

Klinik für Anaesthesiologie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ. - Prof. Dr. E. Kochs)

**Effekte von Immobilisation und Inflammation auf die  
Azetylcholinrezeptor-Expression und die  
Pharmakodynamik von Succinylcholin im Rattenmodell**

Marc Helming

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. Blobner  
2. Univ. - Prof. Dr. A. R. Ludwig

Die Dissertation wurde am 19.09.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2005 angenommen.

*„Was Du siehst wirst Du vergessen. Was Du hörst wirst Du vergessen.*

*Aber was Du tust wirst Du niemals vergessen.“*

Mr. Mponda Banda, St.-Anne's Hospital, Nkhotakota, Malawi  
(Übersetzung aus dem Englischen)

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Neuromuskuläre Übertragung.....	6
1.2. Der Azetylcholinrezeptor.....	6
1.3. Der nikotinische Azetylcholinrezeptor des Skelettmuskels.....	7
1.4. Muskelrelaxanzien.....	10
1.4.1. Nicht-depolarisierende Muskelrelaxanzien.....	10
1.4.2. Depolarisierende Muskelrelaxanzien.....	11
1.5. Pharmakologische Variablen von Muskelrelaxanzien.....	13
1.6. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Muskelrelaxanzien.....	13
1.7. Überempfindlichkeiten gegenüber depolarisierenden Muskelrelaxanzien.....	14
2. Zielsetzung der Arbeit.....	15
3. Versuchstiere und Methoden.....	16
3.1. Versuchstiere.....	16
3.2. Tiermodell.....	16
3.2.1. Inflammationsmodell.....	16
3.2.2. Immobilisationsmodell.....	17
3.3. Studienprotokoll.....	18
3.4. Anästhesie zum Versuch.....	19
3.5. Instrumentierung.....	20
3.6. Monitoring.....	21
3.7. Versuchsablauf.....	22
3.8. Laborchemische Analysen.....	24
3.8.1. Met-Hämoglobin.....	24
3.8.2. $\alpha_1$ -saures Glykoprotein.....	24
3.8.3. Plasmacholinesterase.....	24
3.9. Azetylcholinrezeptor Assay.....	25
3.10. Statistik.....	27

4.	Ergebnisse .....	28
4.1.	Inflamationsparameter .....	28
4.2.	Immobilisationsparameter.....	31
4.3.	Modellstabilität .....	31
4.4.	Succinylcholin-Pharmakodynamik und Azetylcholinrezeptor-Expression .....	32
5.	Diskussion.....	37
6.	Zusammenfassung .....	42
7.	Bibliographie .....	44
8.	Danksagung .....	47
9.	Lebenslauf.....	48

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_1$ -AGP	$\alpha_1$ -saures Glykoprotein
$\alpha$ BTX	$\alpha$ -Bungarotoxin
ANOVA	Varianzanalyse
cpm	counts pro Minute
C.p.	Corynebakterium parvum
EKG	Elektrokardiogramm
ED	Effektivitätsdosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FiO <sub>2</sub>	inspiratorischer Sauerstoffanteil
Hz	Hertz
Immo	Immobilisationsgruppe
kDa	Kilodalton
Met-Hb	Methämoglobin
M. / Mm.	Muskulus / Muskuli
MW	Molekulargewicht
N	Newton
NaCl	0,9 % Kochsalzlösung
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PChE	Plasma-Cholinesterase
Sham	Schein-Immobilisationsgruppe
SIRS	systemische Inflammationsreaktion
T <sub>0</sub>	Ausgangs-Kontraktionsamplitude zum Zeitpunkt T <sub>0</sub>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Neuromuskuläre Übertragung**

Eine motorische Einheit wird gebildet aus einem motorischen Nerven und dem von ihm innervierten Kollektiv an Muskelfasern. Die Schnittstelle dieser zwei unterschiedlichen anatomischen Strukturen ist die neuromuskuläre Synapse. Um Signale des Nerven auf den Muskel zu übertragen, bedarf es Botenstoffe (Transmitter); im Falle der neuromuskulären Endplatte ist dies das Azetylcholin. Wenn ein Aktionspotential des Axons das präterminale Nervenende erreicht, fusionieren Azetylcholin enthaltende Vesikel mit der präsynaptischen Axonmembran und entleeren Azetylcholin exozytotisch in den neuromuskulären Spalt. Azetylcholin diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an postsynaptische Azetylcholinrezeptoren der Muskeloberfläche. Diese Bindung des Azetylcholins an seinen Rezeptor bewirkt eine Ionenverschiebung mit einer Erhöhung des Endplattenpotentials von  $-70$  mV (Ruhepotential) auf über  $-50$  mV. Dies aktiviert die spannungsabhängigen Natriumkanäle der angrenzenden Muskelfibrillen, welche ihrerseits ein Muskelfibrillenpotential auslösen. Durch eine nachfolgende Kaskade an zellulären Prozessen kommt es schlussendlich zu einer Kontraktion des Muskels (Martyn, 1992, S. 824).

## **1.2. Der Azetylcholinrezeptor**

Die Familie der Azetylcholinrezeptoren umfasst muskarinische und nikotinische Subtypen. Muskarinische Azetylcholinrezeptoren gehören der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an. Bisher konnten insgesamt 5 verschiedene muskarinische Azetylcholinrezeptor Subtypen kloniert und charakterisiert werden (M1 - M5) (Bonner, 1987, S. 527). Alle muskarinischen Azetylcholinrezeptoren weisen unterschiedliche

pharmakologische und funktionelle Eigenschaften auf. So sind beispielsweise im zentralen Nervensystem muskarinische Rezeptoren in einer Vielzahl vegetativer, sensorischer und motorischer Prozesse involviert (Peralta, 1987, S. 3923).

