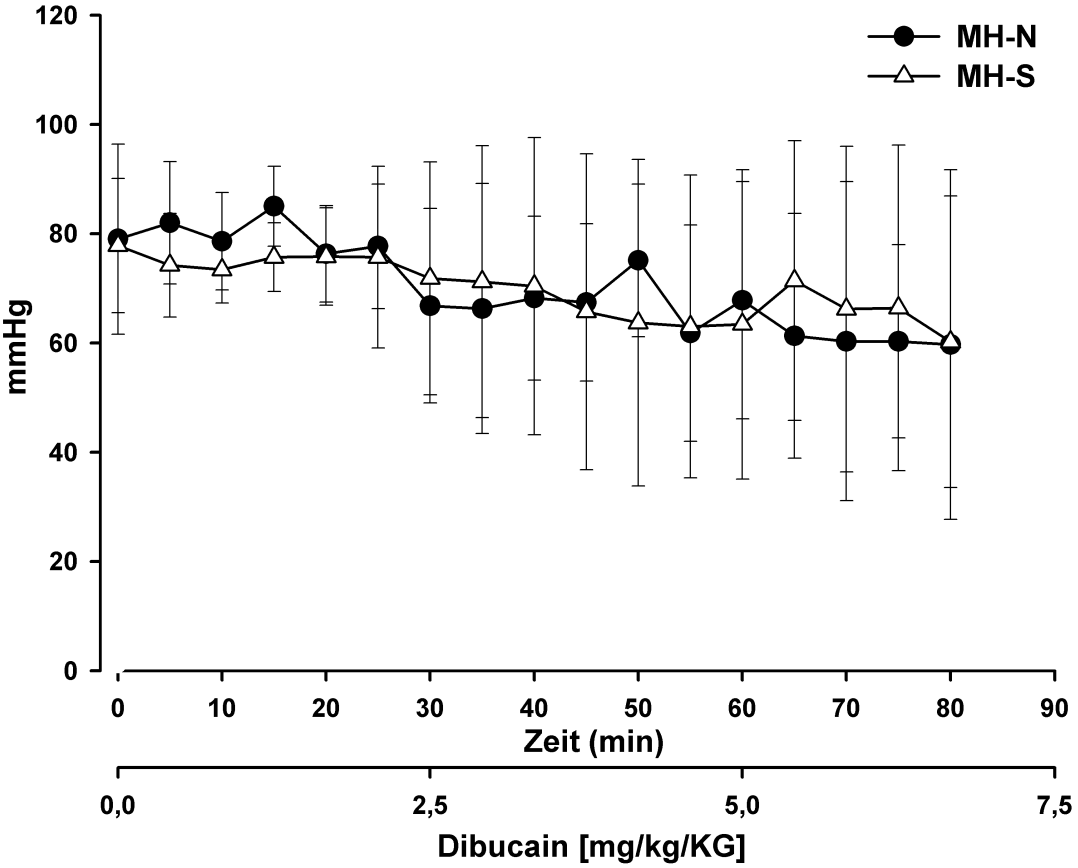

Abbildung 7

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und Schweinen ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumulativer Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten*

Endtidale CO_2 –Konzentration

Abbildung 8 gibt den Verlauf der endtidalen CO_2–Konzentration ($etCO_2$) nach kumulativer Gabe von Dibucain wieder. Der Ausgangswert der $etCO_2$–Konzentration in der MH-S-Gruppe von 32 ± 2 mmHg unterschied sich signifikant vom Ausgangswert der MH-N-Gruppe von 36 ± 4 mmHg. Während der $etCO_2$ bei konstanten Beatmungsbedingungen in der MH-S Gruppe weitgehend kontinuierlich auf 24 ± 10 mmHg sank, kam es in der MH-N-Gruppe in der 60. und 75. Minute jeweils zu einem kurzen Anstieg des $etCO_2$ auf Werte von 39 ± 10 mmHg und 37 ± 12 mmHg. Zwischen Versuchsbeginn und 25 Minuten Versuchsdauer sowie nach 35, 45 und 60 Minuten waren die Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen signifikant.

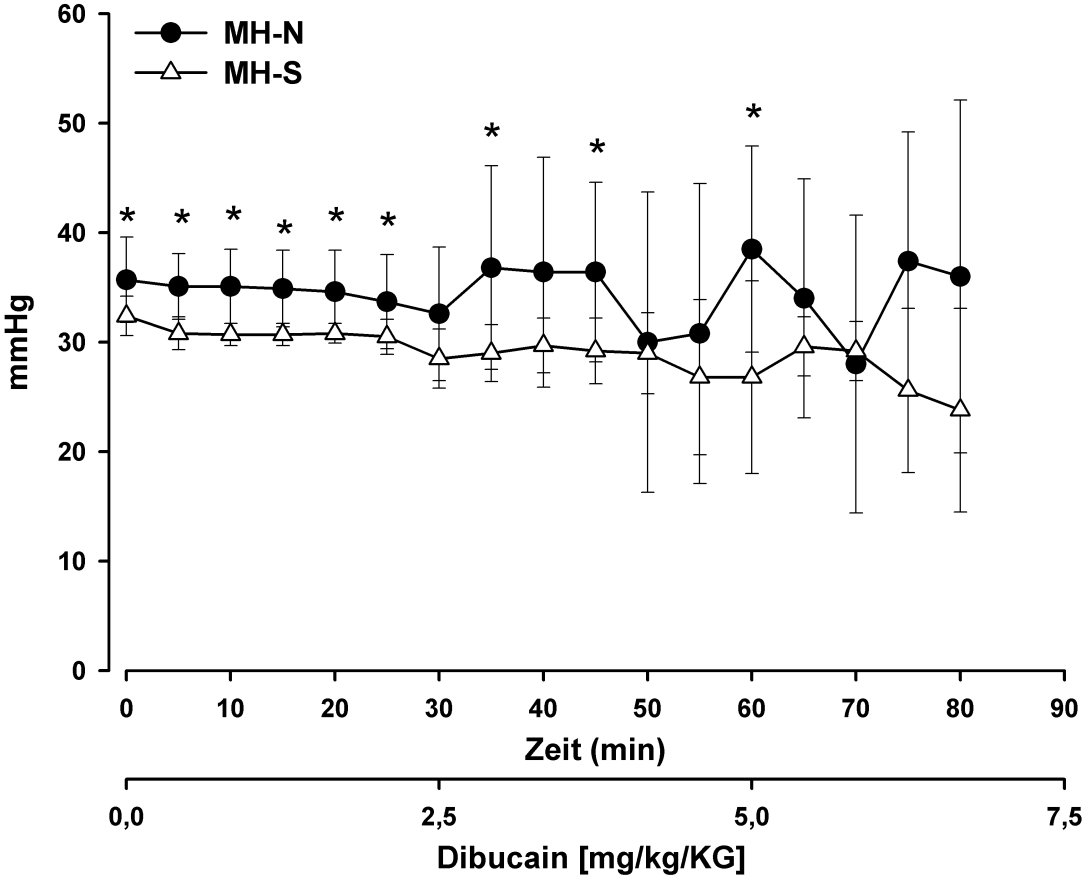

Abbildung 8

Endtidale CO_2-Konzentration ($etCO_2$) bei Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und Schweinen ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumulativer Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten.*

Zentralvenöser CO_2 –Partialdruck

Der Verlauf des CO_2 –Partialdrucks (pCO_2) im zentralvenösen Blut nach kumulativer Gabe von Dibucain findet sich in Abbildung 9. Der Ausgangswert des pCO_2 in der MH-S-Gruppe lag mit 44 ± 4 mmHg niedriger als der entsprechende Wert in der MH-N-Gruppe vom 48 ± 8 mmHg. In der MH-S Gruppe kam es über den gesamten Beobachtungszeitraum zu keiner Veränderung des pCO_2. In der MH-N Gruppe stieg der pCO_2 kontinuierlich bis auf 52 ± 9 mmHg am Ende des Beobachtungszeitraumes an. Im Intervall von 10-70 Minuten waren die Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen signifikant. Bei keinem der untersuchten Tiere wurde über die Versuchszeit ein $pCO_2 \geq 70$ mmHg gemessen.

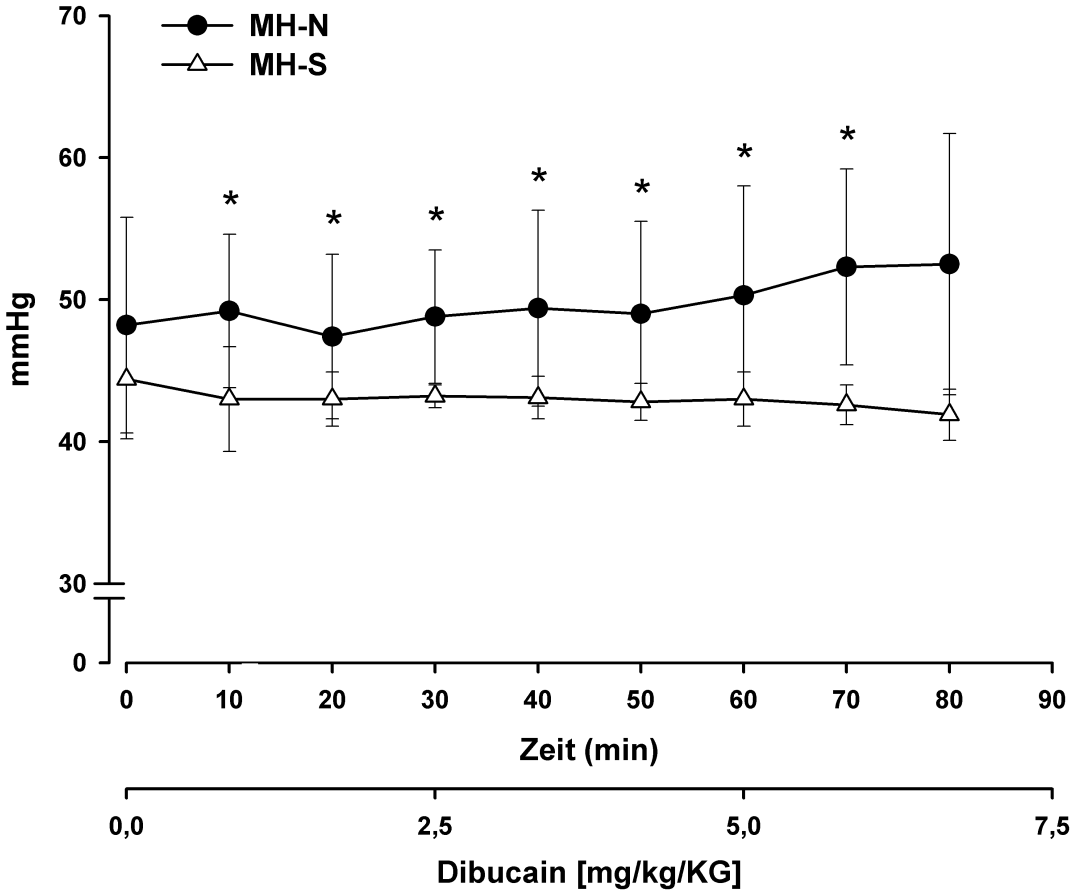

Abbildung 9

CO_2–Partialdruck (pCO_2) im zentralvenösen Blut von Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und Schweinen ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumulativer Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten.*

pH-Wert

Der Verlauf des pH-Wertes im zentralvenösen Blut nach kumulativer Gabe von Dibucain wird aus Abbildung 10 ersichtlich. Der Ausgangs-pH-Wert in der MH-S-Gruppe von 7,40 ± 0,03 war mit dem der MH-N-Gruppe von 7,37 ± 0,10 vergleichbar. In der MH-S-Gruppe kam es über den Beobachtungszeitraum zu einem leichten Anstieg des pH-Wertes auf pH 7,43 ± 0,03. In der MH-N-Gruppe führte die Gabe von Dibucain zu einem Absinken auf pH 7,34 ± 0,10 nach 80 Minuten. Im Beobachtungszeitraum von 10-80 Minuten waren die Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen signifikant. Bei keinem der untersuchten Tiere wurde über die Versuchszeit ein pH-Wert ≤ 7,2 gemessen.

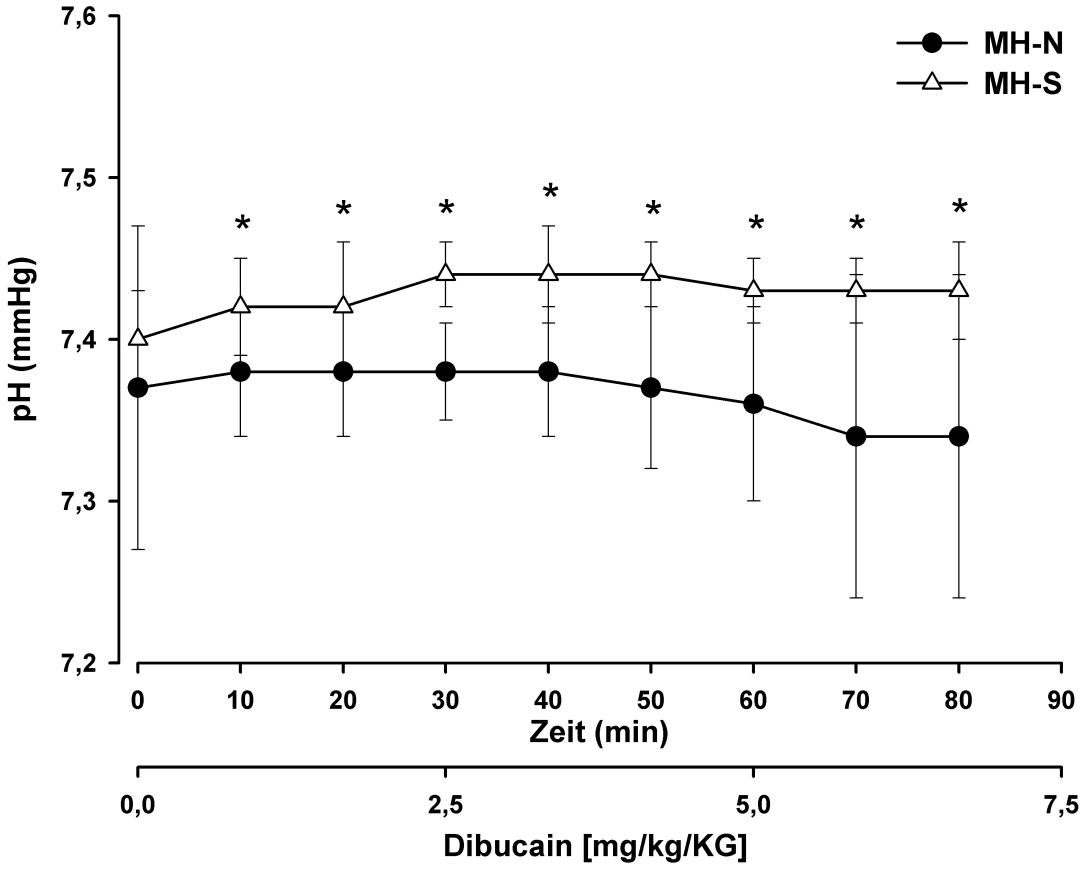

Abbildung 10

pH-Wert im zentralvenösen Blut von Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und Schweinen ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumulativer Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten.*

Lactat

Der Lactat-Wert im zentralvenösen Blut nach kumulativer Gabe von Dibucain ist in Abbildung 11 dargestellt. Der Ausgangswert des Lactat in der MH-S-Gruppe von 3,5 ± 2,1 mmol/l lag im Vergleich zu dem der MH-N-Gruppe von 2,4 ± 1,4 mmol/l höher. Die Gabe von Dibucain führte über den Beobachtungszeitraum zu einem leichten Abfall der Lactat-Werte in der MH-S- auf 2,2 ± 1,8 mmol/l und zu einem leichten Anstieg auf 2,8 ± 0,4 mmol/l in der MH-N-Gruppe. Nach 30 und 40 Minuten waren die Messergebnisse der diagnostischen Gruppen vergleichbar. Signifikante Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen fanden sich nicht.