Nikotinische Azetylcholinrezeptoren spielen eine Hauptrolle bei der schnellen synaptischen Transmission, sowohl in den neuro-neuronalen als auch in den neuromuskulären Synapsen. Neuronale nikotinische Azetylcholinrezeptoren sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten in einer zwei zu drei Stoichiometrie ( $\alpha_{2n}\beta_n$ ) aufgebaut. Es gibt mindestens sieben verschiedene neuronale  $\alpha$ - Untereinheiten ( $\alpha_2$  -  $\alpha_8$ ) und drei neuronale  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_2$  -  $\beta_4$ ), die im zentralen und peripheren Nervensystem unterschiedlich exprimiert werden. Muskuläre nikotinische Azetylcholinrezeptoren sind Pentamere homologer Untereinheiten, die ringförmig um einen zentralen Ionenkanal angeordnet sind. Die Untereinheiten sind Produkte verschiedener Gene und weisen Homologien zwischen 37% und 57% auf, was vermuten lässt, dass sie aus einem einzelnen Vorläufergen entstanden sind (Utkin Yu, 2000, S. 146).

### **1.3. Der nikotinische Azetylcholinrezeptor des Skelettmuskels**

Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschliesslich mit der Expression des nikotinischen Azetylcholinrezeptors der Skelettmuskulatur, welcher im Folgenden etwas näher beschrieben wird. Der nikotinische Azetylcholinrezeptor der Muskeloberfläche ist ein pentamerisches Glykoprotein bestehend aus zwei  $\alpha$ -, und je einer  $\beta$ - und  $\delta$ - Untereinheit sowie entweder einer  $\gamma$ - oder einer  $\varepsilon$ -Untereinheit. Die Untereinheiten der Rezeptoren haben Molekülmassen zwischen 45 und 60 kDa, was ein Molekulargewicht von etwa 295 kDa für den Azetylcholinrezeptor-Komplex ergibt. Diese fünf Untereinheiten bilden einen transmembranösen Rezeptor. Nach Bindung von zwei Molekülen Azetylcholin an die beiden  $\alpha$ -Untereinheiten öffnet der Rezeptorkanal seine Pore und ermöglicht so eine

Ionenverschiebung zwischen intra- und extrazellulär. Hauptsächlich werden dabei Natriumionen von extra- nach intrazellulär verschoben. Kaliumionen fließen entlang ihres Konzentrationsgradienten in die entgegengesetzte Richtung. Die elektrische Ladung des Azetylcholinrezeptorkanals ermöglicht einen Fluss von Kationen und neutralen Molekülen. Eine Verschiebung von Anionen, wie z.B. Chlorid ist nicht möglich. Bereits eine Öffnung von ca. 10% der Azetylcholinrezeptoren an einer motorischen Endplatte generieren einen Ionenfluss der ausreicht ein Muskelaktionspotential auszulösen. Die Pore des Azetylcholinrezeptors schließt sich wieder, wenn sich mindestens ein Molekül Azetylcholin vom Rezeptor löst. Das Azetylcholin wird im synaptischen Spalt durch die Azetylcholinesterase gespalten. Die Spaltprodukte Azetyl und Cholin werden wieder in das präterminale Axon aufgenommen und stehen zur Neusynthese von Azetylcholin wieder zur Verfügung. In einem gesunden, innervierten Muskel sind die Azetylcholinrezeptoren streng auf die neuromuskuläre Endplatte begrenzt. Kommt es jedoch zu einem Stopp an neuralen Einflüssen oder Aktivitäten, wie nach einer Denervierung, langandauernder Immobilisation oder Verbrennungsverletzungen, exprimiert der Muskel Rezeptoren, in denen die  $\epsilon$ -Untereinheit durch ein  $\gamma$ -Untereinheit ersetzt worden ist. Diese Rezeptorkonfiguration entspricht derjenigen eines Fetus, bei dem sich noch keine neuromuskulären Synapsen gebildet haben. Sie wird daher auch fetaler, oder unreifer Azetylcholinrezeptor genannt. Ein Charakteristikum dieser unreifen Azetylcholinrezeptoren ist, dass sie sich in ihrer Lokalisation nicht mehr auf die neuromuskuläre Endplatte beschränken, sondern über den gesamten Muskel hinweg exprimiert werden. Der Austausch der Untereinheiten hat aber auch metabolische und physiologische Konsequenzen. Reife Rezeptoren (Halbwertszeit ca. 2 Wochen) überleben deutlich länger als unreife (Halbwertszeit ca. 24 Stunden). Fetale Rezeptoren haben zwar eine geringere Einzelkanalleitfähigkeit, aber eine 2- bis 10-fach