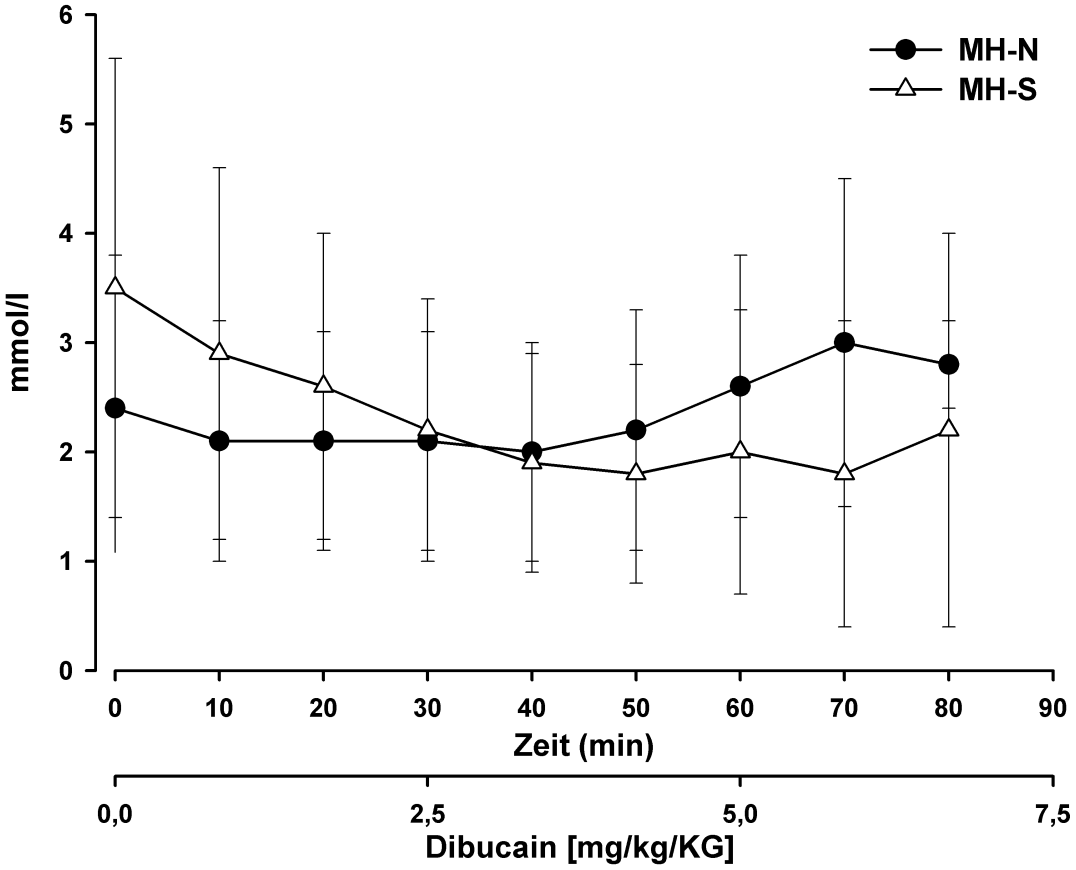

Abbildung 11

Lactat im zentralvenösen Blut von Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumulativer Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0 ,05 versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten*

Creatinphosphokinase

Aus Abbildung 12 wird der Verlauf der Creatinphosphokinase-Werte (CK) im zentralvenösen Blut nach kumulativer Gabe von Dibucain ersichtlich. Der Ausgangswert der CK in der MH-S-Gruppe von 309 ± 124 U/l war verglichen mit dem der MH-N-Gruppe mit 149 ± 50 U/l signifikant höher. Die CK-Werte der MH-N-Gruppe veränderten sich über den Beobachtungszeitraum nicht. In der MH-S-Gruppe kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg auf 801 ± 627 U/l nach 80 Minuten. Im Beobachtungsintervall von 0-60 Minuten waren die Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen signifikant.

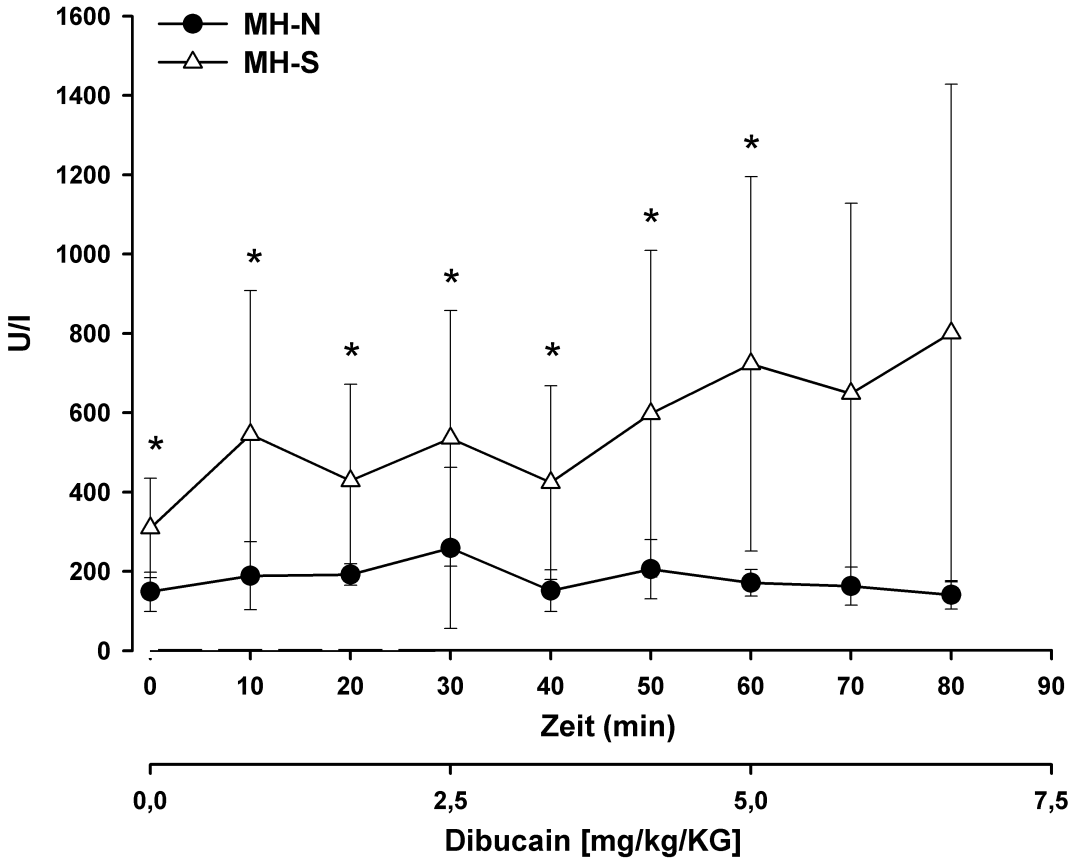

Abbildung 12

Creatinphosphokinase (CK) im zentralvenösen Blut von Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und Schweinen mit ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumulativer Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten.*

Körpertemperatur

Die Entwicklung der rektalen Körpertemperatur nach kumulativer Gabe von Dibucain kann aus Abbildung 13 entnommen werden. Der Ausgangswert von 38,5 ± 0,7 °C war bei MH-S wie bei MH-N identisch. In beiden diagnostischen Gruppen kam es während des Experiments zu einem Temperaturabfall, der in der MH-S-Gruppe mit 37,3 ± 0,6° C deutlich stärker ausgeprägt war, als in der MH-N-Gruppe. Hier betrug die Temperatur nach 80 Minuten 38,2 ± 0,5 °C. Im Messbereich von 15-30, 40-45 und 60-80 Minuten waren die Unterschiede zwischen MH-S und MH-N signifikant.

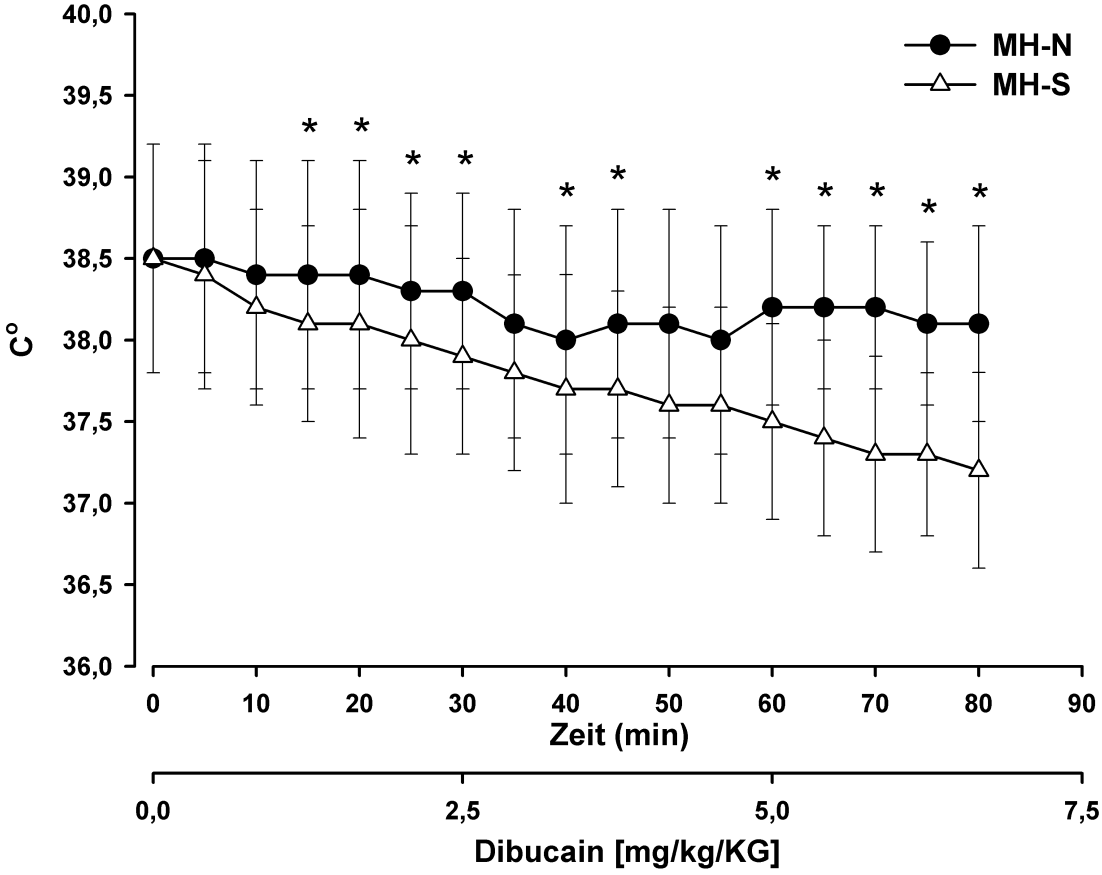

Abbildung 13

Rektale Körpertemperatur von Schweinen mit Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-S, n=7) und ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=7) nach kumultaiver Gabe von Dibucain.

*Mittelwerte ± SD. * p < 0,05 MH-S vs. MH-N, # < 0,05 MH-S versus 0 Minuten, § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten.*

3.2. In-vitro Experimente

3.2.1. Standard Diagnostik der MH

Die genetisch determinierte MH-Diagnose wurde bei allen 16 Schweinen (8 MH-N und 8 MH-S Tiere) durch den IVKT nach dem Protokoll der EMHG bestätigt. Alle genetisch MH-suszeptiblen Tiere konnten durch den in-vitro Kontrakturtest mit Halothan und Koffein als MH-S, alle Kontrolltiere als MH-N klassifiziert werden. MH-E Resultate wurden nicht beobachtet.

3.2.2. In-vitro Kontrakturtest mit kumulativer Dibucain Gabe

Skelettmuskelpräparate von 8 MH-S- und 8 MH-N-Tieren wurden im in-vitro Kontrakturtest mit kumulativer Dibucain Gabe untersucht. Die kumulative Gabe von Dibucain bewirkte konzentrationsabhängig eine Kontrakturentwicklung bei allen Skelettmuskelpräparaten der MH-S und MH-N Tiere. Typische Originalregistrierungen der Kontraktur- und Kontraktionskraftentwicklung sind in den Abbildungen 14 a und b dargestellt.

Die Kontraktionskraft des MH-S Muskels (Abbildung 14a) erreichte bei einer Dibucaingabe von 0,1 mmol/l ihr Maximum und nahm dann kontinuierlich bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 1,0 mmol/l Dibucain ab. Bei einer Konzentration von 0,4 mmol/l zeigte sich eine dosisabhängige Kontrakturentwicklung, die sich mit jeder Dosissteigerung bis zu einem Maximum bei Registrierungsende verstärkte.

Die Kontraktionskraft des MH-N Muskels (Abbildung 14b) blieb bis zur Gabe einer Dibucainkonzentration von 0,1 mmol/l nahezu konstant und nahm dann kontinuierlich bis zur höchsten Konzentration von 1,0 mmol/l Dibucain ab. Es zeigte sich erst nach der Höchstdosis von 1,0 mmol/l Dibucain eine minimale Kontraktur des MH-N Muskels.

MH-S

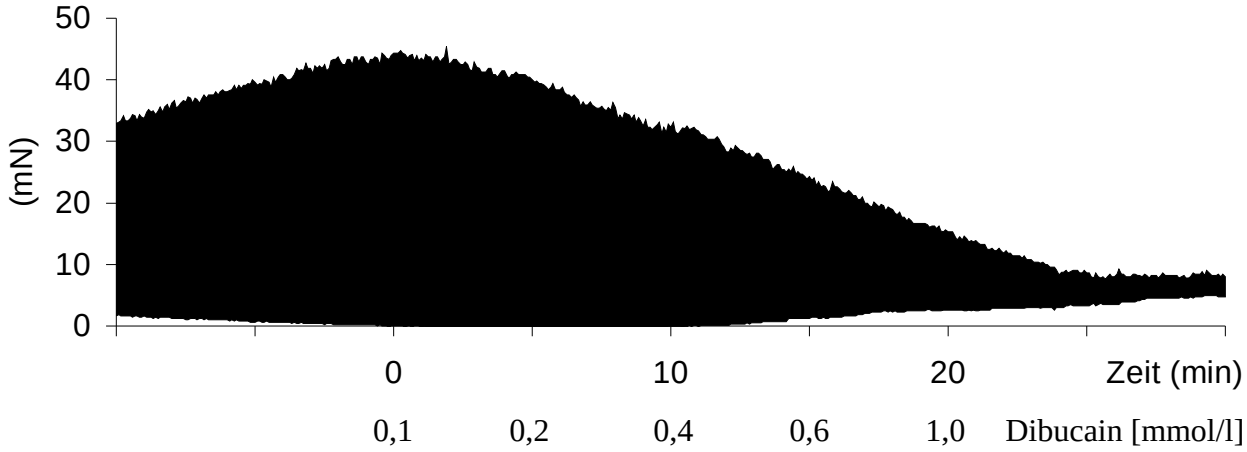

Abbildung 14a

Originalregistrierungen eines MH-S-Muskelbündels im Dibucain in-vitro-Kontrakturtest. Kontraktur- und Kontraktionskraftentwicklung (mN) bei kumulativer, je 5-minütiger Zufuhr von 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6 – 1,0 mmol/l Dibucain Badkonzentration.

MH-N

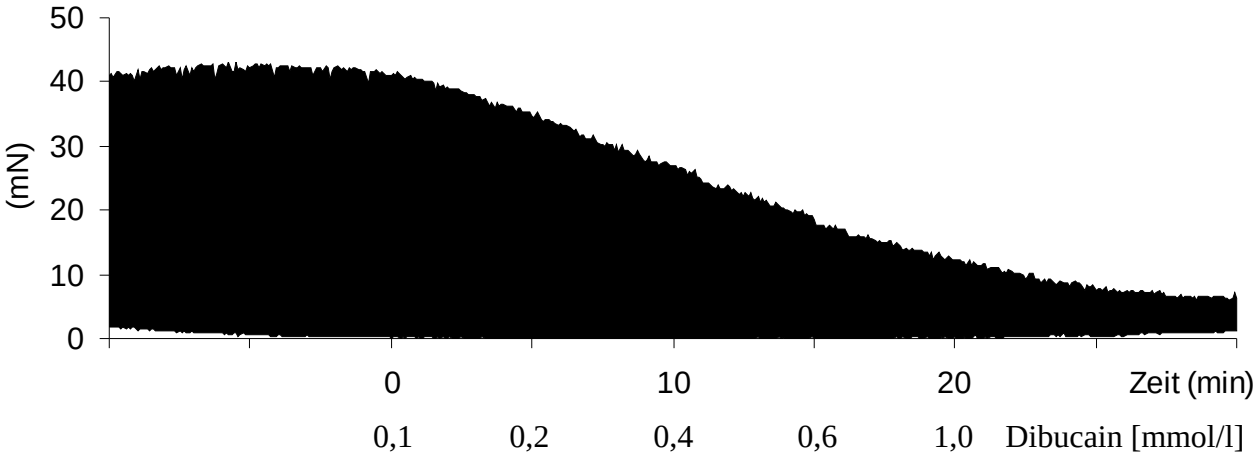

Abbildung 14b

Originalregistrierungen eines MH-N-Muskelbündels im Dibucain in-vitro-Kontrakturtest. Kontraktur- und Kontraktionskraftentwicklung (mN) bei kumulativer, je 5-minütiger Zufuhr von 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6 – 1,0 mmol/l Dibucain Badkonzentration.

Die Entwicklung der Muskelkontraktionskraft bei allen MH-S- und MH-N-Muskelpräparaten ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Muskelkontraktionskkraft zeigte sich in der MH-N-, verglichen mit der MH-S-Gruppe, im Untersuchungsintervall von 0,0 bis 0,4 mmol/l Dibucain als deutlich ausgeprägter. Die Ausgangswerte betrugen 69,0 mN (21,1-156,2 mN) in der MH-N- und 33,0 mN (10,0-109,9 mN) in der MH-S-Gruppe. Diese Werte zeigten sich bei einer Dibucain-Badkonzentration von 0,1 mmol/l Dibucain in der MH-N-Gruppe nahezu unverändert, in der MH-S-Gruppe kam es zu einem leichten Abfall auf 24,4 mN (9,4-109,4 mN). Im weiteren Verlauf fielen die Werte bis zu einer Dibucain-Konzentration von 0,6 mmol/l deutlich auf 8,5 mN (2,8-17,2 mN) in der MH-N- und 2,6 mN (2,0-10,3 mN) in der MH-S-Gruppe ab. Die Muskelkontraktionskraft war zwischen 0,0 und 0,4 mmol/l Dibucain in der MH-N-Gruppe signifikant stärker ausgeprägt als bei MH-S. Es kam über den gesamten Beobachtungszeitraum, trotz der zum Teil signifikanten Unterschiede, zu einer Überlappung von Einzelwerten von MH-N und MH-S. Nach der höchsten Dibucain-Konzentration von 1,0 mmol/l zu Untersuchungsende fanden sich keine Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen mehr.

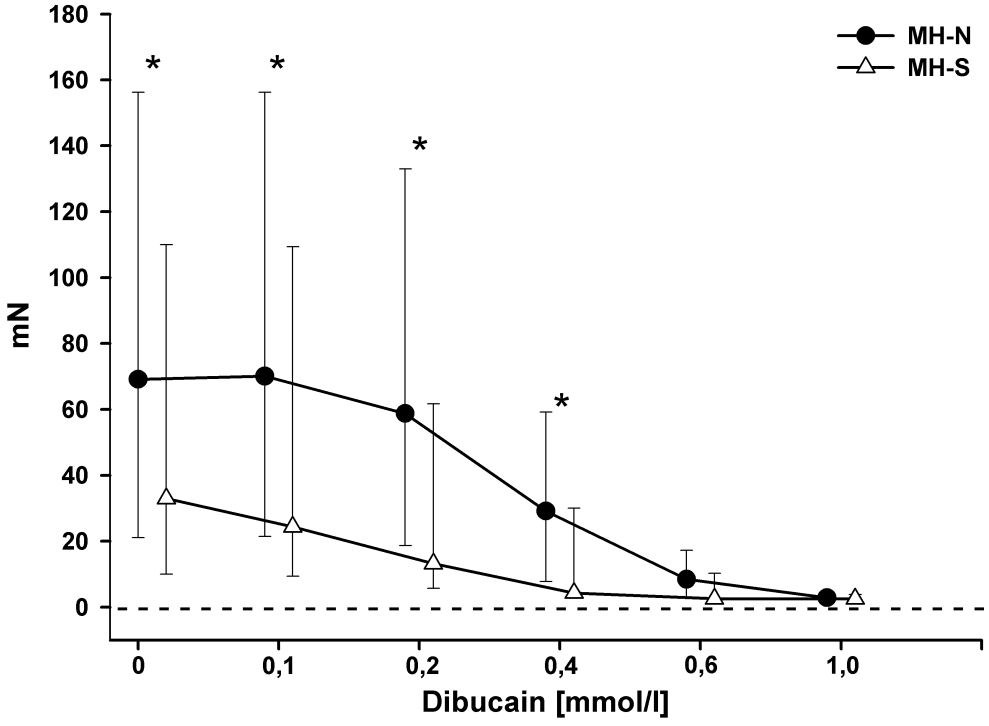

Abbildung 15

Muskelkontraktionskraft (mN) bei je 5-minütiger kumulativer Zufuhr von 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 1,0 mmol/l Dibucain bei Skelettmuskelpräparaten von Schweinen mit Disposition zur malignen Hyperthermie (MH-S, n=8) und ohne Disposition zur Malignen Hyperthermie (MH-N, n=8).
*Mediane und Variationsbreiten, * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten.*

Die Kontrakturentwicklung der MH-S- und MH-N-Muskelpräparate ist in Abbildung 16 dargestellt. In der MH-S- kam es im Vergleich zur MH-N-Gruppe bereits bei niedrigeren Dibucain-Badkonzentrationen zu einer Kontrakturentwicklung. In der MH-S-Gruppe wurde bereits bei der niedrigsten Dibucain-Konzentration von 0,1 mmol/l eine leichte Kontrakturentwicklung von 0,5 mN (0,2-0,8 mN) beobachtet. Die Kontrakturzunahme war zwischen 0,2 mmol/l Dibucain mit 1,2 mN (0,0-28,2 mN) und 0,4 mmol/l Dibucain mit 7,6 mN (0,6-32,8 mN) am ausgeprägtesten und nahm dann bis Untersuchungsende bei einer Dibucain-Badkonzentration von 1,0 mmol/l kontinuierlich auf das Niveau von 10,9 mN (5,5-37,0 mN) zu. In der MH-N-Gruppe war erst ab einer Dibucain-Konzentration von 0,4 mmol/l eine leichte Kontrakturentwicklung von 0,1 mN (0,0-2,2 mN) zu verzeichnen, welche dann bis Untersuchungsende auf Werte von 5,1 mN (2,8-9,4 mN) anstieg. Bei Vergleich der beiden Gruppen war die Kontraktur in der MH-S-Gruppe zu jedem Messzeitpunkt signifikant stärker ausgeprägt als in der MH-N-Gruppe. Bis auf die Dibucain-Badkonzentration von 0,1 mmol/l kam es zu jedem Messzeitpunkt (0,2; 0,4; 0,6 und 1,0 mmol/l Dibucain) zu einer Überlappung von Einzelwerten.

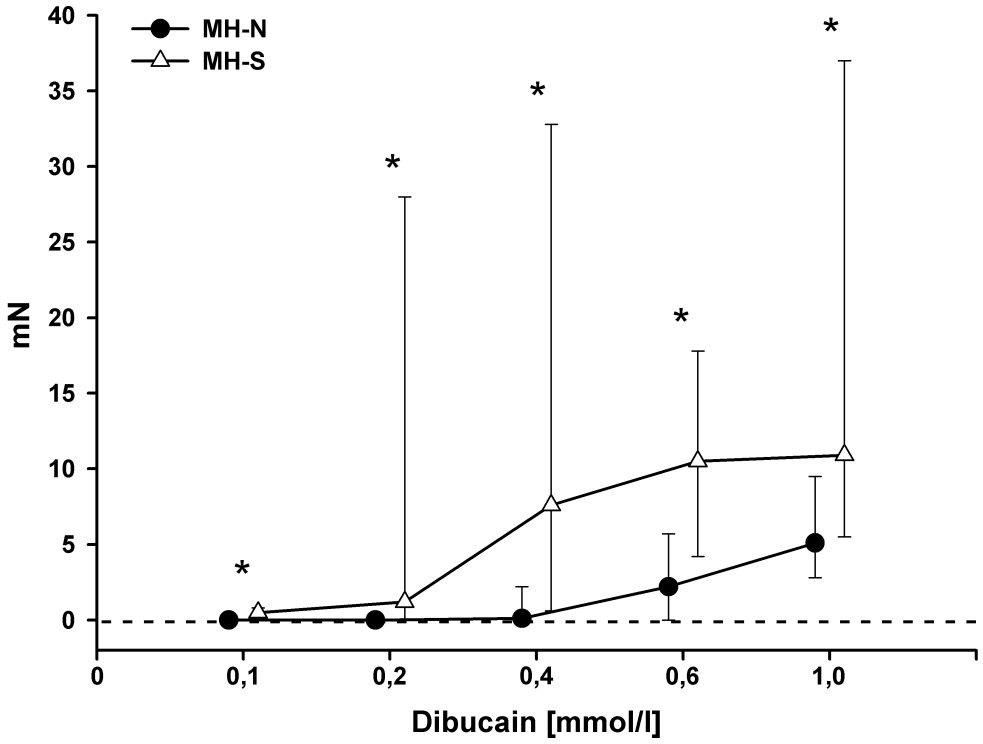

Abbildung 16

Muskelkontrakturen (mN) bei je 5-minütiger kumulativer Zufuhr von 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 1,0 mmol/l Dibucain bei Sklelettmuskelpräparaten von Schweinen mit Disposition zur malignen Hyperthermie (MH-S, n=8) und ohne Disposition zur malignen Hyperthermie (MH-N, n=8)
*Mediane und Variationsbreiten, * p < 0,05 MH-S vs. MH-N; # p < 0,05 MH-S versus 0 Minuten; § p < 0,05 MH-N versus 0 Minuten.*

4. Diskussion

Das Lokalanästhetikum Dibucain erhöht dosisabhängig die Ca^{2+}–Konzentration im menschlichen Skelettmuskel. Daher wurde spekuliert, dass Dibucain zum einen in-vivo eine Triggersubstanz der MH sein, zum anderen eine in-vitro Diagnostik der MH ermöglichen könne. In der vorliegenden Untersuchung wurden diese Vermutungen überprüft.

Die in-vivo Untersuchungen wurden an je 7 MH-S- und MH-N-Schweinen in Allgemeinanästhesie mit kumulativer Zufuhr von Dibucain durchgeführt. In-vivo führte Dibucain weder bei MH-S- noch bei MH-N-Schweinen zu Entwicklung einer MH-Episode. Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen im Sinne einer MH-Entwicklung wurden nicht beobachtet. In-vivo ist Dibucain folglich keine Triggersubstanz der MH bei disponierten Schweinen.

Die in-vitro Kontrakturtests wurden an Skelettmuskelpräparaten von je 8 MH-S- und MH-N-Schweinen durchgeführt. Zusätzlich zur Standard-Diagnostik der MH wurden in-vitro Kontrakturtests mit kumulativer Zufuhr von Dibucain durchgeführt. Bei den in-vitro Kontrakturtests mit kumulativer Applikation von 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 1,0 mmol/l Dibucain war, aufgrund der Überlappung von Einzelwerten, keine klare Diskriminierung zwischen den diagnostischen Gruppen möglich.

Die Maligne Hyperthermie ist eine potentiell lebensgefährliche, hereditäre und akut verlaufende pharmakogenetische Erkrankung, der eine Dysregulation der intrazellulären Calciumhomöostase zugrunde liegt [40, 70, 79, 112]. Der Vererbungsgang beim Menschen wird als autosomal dominant mit variabler Penetranz beschrieben [6]. Bei vorhandener Disposition können verschiedene Faktoren Auslöser einer MH-Krise sein, beim Menschen sind dies vor allem volatile Inhalationsanästhetika und depolarisierende Muskelrelaxanzien, wie sie bei Allgemeinanästhesien zum Einsatz kommen. Der erhöhte Gehalt an myoplasmatischem Calcium führt zu einer verlängerten und verstärkten Interaktion der kontraktilen Filamente in der Skelettmuskulatur. Auch die Ca^{2+}-abhängigen Stoffwechselprozesse werden verstärkt aktiviert [70]. Dies mündet in die bei MH beobachteten Symptome, wie CO_2- und Temperaturanstieg, hypermetabole Stoffwechselentgleisung und Lactatazidose [40, 112]. Die inadäquate Versorgung der Zellen mit Sauerstoff führt zu einer Verschlechterung der initial gesteigerten aeroben Energiegewinnung. Lactatazidose und intramitochondriale Ca^{2+}-Akkumulation mit konsekutiver Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung wirken schließlich zytotoxisch [112]. Im Rahmen einer fulminanten MH-Krise kommt

es bei Verlust der Zellintegrität zu einer zunehmenden Membranpermeabilität für Ionen, Moleküle bzw. Enzyme. Dies führt dann bei ausbleibender therapeutischer Intervention letztendlich zum irreversiblen Zelluntergang und konsekutiv auch zum Zusammenbruch der Organfunktionen [101, 112].