erhöhte mittlere Öffnungszeit, was in der Summe zu einer Erhöhung des Ionenflusses führt. Vor allem der vermehrte Kaliumausstrom aus der Zelle in den Extrazellulärraum hat weitreichende klinische Konsequenzen. So gibt es mehrfach Berichte über Patienten, welche nach Immobilisation, Verbrennung, Denervierung oder Sepsis und systemischer Inflammationsreaktion (SIRS) durch die Gabe des Azetylcholinrezeptoragonisten Succinylcholin lebensgefährliche Hyperkaliämien entwickelt haben (Gronert, 1999, S. 320, Kohlschütter, 1976, S. 557, Tobey, 1970, S. 359). Die Auswirkungen von Inflammation und Infektion auf die Azetylcholinrezeptoren werden kontrovers diskutiert. In einem Endotoxinmodell in der Maus konnten Tomera und Martyn 2 Wochen nach wiederholter intraperitonealer Injektion von Lipopolysaccharid eine 3–5-fache Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve des nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans d-Tubocurarin beobachten (Tomera, 1989, S. 218). Als wahrscheinlichste Ursache wurde in dieser Arbeit eine Erhöhung der Azetylcholinrezeptoren genannt, ohne dies jedoch näher zu untersuchen. Es gibt jedoch in der Tat Hinweise, dass bei Intensivpatienten die Anzahl der Azetylcholinrezeptoren erhöht ist. Dodson konnte in postmortalen Muskelbiopsien eine erhöhte Anzahl von Azetylcholinrezeptoren direkt nachweisen (Dodson, 1995, S. 818). In einem Fallbericht wurde eine Hyperkaliämie nach Gabe von Succinylcholin beschrieben, was indirekt für eine erhöhte Anzahl von Azetylcholinrezeptoren - und damit verbunden eine Erhöhung der Ionenströme – spricht (Kohlschütter, 1976, S. 557). Nachteil dieser Untersuchungen ist jedoch, dass alle Patienten zusätzlich auf Grund der lang andauernden Intensivtherapie immobilisiert waren oder zusätzliche Medikamente wie Muskelrelaxanzien oder Kortikosteroide erhalten hatten. So konnte der Einfluss der Krankheit von anderen Faktoren, welche ihrerseits sowohl die Kinetik und Dynamik von Muskelrelaxanzien als auch die Expression des Azetylcholinrezeptors verändern, nicht differenziert werden.

## **1.4. Muskelrelaxanzien**

Eine Lähmung der Muskulatur durch Muskelrelaxanzien wird hauptsächlich durch eine Blockade postsynaptischer Azetylcholinrezeptoren bewirkt. Ein ankommendes Nervenaktionspotential kann somit nicht mehr auf den Muskel übergeleitet werden. Neben der Blockade des Azetylcholinrezeptors durch Muskelrelaxanzien beeinflussen eine Vielzahl von Medikamenten die im Rahmen einer balancierten Anästhesie verwendet werden, wie z.B. alle volatilen Anästhetika, die neuromuskuläre Übertragung auf Rezeptorebene (Scheller, 1997, S. 121).

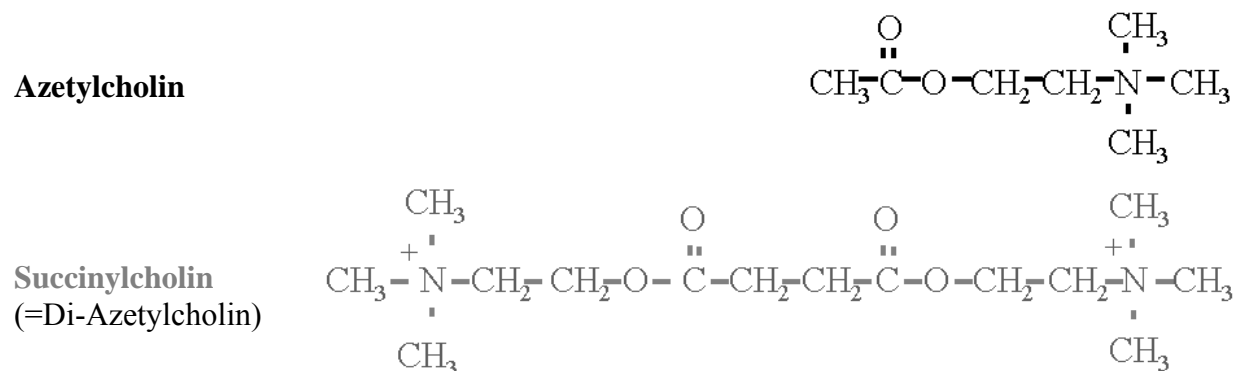
### **1.4.1. Nicht-depolarisierende Muskelrelaxanzien**

Nicht-depolarisierende Muskelrelaxanzien binden an den Azetylcholinrezeptor, jedoch nicht an der Bindungsstelle für Azetylcholin. Sie haben im Gegensatz zu Azetylcholin keine intrinsische Aktivität. Damit öffnen sie weder den Ionenkanal, noch depolarisieren sie die Endplatte. Sie wirken einzig durch die Verhinderung einer Bindung von Azetylcholin. Zwischen Azetylcholin und nicht-depolarisierenden Muskelrelaxanzien herrscht somit Konkurrenz um die Bindung an den Rezeptor. Die Wahrscheinlichkeit der Bindung von entweder Muskelrelaxans oder Azetylcholin hängt nur von der jeweiligen Konzentration der Liganden im neuromuskulären Spalt ab. Sobald das Muskelrelaxans aus dem neuromuskulären Spalt diffundiert, steigt die relative Konzentration und somit die Bindungswahrscheinlichkeit des Azetylcholins. Der Effekt des nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans lässt nach.

### 1.4.2. Depolarisierende Muskelrelaxanzien

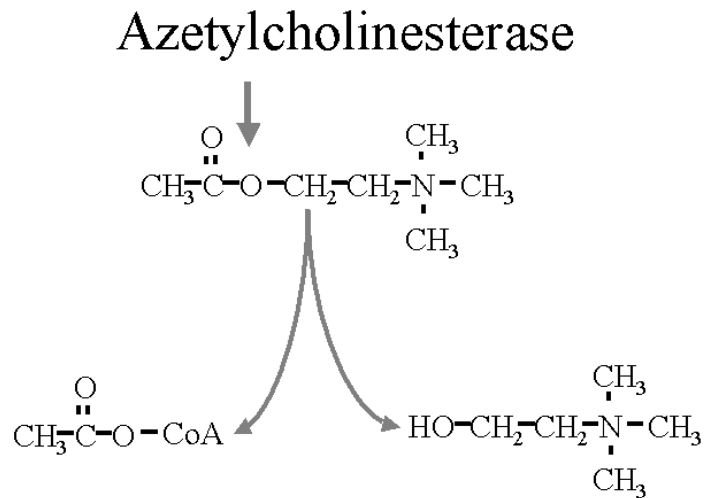
Das einzig klinisch gebräuchliche depolarisierende Muskelrelaxans ist Succinylcholin, das heutzutage vornehmlich für die schnelle Narkoseeinleitung bei Patienten mit erhöhter Aspirationsgefahr verwendet wird (Ileuseinleitung). Strukturell ist Succinylcholin die Verbindung von zwei Azetylcholinmolekülen (Abbildung 1).

**Abbildung 1:** Strukturformeln von Azetylcholin und Succinylcholin



Dies ermöglicht daher eine echte Bindung an den Azetylcholinrezeptor mit nachfolgender Öffnung des Ionenkanals. Succinylcholin kann jedoch nicht durch die Azetylcholinesterase gespalten werden, was somit zu einer Dauerdepolarisation des Rezeptors führt. Ein Verschluss des Rezeptorkanals erfolgt erst nach spontaner Ablösung des Succinylcholins vom Rezeptor. Bis zu seiner Diffusion aus dem synaptischen Spalt kann sich Succinylcholin mehrfach an den Azetylcholinrezeptor binden und die Bindungsstelle dem Azetylcholin unzugänglich machen. Nach Diffusion von Succinylcholin aus dem synaptischen Spalt wird es im Plasma durch die Plasma- (Pseudo-) cholinesterase temperaturabhängig in das unwirksame Succinylmonocholin und Cholin hydrolysiert (Abbildung 2).

Abbildung 2: **Abbauweg von Succinylcholin**



Wegen seines bislang einzigartigen Wirkprofils, der Kombination aus raschem Wirkungseintritt mit einer kurzen Wirkdauer und damit rasch wiedereintretender Spontanatmung, wird Succinylcholin trotz seiner teilweise gravierenden unerwünschten Wirkungen wie Hyperkaliämien mit konsekutivem Kreislaufstillstand auch heute noch sehr häufig verwendet. Solche Hyperkaliämien treten vor allem bei hochregulierten Azetylcholinrezeptoren auf. Die Gefahr der Succinylcholinanwendung bei Intensivpatienten wird auch von Intensivmedizinern häufig unterschätzt. So fanden Hughes et al. 1999 in einer Umfrage auf allen Intensivstationen des United Kingdom heraus, dass 68,7% der befragten Intensivmediziner Succinylcholin als mögliches Medikament zur Blitzintubation bei einem Patienten mit Verdacht auf Intensivpolyneuropathie angaben (Hughes, 1999, S. 636). Andere unerwünschte Wirkungen wie Anstieg des intrakraniellen und intraokulären Drucks sowie postoperative Myalgien lassen sich durch die depolarisierende Wirkung, Bradykardien und Arrhythmien durch die Wirkung an muskarinergen Azetylcholinrezeptoren erklären.

## 1.5. Pharmakologische Variablen von Muskelrelaxanzien

Die neuromuskuläre Wirkung eines Muskelrelaxans ist charakterisiert durch eine verminderte muskuläre Antwort auf einen neuralen Reiz. Abhängig vom jeweiligen Muskel unterscheiden sich Muskelrelaxanzien hinsichtlich Wirkungseintritt, maximalem Effekt und Dauer der neuromuskulären Blockade. Die übliche Methode, die klinische und damit pharmakologische Antwort auf ein Muskelrelaxans zu bestimmen, ist die Durchführung neuromuskulärer Funktionstests. Um sicherzustellen, dass alle Fasern eines Nerven durch die neuronale Reizung erfasst werden, gilt es vor Beginn einer jeder Testung die sog. supramaximale Stimulationshöhe zu bestimmen. Diese ist definiert als die Stromstärke, ab welcher - trotz einer weiteren Zunahme derselben - die Reizantwort des Muskels nicht weiter steigt. Die Reizantwort bei Abwesenheit eines neuromuskulären Blocks wird mit 100% definiert; d.h. 0% entspricht einer kompletten Paralyse. Die Wirkung eines Muskelrelaxans ist weiterhin durch folgende Parameter charakterisiert:

**$T_x$  (twitch):** Die Reizantwort zu einem bestimmten Zeitpunkt  $x$

**Potenz:** Die Potenz eines Muskelrelaxans wird durch die Effektivitätsdosis ( $ED_x$ ) beschrieben. Die  $ED_{95}$  ist somit die Menge an Muskelrelaxans die nötig ist, um die Reizantwort auf 95% der Ausgangsreizantwort von  $T_0 = 100\%$  zu verringern, d.h. der Muskel gibt nur noch 5% seiner ursprünglichen Kontraktionsstärke wieder.

## 1.6. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Muskelrelaxanzien

Die Dauer der Wirkung eines Muskelrelaxans wird maßgeblich durch die Pharmakokinetik beeinflusst. Darunter versteht man den Einfluss der Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung auf die Wirkung eines Medikaments. Hier sind Veränderungen, wie z.B. krankheitsbedingte Abweichungen in der Plasmaproteinbindung von großem Einfluss auf die

individuelle Wirkung von Muskelrelaxanzien. Die Pharmakodynamik hingegen ist die Lehre über den Einfluss von Arzneistoffen auf den Organismus, im Sinne von Dosis-Wirkungsbeziehungen, Wirkungsmechanismen, Nebenwirkungen und Toxikologie.