Die experimentelle Beeinflussung der Ca^{2+}-Homöostase der Skelettmuskelzelle durch Dibucain ist in der Literatur vielfach belegt. Dibucain (Handelsnamen: Dibucain®, Nupercain®, Percain®, Cinchocain®), ein Chinolin-Derivat, wurde 1929 von *Mescher*, *Uhlmann* und *Hassner* synthetisiert. Es stellt den ersten Vertreter der Amid-Typ-Lokalanästhetika dar und kommt vor allem in der Spinalanästhesie, aber auch topisch, zur Anwendung [122].

Die Wirkungen von Dibucain auf die Skelettmuskelzelle weisen eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit auf. Dibucain besitzt in niedrigen Konzentrationen (0,08–0,64 mM) membranstabilisierende Eigenschaften [84] und inhibiert somit den Ca^{2+}-Efflux aus dem SR in das Cytosol [5, 87, 95]. Wird die Dibucain-Konzentration jedoch erhöht, so konnte gezeigt werden, dass bei 0,8 mM Dibucain die Kapazität der SR-eigenen Ca^{2+}-ATPase halb-maximal gehemmt wird, das cytosolische Ca^{2+}-Angebot wird somit konsekutiv erhöht [4, 17, 41, 73, 115]. Dies scheint durch Bindung von Dibucain an die Protein/Lipid-Grenzschicht zwischen SR-Membran und Ca^{2+}-ATPase bedingt zu sein. Hierdurch wird die Ca^{2+}-induzierte Hydrolyse der Ca^{2+}-ATPase inhibiert, ein Schritt, der zu ihrer Aktivierung notwendig ist [3, 128]. Der inhibitorische Effekt von Dibucain auf die Ca^{2+}-ATPase des SR wird durch Verminderung des cytosolisches Ca^{2+}-Angebot noch verstärkt [84]. Appliziert in hohen Dosen von > 0,9 mM führt Dibucain hingegen durch Leckagen in der SR-Membran letztendlich zur Membranlyse [17, 115, 128]. Dibucain steigert somit die Freisetzung von Calcium aus dem SR von Muskelzellen um den Faktor 5-10 [3, 127, 128] bei gleichzeitiger Hemmung dessen Wiederaufnahme [3, 84]. Dibucain senkt zusätzlich dosisabhängig die cytoplasmatische Ca^{2+}-Schwellenkonzentration, die zur Ca^{2+}-induzierten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR notwendig ist, steigert also folglich die Ca^{2+}–Sensitivität der Muskelzelle [3, 128]. Volle Reversibilität dieser Effekte bleibt bei Dosen < 3 mM erhalten. Diese Beobachtungen zeigen sich als von einander unabhängig und und bedingen sich nicht gegenseitig [128].

Das Bindungsverhalten von Ryanodin an den Ryanodin-Rezeptor (RYR1), dem Ca^{2+}-Freisetzungskanal des SR, wird durch Dibucain biphasisch beeinflusst. Niedrige Dibucain Konzentrationen < 100 µM führen zu einer Stimulierung, höhere Konzentrationen > 100 µM zur Inhibierung der Ryanodin-Bindung an den RYR1 [107]. Hierbei bindet Dibucain mit seinen lipophilen Seitenketten direkt an den RYR1 und führt somit zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Der

Mechanismus, welcher letztlich zur Stimulierung bzw. Inhibierung des RYR1 führt ist nicht abschließend geklärt. Ein wesentlicher Faktor hierfür scheint jedoch das cytosolische Ionenangebot zu sein. Bei 0,2 M NaCl wirkt Dibucain inhibitorisch auf den RYR1, bei 1,0 M NaCl stimulierend. Es wird daher spekuliert, der Grad der Ionisierung von Dibucain letztlich für dessen Verhalten am RYR1 verantwortlich sein könnte [107]. Dibucain erhöht zudem im Tierexperiment signifikant das Abdissoziieren von 1,4-Dihydropyridin von neuronalen Dihydropyridinrezeptoren (DHPR) [65]. Beide Rezeptoren, RYR1 und DHPR, spielen sowohl bei der physiologischen Erregungsübertragung auf die Skelettmuskelzelle, als auch in der Pathogenese der Malignen Hyperthermie eine entscheidende Rolle.

Aufgrund dieser Befunde wurde spekuliert, dass Dibucain zum einen in-vivo eine Triggersubstanz der MH sein, zum anderen eine in-vitro Diagnostik der MH ermöglichen könne. In der folgenden Untersuchung wurden diese Vermutungen überprüft.

4.1. In-vivo Experimente

Der Einfluß von Dibucain auf den Calcium-Haushalt der Skelettmuskelzelle ist experimentell vielfach nachgewiesen [3, 4, 5, 17, 21, 64, 65, 73, 84, 87, 95, 107, 115, 127, 128]. Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei Dibucain in-vivo um eine potentielle Triggersubstanz der Malignen Hyperthermie handeln könnte. Daher wurde in in-vivo-Untersuchungen der Versuch einer MH-Triggerung mit Dibucain an Schweinen mit genetisch determinierter MH-Veranlagung im Vergleich zu Kontrollschweinen durchgeführt.

Die kumulative Gabe von ansteigenden Dibucain-Dosen führte bei keinem der untersuchten Schweine zur Auslösung einer MH-Episode. Die definierten Kriterien für das Vorliegen einer MH wurden bei keinem der Tiere, weder mit MH-N noch mit MH-S Disposition nachgewiesen.

Die hämodynamischen Parameter veränderten sich im Versuchsverlauf. Alle Tiere reagierten auf zunehmende Dibucain-Dosen mit einem Abfall des mittleren arteriellen Drucks (MAP). Alle Tiere entwickelten dosisabhängig komplexe Herzrhythmusstörungen wie Bigeminus, ventrikulären und supraventrikulären Extrasystolen, Tachykardien und intermittierende Asystolien. Dies führte bei allen Tieren zur Entwicklung eines kardialen Schocks und konsekutiv zum Tode im Herz-Kreislauf-Versagen.

Die Körpertemperatur sank im Versuchsverlauf in beiden diagnostischen Gruppen ab, deutlich ausgeprägter in der MH-S- als in der MH-N-Gruppe. Der venöse pH-Wert veränderte sich in beiden Gruppen innerhalb der physiologischen Grenzen, in der MH-S-Gruppe ließ sich ein leichter Anstieg feststellen, wohingegen es in der MH-N-Gruppe zu einem leichten pH-Abfall kam. Die endtidale CO_2-Konzentration zeigte über den Untersuchungszeitraum nur wenig Veränderung, eine Hyperkarbie blieb in beiden Gruppen aus. Die Dibucain-Gabe führte bei den MH-S Tieren zu einem leichten Abfall der Lactat-Werte, in der MH-N Gruppe zu einem leichten Anstieg. Bei den CK-Werten kam es in der MH-S Gruppe zu einem deutlichen Anstieg, in der MH-N Gruppe fand sich keine Veränderung der CK-Werte.

Bei einem der MH-S Versuchstiere (p12) wurde nach Beendigung der Dibucain-Zufuhr der Versuch der MH-Triggerung mit Halothan unternommen mit dem Ziel, die MH-Suszeptibilität dieser diagnostischen Gruppe nachzuweisen. Das Tier entwickelte eine Tachykardie und komplexe Herzrhythmusstörungen mit konsekutiv deutlichem Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP). Außerdem zeigten sich eine Hyperthermie, Hyperkarbie und Azidose. Der Lactat-Spiegel stieg deutlich an. 15 Minuten nach Beginn der Halothan-Zufuhr hatte sich eine MH nach den oben genannten Kriterien entwickelt.

Für die Dosierung von Dibucain beim Menschen wird abhängig von der Dermatom-Höhe die intraspinale Applikation von 5-8 mg (Dermatom T_{10}) oder von 10–15mg (Dermatom T_4) 0,5%-igen hyperbaren Dibucains empfohlen. Es finden sich in der Literatur keine Daten über die therapeutische Dosierung von Dibucain beim Schwein. Aufgrund der in unseren Versuchen nachweisbaren hämodynamischen Effekte von Dibucain ist jedoch davon auszugehen, daß die Wirkungen identischer Dibucain-Dosen bei Mensch und Schwein vergleichbar sind. Ohne Berücksichtigung von Metabolisierung und Eliminierung dieser Substanz wurde den Tieren in unseren Versuchen 10,0 mg/kg/KG Dibucain über einen Zeitraum von 120 Minuten injiziert. Dies entspricht, einen 70kg schweren Erwachsenen zugrunde gelegt, einem 47–140-fachen der beim Menschen vorgeschlagenen therapeutischen Dosierung. Die LD_{50} für intravenöses Dibucain beträgt bei Mäusen 6,3 mg/kg/KG [109]. Diese Dosierung wurde somit deutlich überschritten. Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass Dibucain entweder topisch oder intraspinal appliziert wird, damit also nur ein sehr geringer Teil der verabreichten Dosis systemisch zur Wirkung kommt.

Die Maligne Hyperthermie weist jedoch bei Mensch und Schwein Unterschiede auf. Der Vererbungsmodus beim Menschen verläuft, anders als beim Schwein, autosomal dominant [14].

Die menschliche MH stellt im Unterschied zur porcinen MH ein multifaktorielles Geschehen mit variabler Penetranz dar [6]. Beim Schwein findet sich für die MH ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus. Der Defekt, der sogenannte HAL-Locus (Halothane sensitivity locus), ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert. [36, 93, 110]. Dieser Chromosomenabschnitt ist homolog mit der humanen Chromosomen Region 19q11.2-13.2, die unter anderem für den Ryanodin-Rezeptor des SR kodiert [76]. Beim Schwein findet sich auf dem Chromosom 6 die C1843T Basen-Mutation, die einzige bei Schweinen nachzuweisende Mutation, die immer mit dem MH-S Phänotypus gekoppelt ist [36]. Die korrespondierende Punktmutation im menschlichen Ryanodin-Rezeptor-Gen (C1840T) lässt sich nur bei 2-7% der MH-S Patienten nachweisen [111]. Beim Menschen sind dazu noch weitere MH-S assoziierte Mutationen der Chromosomen 1, 3, 5, 7, 17 und 19 bekannt, die nicht mit dem Ryanodin-Rezeptor (RYR1) in Verbindung stehen [54, 68, 81, 114]. Diese liegen in Regionen, die für andere den Ca^{2+}-Haushalt regulierende Zellbestandteile codieren. Eine Übertragung der Untersuchungen am Schweinemodell auf die humane MH ist daher nicht uneingeschränkt möglich. Es wäre vorstellbar, dass Triggermechanismen beim Menschen zu MH-Episoden führen, die im Schweinemodell nicht nachvollzogen werden können. Es ist daher auch möglich, dass aufgrund der genetischen Heterogenität bei einem Teil der MH-S-Patienten Mutationen in Regionen vorliegen, die für Dibucain-sensitive Faktoren der Ca^{2+}-Homöostase, wie die Ca^{2+}-ATPase des SR [4, 17, 41, 73, 115], die Stabilität der SR-Membran [17, 115, 128], oder die Ca^{2+}- Sensitivität der Muskelzelle [3, 128], codieren. Hierüber könnten möglicherweise gezielte molekulargenetische Untersuchungen Aufschluß geben.

Aufgrund der genetischen Variabilität des menschlichen MH-Vererbungsmodus wäre eine MH-Induktion durch Dibucain theoretisch vorstellbar. Es sind jedoch bisher keine durch Dibucain in-vivo getriggerten MH-Episoden dokumentiert. Eine MH-Triggerpotenz für Dibucain konnte durch vorliegende Untersuchung beim Schwein ausgeschlossen werden. Nach derzeitigem Kenntnisstand und den in dieser Untersuchung vorgelegten Ergebnissen ist der therapeutische Einsatz von Dibucain beim Menschen als unbedenklich zu betrachten.

Das Gefahrenpotential von Amid-Lokalanästhetika allgemein wird in der Literatur hinsichtlich einer möglichen MH-Triggerung widersprüchlich diskutiert. Die MHAUS („Malignant-Hyperthermia Association of the United States“) erklärte 1985 Lokalanästhetika mangels klinischer Beweise als unbedenklich im Hinblick auf MH [78]. Diverse Veröffentlichungen kommen bis heute zu demselben Ergebnis [25, 80, 94].

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es bei der Malignen Hyperthermie um ein Krankheitsbild mit großer klinischer Variabilität handelt. Milde, abortive Verläufe mit unspezifischer Symptomatik sind ebenso beschrieben wie fulminante und lebensbedrohliche MH-Krisen. Es ist somit nicht mit Sicherheit auszuschließen, dass milde MH-Verläufe übersehen und nicht als solche diagnostiziert wurden.

In der Literatur finden sich zudem zahlreiche Hinweise, die einen Einfluß von Amid-LA auf die Ca^{2+}-Homöostase der Skelettmuskulatur erkennen lassen. Hierbei wird deutlich, daß Amid-LA keine pharmakologisch homogene Gruppe darstellen, sondern vielmehr als jeweilige Einzelsubstanz differenziert betrachtet werden sollten.

Für Lidocain wurde gezeigt, dass es bei 37°C Muskelkontrakturen verursacht und Koffein- und Koffein/Halothan getriggerte Kontrakturen verstärkt. Die durch Lidocain getriggerten Kontrakturen weisen eine Konzentrationsabhängigkeit auf. In niedrigen Dosierungen interagiert Lidocain mit dem Tranversalen-Tubulussystem der Skelettmuskelzelle. Dies führt zu einem gesteigerten Ca^{2+}-Efflux aus dem SR in das Cytosol. In höheren Dosierungen wird zusätzlich die Ca^{2+}-Wiederaufnahme in das SR inhibiert [113]. Lidocain erhöht zusätzlich den Sauerstoffbedarf der Skelettmuskulatur [86].

Die Fähigkeit von LA, Kontrakturen auszulösen, scheint von vielen Faktoren, wie zum Beispiel Temperatur und pH, abhängig zu sein. Während Procain, Lidocain und Tetracain bei 20°C bei der Skelettmuskulatur des Frosches Koffein-getriggerte Kontrakturen kompetitiv inhibieren, zeigen die vorgenannten Substanzen, ähnlich dem Lidocain, bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C selbst deutlich ausgeprägte Kontrakturen. Die durch Lidocain getriggerten Kontrakturen fielen bei pH 7,2 deutlich stärker aus als bei pH 6,0. Procain löst darüber hinaus bei der Skelettmuskulatur der Ratte sowohl bei 20° als auch bei 37°C Kontrakturen aus [56].