### **1.7. Überempfindlichkeiten gegenüber depolarisierenden Muskelrelaxanzien**

Überempfindlichkeit gegenüber depolarisierenden Muskelrelaxanzien sind mehrfach beschrieben worden. Meist handelt es sich um Patienten mit Verbrennungen (Martyn, 1986, S. 680, Pavlin, 1988, S. 696, Ward, 1993, S. 595), Patienten nach Immobilisierung (Ibebunjo, 1997, S. 443) oder Denervierung (Hogue, 1990, S. 703) und Patienten mit Sepsis oder systemischer Inflammation (Blobner, 1999, S. 1001, Fish, 1997, S. 1322, Knüttgen, 1999, S. 28, Tomera, 1989, S. 217). Diese Überempfindlichkeit macht sich klinisch bemerkbar als verkürzte Anschlagzeit eines Muskelrelaxans und verzögerte Erholung nach Muskelrelaxation, im Extremfall kann es aber durch die Gabe von Succinylcholin zu Hyperkaliämien mit therapieresistenten Herz-Kreislaufstillständen kommen. Mehrere pharmakokinetische und pharmakodynamische Faktoren, einschließlich der Möglichkeit der Erhöhung der Anzahl der Azetylcholinrezeptoren auf der Muskeloberfläche können potentielle Erklärungen für die beobachteten Überempfindlichkeiten liefern.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen von Immobilisation und Inflammation alleine und in Kombination auf die Pharmakodynamik des depolarisierenden Muskelrelaxans Succinylcholin und auf die Expression von Azetylcholinrezeptoren zu untersuchen. Durch Kombination eines etablierten Inflammodells mittels intravenöser Injektion von Corynebakterium parvum Bakterien (Cummins, 1974, S. 437, Farquhar, 1983, S. 1277), mit einem etablierten Immobilisationsmodell, in dem ein Hinterlauf mittels Kirschner-Drähten immobilisiert wird (Ibebunjo, 1997, S. 444), werden dabei im Latin square Studiendesign folgende Fragen bearbeitet:

- (1) der Einfluss von Immobilisation sowie von Inflammation alleine und in Kombination auf die Expression von Azetylcholinrezeptoren und
- (2) die Bedeutung der Azetylcholinrezeptoren und der Plasma-Cholinesterase für die Pharmakodynamik von Succinylcholin.

### **3. Versuchstiere und Methoden**

#### **3.1. Versuchstiere**

Nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern (AZ 209.1/211-2531-4/04) wurden 55 männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River GmbH, Kisslegg) mit einem Ausgangsgewicht von 270 - 344 g in unseren Tierversuchsställen angeliefert. Eine Akklimatisierungszeit von mindestens 7 Tagen erlaubte den Tieren eine Anpassung an die Umgebung, sowie einen mikrobiellen Abgleich mit ihrer Umgebung. Futter und Trinken wurden den Tieren zu jeder Zeit angeboten. Mit Beginn des Versuchs wurden die Tiere täglich gewogen.

#### **3.2. Tiermodell**

##### **3.2.1. Inflammationsmodell**

Als Modell für die systemische Inflammation diente eine Injektion der Ratten mit hitzeinaktivierten *Corynebacterium parvum* Bakterien. Dazu wurde 34 Ratten 21 mg einer Suspension aus hitzeinaktivierten *Corynebacterium parvum* (C.p.) (Roche, Penzberg) in einem Gesamtvolumen von 0,6 ml über eine Venenverweilkanüle (26G BD Vasculon™ Plus, Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Schweden) in die Vena dorsalis penis injiziert und mit 0,4 ml 0,9%iger Kochsalzlösung nachgespült. Dies induziert eine granulomatöse Entzündung der Leber mit einem Gipfel der Erkrankung am Tag 5 und einem ungefährem Krankheitsverlauf von 8 Tagen (Farquhar, 1983, S. 1278). Um eine chronische systemische Inflammation auszulösen erhielten die Ratten jeweils am Tag 0, 4, und 8 eine Injektion. Die 21 Ratten der Kontrollgruppe erhielten jeweils eine Injektion von 1,0 ml 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl). Vor jeder Injektion wurden 0,2 ml Blut zur Bestimmung der Met-Hämoglobin- (Met-Hb) Konzentration über die Venenverweilkanüle entnommen.



Met-Hb wird durch die Bindung des Entzündungsmediators Stickstoffmonoxid an Hb gebildet und dient somit als indirekter Verlaufsparemeter für die Inflammationsreaktion.