Zahlreiche Fallberichte geben zusätzlich Hinweise, dass LA auch in-vivo eine MH auslösen könnten. Im Rahmen einer Epiduralanästhesie mit Lidocain und Bupivacain traten Symptome der MH, wie Muskelrigidität, Hyperthermie, Zyanose, Tachykardie und Hyperpyrexie, auf [61]. Ein IVKT war nicht durchgeführt worden. Die Diagnose MH konnte somit weder gesichert, noch ausgeschlossen werden. Ein weiterer Patient bot nach i.v.-Applikation von insgesamt 450 mg Lidocain bei ventrikulären Tachyarrhythmien einen Antieg der Körpertemperatur auf 41,7°C und generalisiertes Muskelzucken. Die Serumspiegel der CK sowie des Myoglobins waren massiv

erhöht. Die Symptomatik zeigte sich erst nach Beendigung der Lidocain-Zufuhr und einer intravenösen Therapie mit 100 mg Dantrolen rückläufig [117]. Weitere Fallberichte lassen für Lidocain und Bupivacain eine mögliche Triggerung der MH vermuten [37, 59, 129]. Hierbei kam es im Rahmen von Spinal- bzw. Epiduralanästhesien zu MH-ähnlichen Symptomen wie Hyperthermie, Muskelzittern und Azidose. Die Creatininphosphokinase war in diesen Fällen deutlich erhöht.

Die Übertragbarkeit der in dieser Arbeit vorgestellten in-vivo Befunde mit dem Natriumkanalblocker Dibucain auf Amid-Lokalanästhetika allgemein scheint aufgrund der pharmakologischen Inhomogenität dieser Gruppe jedoch nur sehr begrenzt möglich zu sein.

Es erscheint unter kritischer Würdigung der vorliegenden Literatur durchaus möglich, dass Einzelsubstanzen aus der Gruppe der Amid-Lokalanästhetika, wie z. B. Lidocain und Bupivacain, MH-Triggerpotential besitzen könnten [37, 59, 129]. Dies zu untersuchen, sollte weiteren Untersuchungen vorbehalten sein.

4.2. In-vitro Experimente

Die Diagnostik der MH-Veranlagung erfolgt durch in-vitro Kontrakturtests (IVKT) mit Halothan und Koffein. Diese Untersuchungsverfahren zeichnen sich zwar durch eine hohe Sensitivität von 99% und gute Spezifität von 93,6% aus, allerdings kann es zu falsch-postiven, und besonders gefährlich, falsch-negativen Ergebnissen kommen. Daher muß es das Ziel sein, die MH-Diagnostik und somit die Sicherheit der Patienten weiter zu verbessern [90].

Die Beobachtung, dass Skelettmuskelpräparate von Patienten, die eine MH-Krise überlebt hatten, unter in-vitro Bedingungen bei niedrigeren Konzentrationen von Halothan und Koffein mit Kontrakturen reagierten, als Präparate von Kontrollpatienten, führte zur Entwicklung und Einführung des IVKT als MH-Standarddiagnostik [58]. Seine Anwendung wird in zwei standardisierten Anwendungsprotokollen geregelt, dem Protokoll der „European Malignant Hyperthermia Group“ (EMHG) [29], sowie dem Protokoll der „North American Malignant Hyperthermia Group“ (NAMHG) [66]. Beide Protokolle definieren Schwellenwerte für Halothan oder Koffein bedingte Kontrakturen, die dann die Zuordnung in diagnostische Kategorien ermöglichen. Bei der Diagnose MH-N wird eine MH-Disposition ausgeschlossen, bei der Diagnose MH-S wird sie angenommen. Das EMHG-Protokoll läßt zusätzlich noch die Diagnose MH-E zu, bei der die MH-

Disposition nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte. 10-15% der untersuchten Patienten fallen in diese Gruppe [90]. Nach dem NAMHG-Protokoll werden diese Patienten als MH-S klassifiziert. Aus Sicherheitsgründen werden Patienten mit der Diagnose MH-E für klinische Zwecke in Europa ebenfalls als MH-S eingestuft. Die sehr gute Sensitivität des IVKT von 99% zu Ungunsten einer Spezifität von 93,6% trägt dafür Sorge, dass falsch-negative Resultate zwar weitgehend ausgeschlossen werden können [90], jedoch finden sich solche Fälle in der Literatur [55, 126]. *Wedel* und *Nelson* präsentieren vier Fallberichte, in welchen Patienten < 10 Jahre während Allgemeinanästhesien unter Verwendung von Succhinylcholin und volatilen Anästhetika Symptome der MH, wie Azidose, Hyperthermie, Muskelrigor und CK-Anstieg, zeigten [126]. Eine in zwei Fällen durchgeführte Dantrolentherapie erbrachte einen raschen Rückgang der Symptome. Es wurden in-vitro Kontrakturtests mit Halothan und Koffein durchgeführt, die im Gegensatz zum klinischen Bild durchwegs negative Ergebnisse zeigten. Ein zusätzlicher, in Nordamerika optional durchgeführter Test, der HCSC („Halothane caffeine-specific concentration“), erbrachte in den vorgenannten vier Fällen jedoch positive Resultate. Dieser Test gilt als positiv, wenn sich bei einer Koffein-Konzentration < 1 mM Kontrakturen zeigen, nachdem das Skelettmuskel-Präparat zuvor für 10 min Halothan in einer Konzentration von 1% ausgesetzt war. In allen Fällen unterzogen sich auch Familienangehörige, Väter und in einem Fall zwei Geschwister, IVKT-Testungen. Diese zeigten sowohl im etablierten IVKT mit Halothan und Koffein, als auch im HCSC positive Ergebnisse. Der HCSC gilt jedoch als ausgeprägt sensitiv, was zu einem deutlichen Verlust an Spezifität und somit zu vermehrt falsch-positiven Testungen führt [126]. *Wedel* und *Nelson* schlußfolgern, dass die in den vier Fällen isolierten positiven HCSC-Resultate auf die hohe Sensitivität des Tests, sowie den heterogenen, und bislang nicht in allen Einzelheiten geklärten Vererbungsmodus der menschlichen MH zurückzuführen sein könnten. Desweiteren wird spekuliert, dass die unreife Muskulatur der Patienten für die negativen Resultate im IVKT mit Halothan und Koffein zumindest mitverantwortlich sein könnte. Für eine abschließende Beurteilung wird seitens der Autoren jedoch eine größere Zahl an Kontrolldaten gefordert. Ein falsch-negatives Ergebnis durch den IVKT kann letztlich nicht augeschlossen werden [126].

Es bleibt der Verdacht, dass das etablierte Testverfahren, der IVKT mit Halothan und Koffein, in Einzelfällen falsch-negative Testresultate liefern könnte. Die dann als MH-N eingestuften Patienten wären im Falle einer Narkose mit MH-Triggersubstanzen extrem gefährdet.

In einer Bicenter-Studie wird auf die erhöhte Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Testergebnissen bei Patienten mit niedrigen a-priori-Risiken hingewiesen. Es zeigte sich auch eine

erhöhte Diskrepanz der Testergebnisse der verschiedenen Zentren bei Kontrakturen < 5 mN [92]. Ein von bisher 2 mN auf 5 mN erhöhter Schwellenwert würde zwar zu einer deutlichen Erhöhung der Spezifität des IVKT führen, dies ginge jedoch zu Lasten einer dann signifikant geringeren - und somit nicht akzeptablen – Sensitivität [90]. Das Gefahrenpotential falsch-positiver Testergebnisse (zwischen 7% im europäischen und 22% im nordamerikanischen Protokoll) ist verglichen mit falsch-negativen (<1% im europäischen und 3% im nordamerikanischen Protokoll) als weit geringer einzuschätzen. Falsch-positive Ergebnisse führen jedoch zur Stigmatisierung des Patienten und zur Indikation weiterer IVKT-Untersuchungen bei deren Blutsverwandten [7].

In der Vergangenheit wurden daher große Anstrengungen unternommen, Alternativen zum IVKT zu entwickeln, beziehungsweise den bestehenden Test mit den Triggersubstanzen Koffein und Halothan zu optimieren. Da zu dessen Durchführung eine Muskelbiopsie notwendig ist, wird der Patient unter anderem in hohem Maße durch den Zeitaufwand und die postoperativen Schmerzen beeinträchtigt. Dazu kommen die nicht unerheblichen Kosten für den stationären Aufenthalt, sowie die der Speziallaboratorien. Zusätzlich wird der IVKT bei Kindern aufgrund der Unreife der Muskulatur erst ab einem Alter von > 4 Jahren angewandt, einige Zentren setzen noch höhere Alters- und Gewichtsgrenzen (> 10 Jahre, > 25-30 kg/KG) voraus. Der IVKT ist somit als allgemeine Screening-Methode ungeeignet. Probleme bereitet auch die Variabilität der IVKT-Ergebnisse zwischen verschiedenen Testzentren, die zum Teil auch auf Anwendung unterschiedlicher Testprotokolle zurückzuführen ist. So wurden in einer Studie 5 von 74 Patienten nach dem nordamerikanischen Protokoll als MH-negativ eingestuft, nach dem europäischen jedoch als MH-suszeptibel [92]. Es finden sich jedoch auch Unterschiede zwischen Testzentren, die das gleiche Testprotokoll anwenden. Das MH-Zentrum in Philadelphia/USA erzielt, verglichen mit anderen MH-Labors, reproduzierbar geringere Kontrakturen im IVKT mit Koffein, obgleich der Test augenscheinlich analog zu dem anderer Zentren zur Anwendung kommt [89]. Die Verwendung von Muskelbiopsien, also biologischen Material, bringt weitere Schwieirgkeiten mit sich. Ein IVKT muß binnen fünf Stunden nach Probenentnahme durchgeführt werden, andernfalls ist das Muskelgewebe nicht mehr zu verwerten. Dies macht folglich eine weitere Testung in einem anderen Zentrum, welche wertvolle Vergleichsdaten liefern könnte, aufgrund der geographischen Entfernung, unmöglich. Dieser Umstand wiederum erschwert es, Standards zu etablieren, die für alle Laboratorien Gültigkeit besitzen. Nicht geklärt ist zudem, warum bis zu 30% der Skelettmuskelproben ein und desselben Patienten in parallel durchgeführten IVKTs voneinander divergierende Ergebnisse liefern [103].

Daher wurden zahlreiche Versuche unternommen, nicht-invasive Verfahren zur MH-Diagnostik zu entwickeln. Es bestand die Hoffnung, dass ein im Vergleich zum etablierten IVKT-Modell volkswirtschaftlich deutlich günstigeres und statistisch zuverlässigeres Diagnostikum gefunden werden könnte, welches sich dann womöglich auch für Screening-Untersuchungen eignen würde.

Die Einführung des „Clinical Grading Scale“ (CGS) 1994 in die klinische Praxis stellt einen solchen Ansatz dar, die Patientensicherheit durch ein nicht-invasives Diagnostikmittel zu verbessern [67]. Durch Bewertung von MH-Zwischenfällen aus der Vorgeschichte sowie der Familien- und Eigenanamnese seitens des Anästhesisten sollte hierbei anhand eines Scoring-Systems die Wahrscheinlichkeit einer MH-Veranlagung objektiv bestimmt werden. Als problematisch erweist sich jedoch die Tatsache, dass es bislang aufgrund der Heterogenität und Unspezifität der Symptome nicht gelungen ist, für die Maligne Hyperthermie eine allgemeingültige Definition zu finden [89]. Aus der Unspezifität der MH-Symptome folgt, dass der CGS ebenfalls nicht spezifisch sein kann [121]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass bei zu strengen Scoring-Kriterien milde MH-Verläufe übersehen werden und umgekehrt, ein zu allgemein gefasstes Scoring-System zu falsch-positiven Ergebnissen führt [89]. Der CGS kann daher lediglich bei der Abschätzung der MH-Gefährdung hilfreich sein, den IVKT als Goldstandard der MH-Diagnostik jedoch nicht ersetzen [121].

Auch molekulargenetische Methoden konnten den IVKT bisher nicht als Standarddiagnostikum ablösen. Die MH wird beim Menschen autosomal dominant mit variabler Penetranz vererbt [6]. Rund 50 % aller betroffenen Familien weisen Defekte des Ryanodin Rezeptor Genes (RYR1) auf, welches auf dem Chromosom 19 lokalisiert ist [34, 57, 105]. Der RYR1 Rezeptor stellt den Calcium-Freisetzungskanal des SR dar. Mehr als 20 Punktmutationen dieses Gens, die mit MH assoziiert sind, sind bislang bekannt [57]. Für 15 dieser Mutationen konnten bislang funktionelle Auswirkungen auf das Verhalten des RYR1-Rezeptors nachgewiesen werden [34]. Darüber hinaus sind weitere Mutationen auf den Chromosomen 1, 3, 5, 7 und 17 bekannt, bei welchen eine Beteiligung am MH-Syndrom vermutet wird [54, 68, 81, 114]. Für bislang zwei Mutationen des Dihydropyridin-Rezeptors ist eine Beteiligung an MH belegt, lokalisiert auf den Chromosomen 7 und 17 [23]. Molekulargenetische Methoden erwiesen sich jedoch wegen der großen genetischen Heterogenität bislang in der MH-Diagnostik als nicht geeignet [110]. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des IVKT können sie jedoch in einzelnen Fällen zur Diagnosestellung

bzw. -sicherung herangezogen werden [105]. Der IVKT bleibt daher der Goldstandard der MH-Diagnostik [110, 121].

Die bisher unternommenen laborchemischen und histologischen Ansätze zur MH-Diagnostik konnten den IVKT ebenfalls nicht ersetzen. Untersuchungen von Thrombozyten [45], Erythrozyten [35] und mononukleären Zellen [62, 72] erwiesen sich bislang als nicht geeignet. Auch die Messung der CK als Diagnostikum erscheint wenig sinnvoll, da sich Normalwerte bei MH-S Patienten finden, ebenso wie erhöhte CK-Werte bei einer gesicherten MH-N Diagnose [40]. Messungen von Ca^{2+}–Konzentrationen im Cytoplasma und in Zellorganellen erwiesen sich ebenfalls als nicht sensitiv [62]. Bei histologischen Untersuchungen von MH-S Muskelpräparaten fanden sich in Skelettmuskelpräparaten von MH-S Patienten in 35% der Fälle unspezifische pathologische Veränderungen wie Nekrosen und Kaliberschwankungen der Muskelfasern, während sich bei MH-N Patienten diese Veränderungen nicht nachweisen ließen [77, 120]. Einen neuen histologischen Ansatz scheinen die „Central-core-like-structures“ (CCLS) darzustellen, dies sind unscharf begrenzte, zentrale Defekte in Muskelfasern [13]. Da diese Veränderungen signifikant mit der Diagnose MH-S/E assoziiert sind, werden sie als valides Kriterium der MH-Diagnosesicherung diskutiert. Der IVKT kann hierdurch jedoch nicht ersetzt werden, da nur ein kleiner Prozentsatz der MH-Patienten diese Strukturanomalie aufweist [2].

Bisher gelang es trotz großer Anstrengungen weder durch laborchemische, molekulargenetische oder histologische Ansätze, ein alternatives Testverfahren bei Verdacht auf MH oder zu allgemeinen Screening-Zwecken zu entwickeln, welches sich gegenüber dem etablierten IVKT mit Halothan und Koffein hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und volkswirtschaftlicher Erwägungen als überlegen oder zumindest ebenbürtig erwiesen hätte. Dies liegt vor allem in der multifaktoriellen Pathogenese, der variablen Penetranz der genetischen Prädisposition und der variablen klinischen Symptomatik der humanen MH begründet [17, 23, 34, 54, 57, 81, 105, 110, 114]. Bislang ist somit nicht erkennbar, dass der IVKT in der MH-Diagnostik in absehbarer Zeit durch ein ähnlich valides und nicht-invasives Testverfahren ergänzt oder ersetzt werden könnte.

Daher war und ist es das Bestreben, den bestehenden Standard-IVKT durch Einführung neuer Testsubstanzen zu optimieren. Es wird dabei angestrebt, durch eine im Vergleich zu Halothan und Koffein höhere Sensitivität und Spezifität die Patientensicherheit weiter zu verbessern.

Ryanodin, ein pflanzliches Alkaloid, schien aufgrund seiner hohen Affinität zum Calcium-Freisetzungs-Kanal des SR (RYR1) der Muskelzelle als Testsubstanz geeignet zu sein [71]. Inzwischen gilt die zusätzliche Durchführung eines IVKT mit hochreinem Ryanodin als gut validiertes Verfahren in der MH-Diagnostik. Dieser Test stellt allerdings bislang noch kein Kriterium bei der Diagnosestellung der MH-Disposition dar [50, 123]. Die Zugabe von 1 µM hochreinem Ryanodin führt in MH-S-Skelettmuskelpräparaten zu früherer Kontrakturentwicklung als in MH-N-Präparaten. Darüber hinaus ermöglicht der IVKT mit Ryanodin Patienten, die im Standard-IVKT als MH-E diagnostiziert wurden, weiter zu differenzieren, das heißt, der MH-S- oder MH-N-Gruppe zuzuordnen [49]. In einer Multicenter-Studie zeigte sich die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Testzentrum. Einheitliche Diskriminationsgrenzen, sowie einheitliche diagnostische Kriterien, ließen sich bisher nicht festlegen. Es wird empfohlen, den IVKT mit Ryanodin unter Verwendung von Labor-spezifischen Diskriminationsgrenzen als Zusatz-Diagnostikum einzusetzen [51].

Eine weitere geeignete Testsubstanz für den IVKT scheint 4-Chloro-m-Cresol (4-CmC) zu sein. 4-CmC kommt bislang als Konservierungsmittel in Heparin-, Insulin- und Succinylcholinzubereitungen zur Anwendung und bindet selektiv an den Ryanodin-Rezeptor. Frühe Untersuchungen zeigten vielversprechende Ergebnisse, nutzten jedoch unterschiedliche Protokolle [91, 125]. Eine aktuelle europäische Multicenter-Studie mit standardisiertem Protokoll zeigt, dass sich im IVKT mit 4-CmC die Ergebnisse der MH-S-Gruppe signifikant von MH-N- und MH-E-Kollektiven unterscheiden [7]. Es wurde daher vorgeschlagen, Kontrakturen > 2mN bei Schwellenwert-Konzentrationen von < 75 µM 4-CmC als MH-S und bei Konzentrationen >100 µM 4-CmC als MH-N zu diagnostizieren [7]. Der IVKT mit 4-CmC scheint geeignet zu sein, den Anteil von MH-E Diagnosen, der im Standard IVKT zwischen 10 und 15% liegt, weiter zu reduzieren [7, 90]. Weitere Vorteile sind die hohe Spezifität für den Ryanodin-Rezeptor und das Fehlen weiterer Effekte auf die Muskelzelle [7]. Die EMHG empfiehlt inzwischen die Nutzung des IVKT mit 4-CmC als optionalen Test in der MH-Diagnostik. Der IVKT mit den etablierten Testsubstanzen Halothan und Koffein kann jedoch nicht durch 4-CmC ersetzt werden.

Die bislang etablierten IVKTs mit Halothan und Koffein und den additiven Testsubstanzen 4-CmC und Ryanodin sind hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität und der Vergleichbarkeit von Testergebnissen verschiedener Labors als nicht ideal anzusehen. Es besteht daher weiterhin Bedarf, die gegebenen Tests zu verfeinern, beziehungsweise durch neue, geeignetere, Testsubstanzen zu ergänzen.

Der Einfluß des Lokalanästhetikums Dibucain auf die Ca^{2+}-Homöostase der Skelettmuskelzelle ist vielfach nachgewiesen [3-5, 17, 21, 41, 64, 65, 73, 84, 87, 95, 107, 115, 127, 128]. Es bestand somit die Möglichkeit, dass die in vorliegender Untersuchung dargestellten in-vitro-Kontrakturverfahren mit dem Lokalanästhetikum Dibucain als Ansatz dienen könnten, durch Einführung dieses Medikamentes in die MH-Routinediagnostik die Patientensicherheit zu verbessern.

Es wurden in-vitro Kontrakturtests an porcinen Skelettmuskelpräparaten von 8 MH-N und 8 MH-S Schweinen, mit kumulativer Zufuhr von Dibucain zu den Organbädern durchgeführt (Abbildung 16). In der MH-S- kam es im Vergleich zur MH-N-Gruppe bereits bei niedrigeren Dibucain-Badkonzentrationen zu einer Kontrakturentwicklung. Die MH-S-Muskelpräparate zeigten bereits bei der niedrigsten Dibucain-Konzentration von 0,1 mmol/l eine leichte Kontrakturentwicklung von 0,5 mN (0,2-0,8 mN). Die Kontrakturzunahme war bei MH-S zwischen 0,2 mmol/l Dibucain mit 1,2 mN (0,0-28,2 mN) und 0,4 mmol/l Dibucain mit 7,6 mN (0,6-32,8 mN) am ausgeprägtesten und nahm dann bis Untersuchungsende bei einer Dibucain-Badkonzentration von 1,0 mmol/l kontinuierlich auf das Niveau von 10,9 mN (5,5-37,0 mN) zu. In der MH-N-Gruppe war erst ab einer Dibucain-Konzentration von 0,4 mmol/l eine leichte Kontrakturentwicklung von 0,1 mN (0,0-2,2 mN) zu verzeichnen, welche dann bis Untersuchungsende auf Werte von 5,1 mN (2,8-9,4 mN) anstieg. Bei Vergleich der beiden Gruppen war die Kontrakturentwicklung in der MH-S-Gruppen zu jedem Messzeitpunkt signifikant stärker ausgeprägt als in der MH-N-Gruppe. Bis auf eine Dibucain-Badkonzentration von 0,1 mmol/l kam es jedoch zu jedem Messzeitpunkt (0,2; 0,4; 0,6 und 1,0 mmol/l Dibucain) zu einer deutlichen Überlappung von Einzelwerten der beiden diagnostischen Gruppen.

Die kumulative Zufuhr von Dibucain führte in allen Muskelpräparaten zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf den Wirkmechanismus von Lokalanästhetika zurückzuführen. Bei steigenden LA-Konzentrationen werden zunehmend Natrium-Kanäle blockiert, somit stehen bei Stimulierung zunehmend weniger potentiell kontraktile Myozyten zu Verfügung. Daraus resultierend müsste die gemessene Muskelkontraktionskraft abnehmen. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich die Muskelkontraktionskraft in der MH-N- verglichen mit der MH-S-Gruppe im Untersuchungsintervall von 0,0 bis 0,4 mmol/l Dibucain als deutlich stärker. Die Ausgangswerte betrugen 69,0 mN (21,1-156,2 mN) in der MH-N- und 33,0 mN (10,0-109,9 mN) in der MH-S-Gruppe. Diese Werte zeigten sich bei einer Dibucain-Badkonzentration von 0,1 mmol/l Dibucain in der MH-N-Gruppe nahezu unverändert, in der MH-S-Gruppe kam es zu einem leichten Abfall auf 24,4 mN (9,4-109,4 mN). Im weiteren Verlauf fielen

die Werte bis zu einer Dibucain-Konzentration von 0,6 mmol/l deutlich auf 8,5 mN (2,8-17,2 mN) in der MH-N- und 2,6 mN (2,0-10,3 mN) in der MH-S-Gruppe ab. Nach der höchsten Dibucain-Konzentration von 1,0 mmol/l zu Untersuchungsende fanden sich keine Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen mehr.

Aus den vorliegenden IVKT-Untersuchungen mit Dibucain an porcinen Skelettmuskelpräparaten muß gefolgert werden, dass die MH-Diagnostik mit kumulativer Gabe von Dibucain in den Intervallen 0,2 – 0,4 – 0,6 – 1,0 mmol/l zwischen den diagnostischen Gruppen nicht möglich ist. Deutliche Überlappungen von Einzelwerten der diagnostischen Gruppen zu den genannten Messzeitpunkten lassen, trotz zum Teil signifikanter Unterschiede zwischen MH-N und MH-S, eine eindeutige MH-Diagnostik nicht zu. Einzig bei einer Dibucain-Badkonzentration von 0,1 mmol/l war eine Diskriminierung der Kontrakturentwicklung zwischen MH-N mit 0,0 mN (0,0-0,2 mN) und MH-S 0,5 mN (0,2-0,8 mN) gegeben.

Bei kritischer Würdigung dieses Befundes sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es bei der Durchführung des IVKT relativ leicht zur Messung von Artefakten kommen kann. Die Erschütterung der Organbäder während eines laufenden Versuches kann zu Schwingungen im Bereich des am Kraftaufnehmers aufgehängten Muskelpräparates führen. Diese Schwankungen werden als Veränderungen der Muskelgrundspannung registriert und führen zur Aufzeichnung von geringen Kontrakturen im Verlauf eines Versuches. Zusätzlich ist damit zu rechnen, daß bei Zugabe von Substanzen in die Organbäder kurzfristig Konzentrationsunterschiede im Organbad auftreten, die möglicherweise geringe Kontrakturentwicklungen direkt nach Zugabe bedingen. Durch die Festlegung eines Grenzwertes für die Kontrakturentwicklung von 2 mN werden diese versuchsbedingten Störungen zum größten Teil eliminiert. Dies führt dazu, dass beim Halothan-Koffein-IVKT ein Muskelpräparat eine Kontraktur von mindestens 2 mN erreichen muß, um die dabei zugeführte Substanzkonzentration als Schwellenwert festzulegen zu können [29, 90]. Es ist daher sicherlich auch sinnvoll, für einen IVKT mit Bolusgabe von Dibucain einen Grenzwert von 2 mN für die sich entwickelnde Kontraktur festzulegen. Dieses Kriterium wird bei der Bolusgabe von 0,1 mmol/l Dibucain, dem einzigen Messzeitpunkt mit Diskriminierung von MH-N und MH-S, nicht erfüllt. Zudem sollte berücksichtigt werden, dass der Unterschied zwischen MH-N und MH-S bei 0,1 mmol/l Dibucain sehr klein ausfällt. Desweiteren ist zu erwähnen, dass die Anzahl an Testungen mit jeweils 8 IVKTs für MH-N sowie MH-S ebenfalls sehr klein ausfällt. Die Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse auf den Menschen ist wegen den Unterschieden zwischen

porciner- und menschlicher-MH nur eingeschränkt möglich. Die Aussagekraft dieses Befundes sollte somit sehr kritisch bewertet werden.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass die Kontrakturentwicklung nach Applikation von 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 und 1,0 mmol/l Dibucain bei MH-S Skelettmuskelpräparaten ausgeprägter ist als bei MH-N Skelettmuskelpräparaten. Möglicherweise ließe sich eine wünschenswert deutlichere Diskriminierung zwischen den diagnostischen Gruppen, unter Berücksichtigung des Grenzwertes für die Kontrakturentwicklung von 2 mN, durch anders gewählte kumulative Dibucain-Dosierungsschemata oder durch Gabe von Bolus-Konzentrationen, erreichen. Dies zu untersuchen, könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Für andere Amid-LA, wie Lidocain und Bupivacain, deren Einfluß auf die Ca^{2+}-Homöostase der Skelettmuskelzelle nachgewiesen werden konnte, stehen in-vitro-Kontrakturtestungen am etablierten MH-S- und MH-N-Schweinemodell noch aus [56, 113]. Diese sollten im Interesse der Patientensicherheit Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, mit dem Ziel, durch Einführung neuer Testsubstanzen den etablierten IVKT mit Halothan und Koffein hinsichtlich Sensitivität und Spezifität weiter zu optimieren.

4.3. Schlussfolgerungen

1. Am etablierten Schweinemodell mit MH-suszeptiblen Schweinen und einer Kontrollgruppe wurde der Versuch der in-vivo-Triggerung der Malignen Hyperthermie mit dem Lokalanästhetikum und Natriumkanalblocker Dibucain unternommen. In-vivo ist Dibucain keine Triggersubstanz der Malignen Hyperthermie bei genetisch disponierten Schweinen. Die in vorliegender Untersuchung verwandten kumulativen Dibucain-Konzentrationen lagen um das 47-140fache über den therapeutisch beim Menschen empfohlenen Konzentrationen. Der therapeutische Einsatz von Dibucain beim Menschen scheint daher unbedenklich zu sein.

2. Es wurden in-vitro Kontrakturtests an porcinen Skelettmuskelpräparaten mit Zufuhr von Dibucain durchgeführt. Dibucain führte an den Skelettmuskelpräparaten dosisabhängig einerseits zu einer Kontrakturentwicklung, andererseits zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. In den in-vitro Tests war aufgrund der Überlappung von Einzelwerten bei Dibucain-Badkonzentrationen von 0,2 – 0,4 – 0,6 und 1,0 mmol/l, trotz signifikanter Unterschiede, keine eindeutige Diskriminierung zwischen den diagnostischen Gruppen möglich. Einzig eine Dibucain-Konzentration von 0,1 mmol/l ermöglichte die gewünschte Diskriminierung zuwischen MH-N und MH-S. Die Unterschiede zwischen den beiden diagnostischen Gruppen sind bei dieser Dibucain-Konzentration jedoch sehr gering. Zusätzlich wurde der in internationaler Übereinstimmung festgelegte Grenzwert von 2 mN für Kontrakturen nicht erreicht. Dibucain eignet sich unter den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsbedingungen somit nicht zur MH-Diagnostik. Die Kontrakturentwicklung zeigte sich jedoch über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg bei den MH-S-Skelettmuskelpräparaten ausgeprägter als bei den MH-N-Skelettmuskelpräparaten. Unter modifizierten Versuchsbedingungen, wie z. B. geänderte Dosierungsschemata bei der kumulativen Dibucain-Gabe, oder Dibucain als Bolus-Applikation, wäre möglicherweise eine eindeutige Differenzierung zwischen MH-S und MH-N realisierbar.