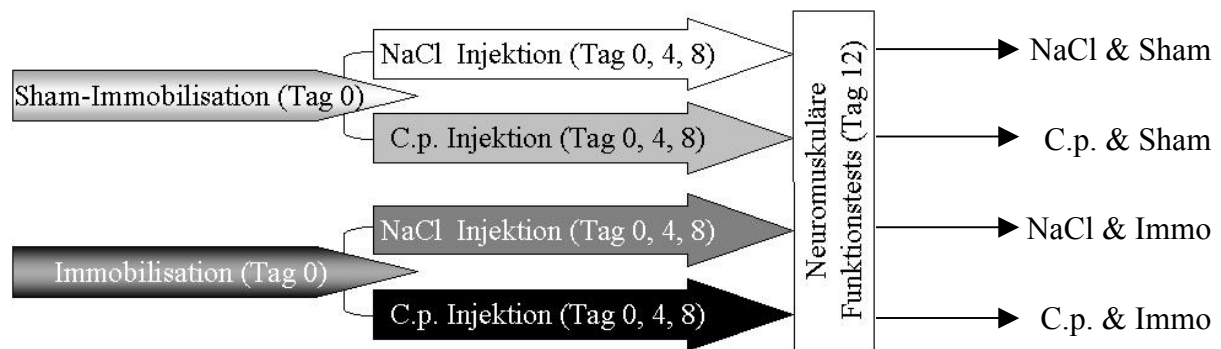
### **3.2.2. Immobilisationsmodell**

Die beiden resultierenden Gruppen, C.p. und NaCl, wurden in zwei weitere Untergruppen unterteilt. In der ersten Untergruppe wurde bei 30 Ratten (19 der C.p.- und 11 der NaCl-Gruppe) je ein Hinterlauf für die gesamten 12 Tage immobilisiert. Hierzu wurden Knie- und Sprunggelenk mit steril in die Knochen eingebrachten, 1,0 mm starken Kirschner-Drähten in einem 90°-Winkel fixiert (Immo). Die Enden kamen unterhalb des Hautniveaus zu liegen und die Wunde mit Prolene™ 4-0, RB-1 (Ethicon™, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgium) verschlossen. Die restlichen 25 Tiere wurden schein-immobilisiert (Sham), das heißt, die Kirschner-Drähte wurden direkt nach dem Einbringen wieder entfernt. Das Operationstrauma ist somit in den beiden Gruppen Immo und Sham gleich. Auch hier wurde die Wunde wie oben beschrieben mit einer Hautnaht verschlossen. Da sowohl an dem Immobilisations- als auch dem Schein-Immobilisations-Bein chirurgische Maßnahmen durchgeführt wurden, wurden diese Beine der Gruppen zusammenfassend als „operiertes Bein“ bezeichnet. Um Seitendifferenzen zu eliminieren, wurde randomisiert je bei der einen Hälfte das rechte, bei der anderen Hälfte das linke Bein immobilisiert, beziehungsweise schein-immobilisiert. Das kontralaterale Bein, an dem keine chirurgischen Interventionen durchgeführt wurden, wurde als „nicht operiertes Bein“ bezeichnet und diente zur Beobachtung systemischer Effekte der Interventionen.

### 3.3. Studienprotokoll

Durch Kombination der beiden Modelle Inflammation und Immobilisation entstanden insgesamt vier verschiedene Gruppen (Abbildung 3):

**Abbildung 3:** Übersicht über die verschiedenen Gruppen



12 Tage nach der ersten C.p.-Injektion und der Immobilisation wurden die verbliebenen Kirschner-Drähte entfernt und die Pharmakodynamik von Succinylcholin am Muskulus tibialis cranialis mechanomyographisch bestimmt. Am Ende des Versuchs wurden die Tiere durch Blutentnahme getötet.

Die *in vivo* Parameter, welche am jeweiligen Versuchstag gemessen wurden, beinhalteten die Pharmakodynamik von Succinylcholin sowie Plasmaspiegel von  $\alpha_1$ -saurem Glykoprotein ( $\alpha_1$ -AGP) und Plasma-Cholinesterase (PChE) sowie die Konzentration von Met-Hb im Vollblut. *In vitro* wurde die Expression der Azetylcholinrezeptoren auf dem Muskulus tibialis cranialis bestimmt.

12 Tiere verstarben nach C.p.-Injektionen und bei 3 Tieren war die Immobilisation insuffizient. Weitere Ausschlusskriterien waren ein Gewichtsverlust größer 30% und nicht korrigierbare metabolische, respiratorische oder kardiovaskuläre Probleme am OP-Tag. Bei

den verbleibenden 40 Tiere konnte der Versuch erfolgreich beendet werden, so dass die individuelle Gruppengröße  $n=10$  betrug.

### **3.4. Anästhesie zum Versuch**

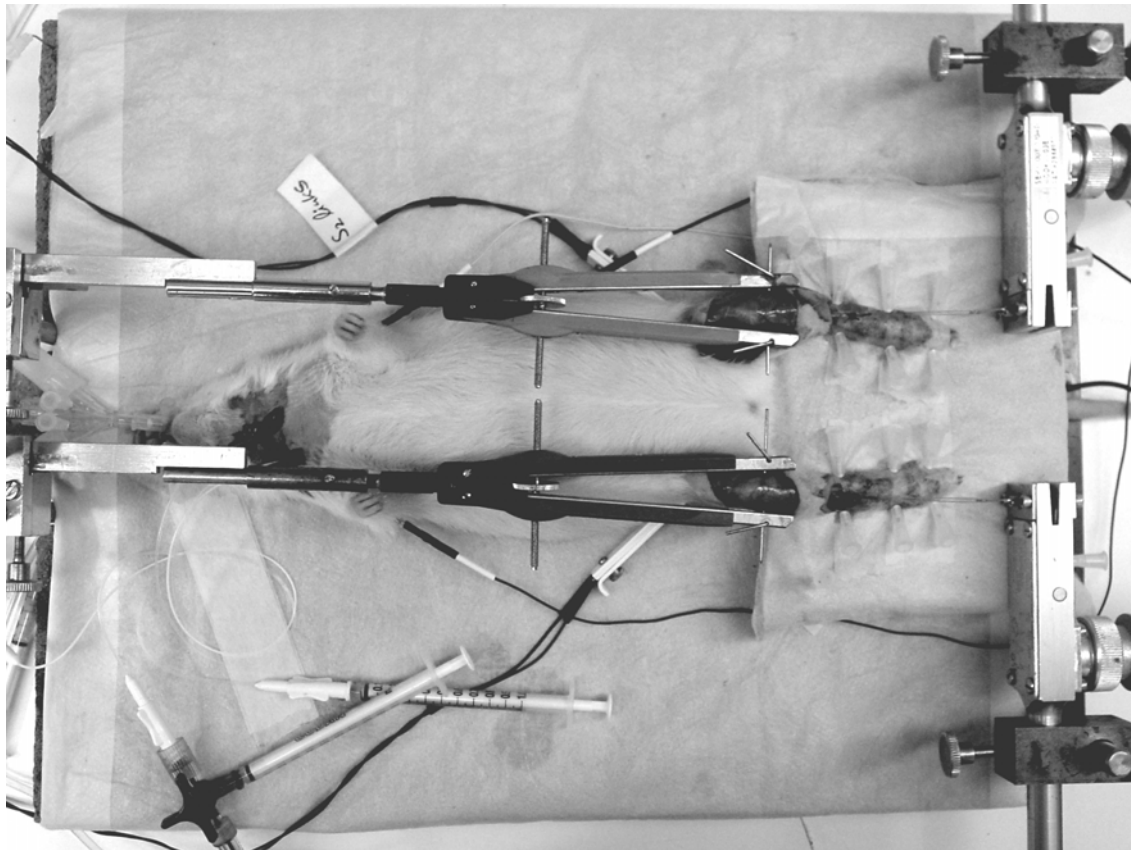
Für die Immobilisation und die C.p.-Injektionen wurde die Narkose in einer Plexiglas-Kammer mit Sevofluran eingeleitet. Nach dem Bewusstseinsverlust wurden die Tiere mit der Schnauze in eine Kopfkammer gesteckt. Die Narkose wurde bei den spontan atmenden Ratten mit einem kontinuierlichen Fluss von 4 – 5 Vol.% Sevofluran in reinem Sauerstoff durch die Kopfkammer im Stadium der chirurgischen Toleranz aufrechterhalten. Nach der Injektion bzw. Instrumentierung wurde die Sevofluran-Zufuhr beendet und die Tiere erhielten bis zum Erwachen reinen Sauerstoff zugeführt. Am Tag 12 wurde die Narkose zur neuromuskulären Messung wie zuvor in der Plexiglas-Kammer mit Sevofluran eingeleitet. Nach dem Bewusstseinsverlust wurden die Tiere jedoch endotracheal intubiert und bei einem inspiratorischen Sauerstoffanteil ( $F_{iO_2}$ ) von 0,4 volumenkontrolliert ventiliert (Small Animal Ventilator, Harvard Apparatus, Natick, USA). Als Tubus diente eine i.v. Venenverweilkanüle (14-16 G, BD Venflon™ Pro, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden). Die Narkose wurde mit 4 – 6 Vol.% Sevofluran aufrechterhalten. Anfangs wurde ein Atemzugvolumen von 10 ml/kg Körpergewicht bei einer Atemfrequenz von 60/min gewählt. Sobald arterielle Blutgase analysiert werden konnten, wurde das Atemminutenvolumen so gewählt, dass sich der arterielle Kohlendioxidpartialdruck ( $P_aCO_2$ ) zwischen 35 und 45 mmHg befand. Die Narkose wurde nach Kanülierung der V. jugularis externa auf eine totale intravenöse Anästhesie mit 12 – 24 mg/h Propofol 2% (Fresenius Kabi, Bad Homburg) und 4 – 16 µg/h Fentanyl (Janssen-Cilag GmbH, Neuss) umgestellt. Um einen inhibierenden Einfluss von Sevofluran auf die Azetylcholinrezeptoren

auszuschließen, erfolgten die neuromuskulären Funktionstests frühestens eine Stunde nach Beginn der intravenösen Anästhesie. Die Narkosetiefe wurde anhand kardiovaskulärer Werte beurteilt und bei Bedarf angepasst.

### **3.5. Instrumentierung**

Nach der Intubation wurden die Ratten auf dem Rücken gelagert. Die rechte Vena jugularis externa wurde freipräpariert und mit 2 Polyethylen – Kathetern (Dispomedica, Hamburg) kanüliert. Über einen Katheter wurden die intravenösen Narkosemittel Propofol und Fentanyl kontinuierlich infundiert, der zweite Katheter diente als Injektionsmöglichkeit für Glucose, Natriumbikarbonat und Succinylcholin. Über einen weiteren Polyethylen – Katheter in der rechten Arteria carotis wurde der Blutdruck kontinuierlich invasiv gemessen. Ebenso dient dieser als Entnahmestelle für arterielles Blut zur Blutgasanalyse. Die neuromuskuläre Funktion wurde mit evozierter Mechanomyographie (Myograph, Biometer, Kopenhagen, Dänemark) gemessen. Beide Nervi ischiadici wurden so weit proximal als möglich freipräpariert und mit Reizelektroden versehen. Durch die Femurkondylen wurde beidseits ein 1,0 mm Kirschnerdraht gebohrt, der über eine hufeisenförmige Apparatur nach kranial fixiert wurde. Die Sehnen der Mm. tibiales craniales wurden freipräpariert, über das Retinaculum subluxiert und mit Hilfe von 2-0 Mersilene™ Fäden (Ethicon™, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien) nach kaudal an den Kraftaufnehmer des Mechanomyographen befestigt. Fixiertes Knie, Muskulus tibialis cranialis und Kraftaufnehmer bildeten somit eine Gerade (Abbildung 4).

**Abbildung 4:** Versuchsaufbau am Tag 12



### **3.6. Monitoring**

Um stabile hämodynamische Verhältnisse während des gesamten Versuchsablaufs zu garantieren, wurde die Herzfrequenz mittels subkutaner EKG Elektroden kontinuierlich kontrolliert und der mittlere arterielle Druck zwischen 75 und 150 mmHg konstant gehalten.. Die rektale Temperatur wurde unter zu Hilfenahme einer Heizlampe zwischen 36,8 und 37,2 °C konstant gehalten. Ein stabiler Gasaustausch wurde durch konstante arterielle Sauerstoffpartialdrücke ( $P_{aO_2}$ )  $> 90$ mmHg,  $P_{aCO_2}$  innerhalb eines Intervall von 35 und 45 mmHg, pH zwischen 7,36 und 7,44 sowie einem Basenüberschuss zwischen  $-4$  und  $+4$  gewährleistet. Falls nötig, wurden Abweichungen in pH,  $P_{aCO_2}$  oder Basenüberschuss durch

Anpassung des Atemminutenvolumens und/oder mit 8,4% Natriumbikarbonat behandelt. Der Blutzucker wurde über 75 mg/dl gehalten.