5. Zusammenfassung

Die maligne Hyperthermie ist eine potentiell lebensgefährliche, hereditäre, akute pharmakogenetische Erkrankung, der eine Dysregulation der intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase zugrunde liegt. Das Lokalanästhetikum Dibucain erhöht dosisabhängig die Ca^{2+}–Konzentration im menschlichen Skelettmuskel. Daher wurde gefolgert, dass Dibucain zum einen eine in-vitro-Diagnostik der MH ermöglichen, zu anderen in-vivo Triggersubstanz der MH sein könnte. In der vorliegenden Untersuchung wurden diese Vermutungen überprüft.

Der Versuch einer MH-Triggerung in-vivo wurde im etablierten Schweinemodell an je 7 MH-N- und MH-S-Schweinen durchgeführt. Bei allen Tieren wurden Parameter, die auf die Entwicklung einer MH hindeuten, überwacht. Dibucain führte weder bei MH-S- noch bei MH-N-Schweinen zu Entwicklung einer MH-Episode. Unterschiede zwischen den diagnostischen Gruppen im Sinne einer MH-Entwicklung wurden nicht beobachtet, alle Tiere verstarben nach Gabe der höchsten Dibucain-Dosis im Herz-Kreislauf-Versagen. In-vivo ist Dibucain folglich keine Triggersubstanz der MH bei disponierten Schweinen. Der therapeutische Einsatz von Dibucain bei MH-gefährdeten Patienten scheint daher unbedenklich zu sein.

Die in-vitro Kontrakturtests wurden an Skelettmuskelpräparaten von je 8 MH-S und MH-N Schweinen durchgeführt. Zusätzlich zur Standard-Diagnostik der MH wurden in-vitro Kontrakturtests mit kumulativer Zufuhr von Dibucain durchgeführt. Durch in-vitro Kontrakturtests mit kumulativer Applikation von 0,2 – 0,4 – 0,6 – 1,0 mmol/l Dibucain war, bedingt durch die Überlappung von Einzelwerten, keine klare Diskriminierung zwischen den diagnostischen Gruppen möglich. Einzig die Dibucain-Konzentration von 0,1 mmol/l erbrachte eine Diskriminierung zwischen MH-N und MH-S. Die Unterschiede zwischen den beiden diagnostischen Gruppen sind bei dieser Dibucain-Konzentration jedoch sehr gering. Dibucain eignet sich unter den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsbedingungen daher nicht zur MH-Diagnostik. Dibucain induzierte jedoch in allen Muskelproben eine Kontrakturentwicklung, die bei MH-S-Skelettmuskelpräparaten durchwegs ausgeprägter war als bei MH-N-Skelettmuskelpräparaten. Es besteht daher die Möglichkeit, dass eine klare Diskriminierung zwischen den diagnostischen Gruppen unter modifizierten Versuchsbedingungen – geänderte kumulative Dibucain-Dosierungsschemata oder Bolus-Applikation von Dibucain – zu erreichen wäre. Dieser Möglichkeiten sollte im Rahmen von Folgeuntersuchungen nachgegangen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. *ADEC: Australian Drug Evaluation Committee* (1996) Medicines in pregnancy – an australian categorisation of risk of drug use in pregnancy, 3rd edition, Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia

2. *Anetseder M, Pohl F, Klein P, Müller R, Hoyer A, Horbaschek H, Roggendorf W, Hartung E, Roewer N* (1999) Sind morphologische Veränderungen im Skelettmuskel von Patienten mit Maligner Hyperthermie diagnostisch verwertbar? Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 34: 626-633

3. *Anteneodo C, Louro SRW, Wajnberg E* (1996) Interaction of alkanols and local anesthetics with spin-labeled ca^{2+}-atp-ase of sarcoplasmatic reticulum vesicles. Biochim. Biophys. Acta 1281: 150-156

4. *Anteneodo C, Rodahl M, Meiering E, Heynen ML, Sennisterra GA, Lepock JR* (1994) Interaction of dibucaine with the transmembrane domain of the ca^{2+} atp-ase of sarcoplasmatic reticulum. Biochem. 33: 12283-12290

5. *Antoniu B, Kim D, Morii M, Ikemoto M* (1985) Inhibitors of ca^{2+} release from the isolated sarcoplasmatic reticulum. Biochim. Biophys. Acta 816: 9-17

6. *Barash G, Cullen F, Stoelting RK* (1988) Clinical anaesthesia. JB Lippincott Company Philadelphia: 459-473

7. *Baur CP, Bellon L, Felleiter P, Fiege M, Fricker R, Glahn K, Heffron JJA, Herrmann-Frank A, Jurkatt-Rott K, Klingler W, Lehane M, Ørding H, Tegazzin V, Wappler F, Georgieff M, Lehmann-Horn F* (2000) A multicenter study of 4-chloro-m-cresol for diagnosing malignant hyperthermia susceptibility. Anesth. Analg. 90: 200-205

8. *Bendixen D, Skovgaard LT, Ørding H* (1997) Analysis of anaesthesia in patients susceptible to malignant hyperthermia before diagnostic in-vitro test. Acta Anaesthesiol. Scand. 41: 480-484

9. *Berde CB, Strichartz GR* (2000) Local anesthetics. In: Miller RD (eds) Anaesthesia, 5th edition, Curchill Livingston New York, 491-521

10. *Berkowitz A, Rosenberg H* (1985) Femoral block with mepivacaine for muscle biopsy in malignant hyperthermia patients. Anesthesiol. 62: 651-652

11. *Berman MC, Harrison GG, Detroit P, Bull JE, Keuch JE* (1969) Halothane induced hyperpyrexia in landrace pigs. South African Med. J. 43: 545-546

12. *Berridge MJ* (1993) Inositol triphosphate and calcium signaling. Nature 361: 315-325

13. *Bittner E, Mader N, Shany S, Gilly H* (1997) A dominantly inherited subclinical myopathy with central-core-like-structures is frequently associated with mh-susceptibility. Anesth. Analg. 5: 14

14. *Britt A* (1982) Malignant hyperthermia: a review: In: Milton AS (eds): Pyretics and Antipyretics. Springer Berlin, Heidelberg, New York. Handbook of Experimantal Pharmacology, Vol. 9: 547-615

15. *Butterworth JF, Strichartz GR* (1990) Molecular mechanisms of local anaesthesia: a review. Anesthesiol. 72: 711-734

16. *Caron J, Libersa C* (1997) Adverse effects of class I antiarrhythmic drugs. Drug Safety 17: 8-36

17. *Carvalho AP* (1968) Calcium-binding properties of sarcoplasmatic reticulum as influenced by atp, caffeine, quinine, and local anesthetics. J. Gen. Physiol. 52: 622-642

18. *Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM* (1994) Structure and function of ryanodine receptors. Am. J. Physiol. 266: C1485-C1504

19. *Covino BG* (1986) Pharmacology of local anaesthetic agents. Br. J. Anaesth. 58: 701-716

20. *Daynan P* (1996) Deadly dibucaine. JAMA 276: 1292

21. *DeBoland AR, Jilka RL, Martonosi AN* (1975) Passive ca^{2+}-permeability of phospholipid vesicles and sarcoplasmic reticulum membranes. J. Biol. Chem. 250: 7501-7510

22. *Denborough MA* (1977) Malignant hyperpyrexia. Med. J. Aust. 2: 757-758

23. *Denborough MA* (1998) Malignant Hyperthermia. Lancet 352: 1131-1136

24. *Denborough MA, Lovell RRH* (1960) Anaesthetic deaths in a family. Lancet 2: 45

25. *Dershwitz M, Ryan JF, Guralnick W* (1989) Safety of amide local anesthetics in patients susceptible to malignant hyperthermia. JADA 118: 276-278

26. *Drugdex Drug Evaluations* (2000) Dibucaine. Medizinisches Informationssystem Vol. 105

27. *Eberlein HJ* (1979) Therapie der Malignen Hyperthermie. Vorläufige Mitteilung. Anästhesist 28: 247-248

28. *Ellis FR, Hamman DG, Keaney NP, Kyei-Mensah K* (1971) Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. Br. J. Anaesth. 43: 721-722

29. *European Malignant Hyperthermia Group* (1984) A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia susceptibility. Br. J. Anaesth. 56: 1267-1269

30. *Fill M, Stefani E, Nelson TE* (1991) Abnormal human sarcoplasmatic reticulum Ca^{2+}-release channels in hyperthermic sceletal muscle. Biophys. J. 59: 1058-1090

31. *Fisher A, Bryce-Smith R* (1971) Spinal analgesic agents. Anaesthesia 26: 324-329

32. *Fletcher JE, Rosenberg H, Lizzo FH* (1989) Effects of droperidol, haloperidol and ketamine on halothane, succinylcholine and caffeine contractures: implications for malignant hyperthermia. Acta Anaesthesiol. Scand. 33: 187-192

33. *Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K* (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford, 227-233

34. *Fortunato G, Berruti R, Brancadoro V, Fattore M, Salvatore F, Carsana A* (2000) Identification of a novel mutation in the ryanodine receptor gene (RYR1) in a malignant hyperthermia Italian family. Eur. J. Hum. Gen. 8: 149-152

35. *Foster PS, Gesini E, Denborough MA* (1993) Inositol 1,4,5,-triphosphate metabolism in red blood cells from individuals susceptible to malignant hyperpyrexia. Lancet 342: 986-987

36. *Fujii J, Otsu K, Zorzato F* (1993) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor/ ca^{2+}-release channel. J. Biol. Chem. 268: 13765-13768

37. *Gibbs JM* (1984) Unexplained hyperpyrexia during labour (Correspondence). Anaesth. Intens. Care 12: 375

38. *Gibson C, Tuttle JJ* (1900) Heat stroke as a post operative complication. JAMA 77: 883-884

39. *Gilman AG, Rall TW, Nies AS et al (eds)* (2000) Goodman and gilman`s. The pharmacological basis of therapeutics, 8^{th} edition, Pergamon Press, New York

40. *Gronert GA, Antognini JF, Pessah IN* (2000) Malignant hyperthermia. In: Miller RD (eds) Anaesthesia. 5^{th} edition, Churchill Livingston, New York, 1033-1052

41. *Gutierrez-Menino C, Molina A, Escudero B, Diez A, Laynez J* (1989) Interaction of the local anaesthetics dibucaine and tetracaine with sarcoplasmatic reticulum membranes. differential scanning calorimetry and fluorescence studies. Biochem. 28: 3398-3406

42. *Haan EA, Freemantle CJ, McCare JA, Friend KL, Mulley JC* (1990) Assignement of the gene for central core disease to chromosome 19. Genet. 86: 187-190

43. *Hall LW, Woolf N, Bradley JWP, Jolly DW* (1966) Unusual reaction to suxamethonium chloride. Br. Med. J. 2: 1305

44. *Hartung E, Anetseder M, Olthoff D, Deutrich C, Lehmann-Horn F, Baur C, Mortier W, Tzanova I, Doetsch S, Quasthoff S, Hofmann M, Schwefler B, Jantzen JP, Wappler F, Scholz J* (1998) Die regionale Verbreitung der Veranlagung zur Malignen Hyperthermie in Deutschland: Stand 1997. Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 33: 238-243

45. *Hartung E, Preis I, Engelhardt W, Krauspe R* (1991) Maligne-Hyperthermie-Diagnostik. Thrombozyten versus In-vitro-Kontraktionstest. Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 26: 471-474

46. *Hille B* (1977) Local anesthetics: hydropilic and hydrophobic pathways for the drug receptor reaction. J. Gen. Physiol. 69: 497-515

47. *Hondeghen LM, Katzung BG* (1977) Time and voltage dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. Biophys. Acta 472: 373-398

48. *Hopkins PM* (2000) Malignant hyperthermia: advance in clinical management and diagnosis. Br. J. Anaesth. 85: 118-128

49. *Hopkins PM, Ellis FR, Halsall PJ* (1993) Comparison of in-vitro contracture testing with ryanodine, halothane and caffeine in malignant hyperthermia and other neuromuscular disorders. Br. J. Anaesth. 70: 397-401

50. *Hopkins PM, Ellis FR, Halsall PJ* (1991) Ryanodine contracture: a pontentially specific in-vitro diagnostic test for malignant hyperthermia. Br. J. Anaesth. 66: 611-613

51. *Hopkins PM, Hartung E, Wappler, The European Malignant Hyperthermia Group* (1988) Multicentre evaluation of ryanodine contracture testing in malignant hyperthermia. Br. J. Anaesth. 80: 389-394

52. *Horio T* (1979) Photosensitivity reaction to dibucaine case report and experimental induction. Arch. Dermatol. 115: 986-987

53. *Howard JW* (1930) Spinal analgesia – a new method and a new drug – percaine. Br. J. Anaesth. 7: 99-113

54. *Illes DE, Lehmann-Horn F, Scherer SW, Tsui LC, Olde-Weghuis D, Suijkerbuyk RF, Heytens L* (1994) Localisation of the gene encoding the α_2/δ-subunit of the l-type voltage dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia susceptible families. Hzm. Mol. Genet. 3: 969-975

55. *Isaacs H, Badenhorst M* (1993) False negative results with muscle caffeine halothane contracture testing for malignant hyperthermia. Anesthesiol. 79: 5-9

56. *Isaacson A, Hinkes MJ, Taylor SR* (1970) Contracture and twitch potentation of fast and slow muscles of the rat at 20 and 37 °c. Am. J. Physiol. 218: 33-41

57. *Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F* (2000) Genetics and pathogenesis of malignant hypertherima. Muscle & Nerve 23: 4-17

58. *Kalow W, Britt BA, Terreau ME, Haist C* (1970) Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. Lancet 2: 895-898

59. *Katz JD, Krich LB* (1976) Acute febrile reaction complicating spinal anaesthesia in a survivor of malignant hyperthermia. Can. Anaesth. Soc. J. 23: 285-289

60. *Kaus SJ, Rockoff MA* (1994) Malignant hyperthermia. Ped. Clin. N. Am. 41: 221-237

61. *Klimanek J, Majewski W, Walencik K* (1976) A case of mh during epidural analgesia. Anaesth. Resusc. Intensive Ther. 4: 143-145

62. *Klip A, Mills GB, Britt BA, Elliott ME* (1990) Halothane-dependent release of intracellular ca^{2+} in blood cells in malignant hyperthermia. Am. J. Physiol. 258: C495-C503

63. *Krivosic-Herber R, Adnet P, Krivosic J* (1995) Problems in malignant hyperthermia epidemiology. Proceedings of the Annual Meeting of the European MH-Group: 8-15

64. *Kurebayashi N, Ogawa Y, Harafuji H* (1982) Effects of local anesthetics in calcium activated atp-ase and its partial reaction with fragmented sarcoplasmic reticulum from bulldog and rabbit skeletal muscle. J. Biochem. Tokyo 92: 915-920

65. *Kwon YW, Triggle DJ* (1991) Interactions of local anesthetics with neuronal 1,4-dihydropyridine binding sites. Biochem. Pharmacol. 42: 213-216

66. *Larach MG* (1989) Standarization of the caffeine halothane muscle contracture test. Anesth. Analg. 69: 511-515

67. *Larach MG, Localio AR, Allen GC, Denborough MA, Ellis FR, Gronert GA, Kaplan RF, Muldoon SM, Nelson TE, Ørding H, Rosenberg H, Waud BE, Wedel DJ* (1994) A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. Anesthesiol. 80: 771-779

68. *Levitt RC, Olckers A, Meyers S, Levitt MK, Rosenberg H, Fletcher JE, Isaacs H, Meyers DA* (1992) Evidence for a malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 17q. Genomics 14: 562-566

69. *Lynch C* (1986) Depression of myocardial contractility in vitro by bupivacaine, etidocaine and lidocaine. Anesth. Analg. 65: 551-559

70. *MacLennan DH, Phillips MS* (1992) Malignant hyperthermia. Science 256: 789-794

71. *Madson L, Raab CR, Kahl SD* (1987) Identification and characterization of the high affinity [h] ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmatic reticulum ca^{2+} release channel. J. Biol. Chem. 262: 6460-6463

72. *Martens U, Krause T, Scholz J, Wappler F, Steinrücke K, Schulte am Esch J* (2000) Inositol 1,4,5-trisphosphate synthesis in mononuclear white blood cells of malignant hyperthermia susceptible and normal human beings, following in-vitro exposure to halothane, caffeine and ryanodine. Eur. J. Anaesth. 17: 364-372

73. *Martonosi A, DeBoland AR, Vanderkoi JM, Halpin RA* (1974) The mechanism of calcium transport and the permeability of sarcoplasmatic reticulum membranes. In: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, Vol. 4, University Park Press Baltimore 473-494

74. *Matthews GG* (1991) Cellular physiology of nerve and muscle, Blackwell Scientific, 2nd edition, Boston

75. *Mauritz W, Sporn P, Steinbreitner K* (1986) Maligne Hyperthermie in Österreich. Epidemiologie und Klinik. Anästhesist 5: 639-650

76. *McCarthy TV, Healy JMS, Lehane M, Heffron JJA, Deufel T, Lehmann-Horn F, Furral M, Johnson K* (1990) Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q11.2-13.2. Nature 343: 562-563

77. *Mezin P, Payen JF, Bosson JL, Brambilla E, Stieglitz P* (1997) Histological support for the difference between malignant hyperthermia susceptible (mhs), equivocal (mhe) and negative (mhn) muscle biopsies. Br. J. Anaesth. 79: 327-331

78. *MHAUS* (1985) Professional advisory council adopts new policy statement on local anesthetics. MHAUS Communicator, Vol. 3, No. 4

79. *Mickelson JR, Louis CF* (1996) Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling ca^{2+} release channel and all ca^{2+} regulation defects. Physiol. Rev. 76: 537-592

80. *Minasiom A, Yagiela JA* (1988) The use of amide local anesthetics in patients susceptible to malignant hyperthermia. Oral surg. oral med. oral path. 66: 405-415

81. *Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J* (1997) Malignant hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha-1-subunit of the human dihydropyridine sensitive l-type voltage dependent calcium channel receptor in sceletal muscle. Am. J. Hum. Genet. 60: 1316-1325

82. *Moore DC* (1986) Ester or amide local anaesthetics in malignant hyperthermia – who knows? Anesthesiol. 64: 294-296

83. *Moschcowitz A* (1916) Postoperative heat stroke. Surg. Gynecol. Obstet. 23: 443-451

84. *Nash-Adler P, Louis CF, Fudyma G, Katz AM* (1979) The modification of unidirectional calcium fluxes by dibucaine in sarcoplasmatic reticulum vesicles from rabbit fast skleletal muscle. Mol. Pharmacol. 17: 61-65

85. *Nelson TE* (1983) Abnormality in calcium release from sceletal sarcoplasmatic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia. J. Clin. Invest. 72: 862-870

86. *Novotny I, Bianchi CP* (1967) The effect of xylocaine on oxygen consumption in the frog sartorius. J. Pharmacol. Exp. Ther. 155: 456-462

87. *Ohnishi ST* (1979) Calcium induced calcium release from fragmented sarcoplasmic reticulum. J. Biochem. 86: 1147-1150

88. *Ørding H* (1985) Incidence of malignant hyperthermia in Denmark. Anesth. Analg. 64: 700-704

89. *Ørding H* (1996) Investigation of malignant hyperthermia susceptibility in Denmark. Dan. Med. Bull. 43: 111-125

90. *Ørding H, Brancadoro V, Cozzolino S, Ellis FR, Glauber V, Gonano EF, Halsall PJ, Hartung E, Heffron JJ, Heytens L, Kozak-Ribbens G, Kress H, Krivosic-Horber R, Lehmann-Horn F, Mortier W, Nivoche Y, Ranklev-Twetman E, Sigurdsson S, Snoeck M, Stieglitz P, Tegazzin V, Urwyler A, Wappler F* (1997) In vitro contracture test for diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European mh Group: results of testing patients surviving fulminant mh and unrelated low-risk subjects. Acta Anaesthesiol. Scand. 41: 955-966

91. *Ørding H, Glahn K, Gardi T, Fagerlind T, Bendixen D* (1997) 4-chloro-m-cresol test is a possible supplementary test for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. Acta Anaesthesiol. Scand. 41: 967-972

92. *Ørding H, Islander G, Bendixen D, Ranklev-Turetman E* (2000) Between center variability of results of the in-vitro contracture test for malignant hyperthermia susceptibility. Anesth. Analg. 91: 452-457

93. *Otsu K, Phillips MS, Khanna VK, De Lean S, MacLennan DH* (1992) Refinement of diagnostic assays for a probable causal mutation for porcine and human malignant hyperthermia. Genomics 13: 835-837

94. *Paaschke RT, Brownell AKW* (1986) Amide local anaesthetics and malignant hyperthermia. Can. Anaesth. Soc. J. 33: 126-129

95. *Palade P* (1987) Drug induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 262: 6142-6148

96. *Parness J, Palnitkar SS* (1995) Identification of dantrolene binding sites in porcine skeletal muscle sarcoplasmatic reticulum. J. Biol. Chem. 270: 18465-18472

97. *Peerschke EIB* (1986) Platelet membrane alterations induced by the local anesthetic dibucaine. Blood 68: 463-471

98. *Pessah IN* (1996) Complex pharmacology of malignant hyperthermia. Anesthesiol. 84: 1275-1279

99. *Reiz S, Nath S* (1986) Cardiotoxicity of local anaesthetic agents. Br. J. Anaesth. 58: 736-745

100. *Rocco AG, Francis DM, Wark JA, Concepcion MA, Covino BG* (1982) A clinical double-blind study of dibucaine and tetracaine in spinal anesthesia. Anesth. Analg. 61: 133-137

101. *Roewer N* (1991) Maligne Hyperthermie heute. Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 26: 431-449

102. *Roman DA, Adriani J* (1949) Nupercaine-glucose for spinal anesthesia: results of over 5000 clinical administrations. Anesthesiol. 10: 270-279

103. *Rosenberg H, Antognini JF, Muldoon S* (2002) Testing for malignant hyperthermia. Anesthesiol. 96: 232-237

104. *Rubin SA, Zablocki AD* (1987) Hypercalemia, verapamil and dantrolene. Anesthesiol. 66: 246-249

105. *Rüffert H, Olthoff D, Deutrich C, Thomm B, Froster U* (2000) In-vitro Kontrakturtest und Gentypisierung in der Maligne-Hyperthermie-Diagnostik. Anästhesist 49: 113-120

106. *Scholz J, Troll U, Schulte am Esch J, Hartung E, Patten M, Sandig P, Schmitz W* (1991) Inositol-1,4,5-triphosphate and malignant hyperthermia. Lancet 337: 1361

107. *Shoshan-Barmatz V, Zchut S* (1993) The interaction of local anaesthetics with the ryanodine receptor of the sarcoplasmatic reticulum. J. Membrane Biol. 133: 171-181

108. *Silverton RJ* (1934) Spinal analgesia: the percaine – ephedrine technique. Aust. NZ. J. Surg. 3: 223-234

109. *Smith A, Dubinski G* (1996) Allergen explanation dibucaine hydrochloride. Environ. Dermatol. 3 : 380-391

110. *Steinfath M, Scholz J, Singh S, Wappler F* (1996) Welche Bedeutung haben Genotypveränderungen in der Diagnostik der Malignen Hyperthermie? Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 31: 334-343

111. *Steinfath M, Singh S, Scholz J, Becker K, Lenzen C, Wappler F, Köchling A, Roewer N, Schulte am Esch J* (1995) C1840-t mutation in the human skeletal muscle ryanodine receptor gene: frequency in northern german families susceptible to malignant hyperthermia and the relationship to in-vitro contracture response. J. Mol. Med. 73: 35-40

112. *Steinfath M, Wappler F, Scholz J* (2002) Maligne Hyperthermie. Allgemeine, klinische und experimentelle Aspekte. Anästhesist 51: 328-347

113. *Strobel GE, Bianchi CP* (1971) An in-vitro model of anesthetic hypertonic hyperpyrexia, hothane-caffeine-induced muscle contractures: prevention of contractures by procainamide. Anesthesiol. 35: 465-473

114. *Sudbrak R, Procaccio V, Klausnitzer M, Curran JC, Monsieurs SK, Van Broeckhoven C, Ellis R, Heytens L, Hartung EJ, Kozuk-Ribbers G, Heilinger D, Weissenbach J, Lehmann-Horn F, Mueller CR, Deufel D, Stewart AD, Lunardi J* (1995) Mapping of a further malignant hyperthermia susceptibility locus to chromosome 3q13.1. Am. J. Hum. Genet. 56: 684-691

115. *Suko J, Winkler F, Scharinger B. Hellmann G* (1976) Aspects of the mechanism of action of local anesthetics on the sarcoplasmatic reticulum of sceletal muscle. Biochim. Biophys. Acta 443: 571-586

116. *Tanz R, Heskett T, Loehning W et al.* (1984) Comparative cardiotoxicity of bupivacaine and lidocaine in the isolated mammalian heart. Anesth. Analg. 63: 549-555

117. *Tatsukawa H, Okuda J, Kondoh M, Inoue M, Terashima S, Katoh S, Ida K* (1992) Malignant hyperthermia caused by intravenous lidocaine for ventricular arrhythmia. Int. Med. Tokyo 31: 1069-1072

118. *Urrita J, Jauregui J, Gamboa P* (1998) Photodermatitis from dibucaine. Cont. Derm. 39: 139-140

119. *Urwyler A, Hartung E* (1994) Die Maligne Hyperthermie. Anästhesist 43: 557-569

120. *von Richthofen V, Wappler F, Hagel C, Fiege M, Laas R, Scholz J, Schulte am Esch J* (1998) Histology of skeletal muscle from malignant hyperthermia susceptible patients – new aspects? Anesthesiol. 89: A981

121. *von Richthofen V, Wappler F, Scholz J, Fiege M, Schulte am Esch J* (1998) Evaluierung von Maligne-Hyperthermie-Episoden mit der Clinical Grading Scale. Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 33: 244-249

122. *Wagman I, DeJong R, Prince D* (1967) Effects of lidocaine on the central nervous system. Anesthesiol. 28: 155

123. *Wappler F, Roewer N, Köchling A, Scholz J, Steinfath M, Schulte am Esch J* (1996) In-vitro diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility with ryanodine-induced contractures in human sceletal muscles. Anesth. Analg. 82: 1230-1236

124. *Wappler F, Scholz J, Fiege M, Kolodzie K, Kudlik C, Weisshorn R, Schulte am Esch* J (1999) 4-chloro-m-cresol is a trigger of malignant hyperthermia in susceptible swine. Anesthesiol. 90: 1733-1740

125. *Wappler F, Scholz J, von Richthofen V, Fiege M, Steinfath M, Schulte am Esch J* (1997) 4-Chloro-m-Cresol induziert Kontrakturen in Skelettmuskelpräparaten von Patienten mit Disposition zu Maligner Hyperthermie. Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 32: 541-548

126. *Wedel DJ, Nelson TE* (1994) Malignant hyperthermia - diagnostic dilemma: false-negative contracture responses with halothane and caffeine alone. Anesth. Analg. 78: 787-792

127. *Wolosker H, Pacheco AGF, de Meis L* (1992) Local anesthetics induce fast ca^{2+}-efflux through a nonenergized state of the sarcoplasmic reticulum ca^{2+}-atp-ase. J. Biolog. Chem. 267: 5785-5789

128. *Yagi S, Endo M* (1980) Effects of dibucaine on skinned skeletal muscle fibers. an example of multiple actions of a drug on a single subcellular structure. Biomed. Res. 1: 269-272

129. *Yamashita M, Honda K, Iha H, Kondo S, Matsuki A, Oyama T* (1982) A case of acute hyperpyrexia with violent shivering immediately after operation under epidural anaesthesia supplemented by nitrous oxide. Can. Anaesth. Soc. J. 29: 632-635

130. *Zbinden AM, Frei FJ, Funk B, Thomson DA, Westenskow D* (1985) Determination of the partial pressure of halothane (or isoflurane) in blood. Br. J. Anaesth. 57: 796-802

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn **Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schulte am Esch** für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und Motivation zur Fertigstellung der Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. F. Wappler** für die freundliche Überlassung des Themas, die Vermittlung der MH-Grundlagen, die Planung der Versuche, die motivierende Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und die dauernde Diskussionsbereitschaft sowie die stets sehr freundliche Zusammenarbeit.

Herrn **PD Dr. M. Fiege** für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen, die dauernde Diskussionsbereitschaft und die sehr freundliche Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern der MH-Sprechstunde, Ärzten sowie medizinisch-technischem Personal für stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn **Dr. J. Dimigen** für seine Hilfestellung bei der Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen.

Den Mitarbeitern der Ärztlichen Zentralbibliothek (ÄZB) des UKE für die stets freundliche und geduldige Hilfestellung bei der Literaturrecherche.

Meinen Eltern und meinen Freunden für Zuspruch, Motivation und Geduld. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

8. Lebenslauf

23.12.1974	geboren in Freising
	ledig
Eltern	Dr. rer. nat. Günther Joseph Weiß, Chemiker
	Marlis Maria Weiß, geborene Hansjürgens, Hausfrau
Geschwister	Maximilian Weiß, Pilot
1981-1984	Stern-Grundschule Freising
1984-1985	Gerhardinger Grundschule Pfaffenhofen/Ilm
1985-1994	Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen/Ilm
01.07.1994	Abitur
01.09.94 – 30.11.95	Zivildienst bei der Caritas-Sozialstation Pfaffenhofen/Ilm
01.12.95 – 30.07.96	freiwilliges Pflegepraktikum auf einer Internistischen Station der Ilmtal-Klinik Pfaffenhofen/Ilm
01.10.96 – 25.06.03	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
25.06.03	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.10.03 – 30.03.04	Arzt im Praktikum in der Klinik für Kardiologie der Herzzentrum Leipzig GmbH der Universität Leipzig
ab 01.04.04	Arzt im Praktikum in der Klinik für Herzchirurgie der Herzzentrum Leipzig GmbH der Universität Leipzig

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt habe, oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....