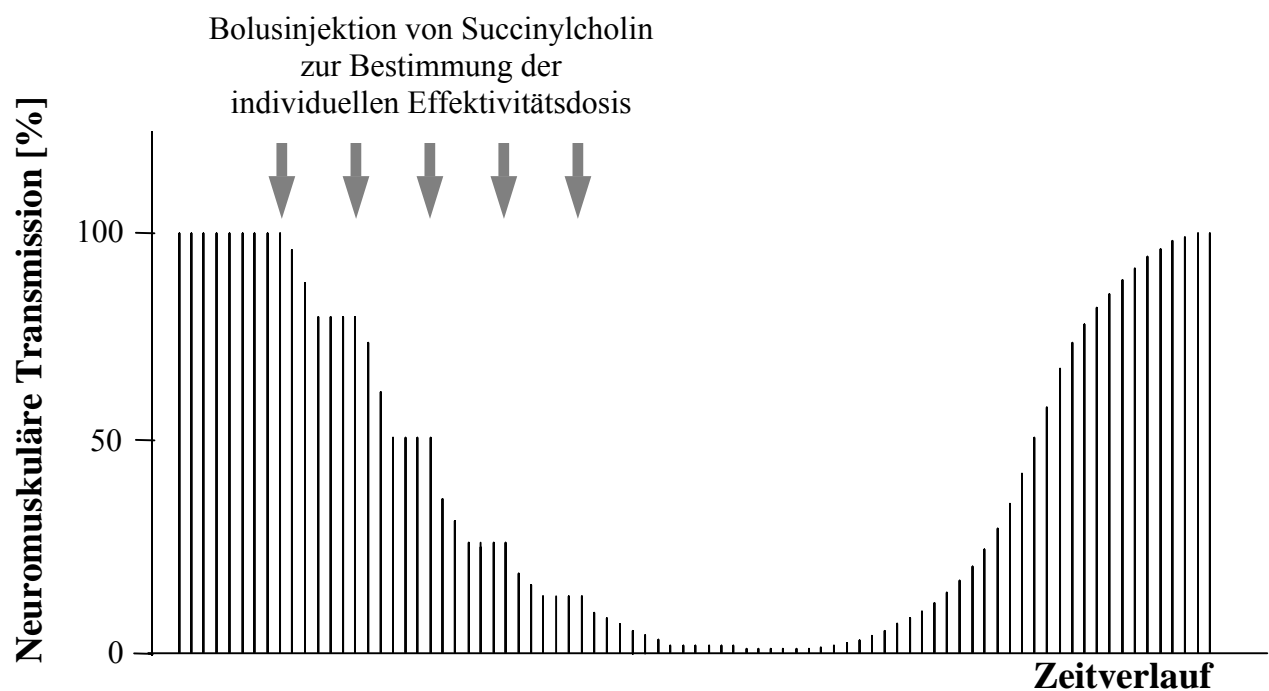
### **3.7. Versuchsablauf**

Nach Abschluss der Präparation und Umstellung der Narkose von Sevofluran auf Propofol/Fentanyl wurde den Tieren eine Stabilisierungsperiode von einer Stunde ab Beginn der intravenösen Narkose gewährt. Dadurch schlossen wir einen direkten Einfluss des Sevofluran auf die neuromuskuläre Übertragung aus. Nach der Stabilisierungsphase wurden die hämodynamischen Parameter und arteriellen Blutgaswerte kontrolliert, bei Bedarf korrigiert und dokumentiert. Danach begann die neuromuskuläre Stimulation. Der Nervus ischiadicus wurde mit Einzelreizen (1 Hz, 2 msec) stimuliert und die Kontraktionsantwort des Muskulus tibialis cranialis mittels eines Schreibers auf skaliertem Papier dokumentiert. Die supramaximale Stimulationsstärke und die Ausgangs-Kontraktionsamplitude wurden bestimmt. Die Muskelkontraktionen wurde über einen Zeitraum von 10 Min aufgezeichnet. Im Anschluss wurde für jede Ratte die individuelle Dosis-Wirkungskurve für Succinylcholin mit Hilfe der kumulativen Dosis-Wirkungsmethode bestimmt (Ward, 1993, S. 350):

Einzeldosen von je 50 µg Succinylcholin wurden den Ratten intravenös injiziert. Die jeweils folgende Dosis wurde erst verabreicht, wenn die maximale Wirkung der vorangegangenen Dosis erreicht war, erkennbar an 3 aufeinanderfolgenden gleich hohen Kontraktionsantworten. Die Einzeldosen wurden nacheinander injiziert, bis keine Kontraktion mehr nachweisbar war. Dies entspricht einer vollständigen neuromuskulären Blockade. Dieses Ziel wurde mit 3 - 5 Einzeldosen von Succinylcholin erreicht (Abbildung 5). Arterielle Blutgase, Serumelektrolyte und hämodynamische Parameter wurden vor der ersten und direkt nach der letzten Succinylcholin-Injektion erfasst. Nach vollständiger Erholung von der neuromuskulären Blockade wurden die Tiere in Narkose durch Entbluten

getötet. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen, circa 1 ml für das Blutbild im Kühlschranks konserviert und der Rest in 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Anschließend wurde das Blut bei 4°C mit 3,500 Umdrehungen pro min für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und für die späteren Analysen von  $\alpha_1$ -AGP und PChE-Plasmaspiegeln bei -80°C tiefgefroren. Darauffolgend wurden beide Mm. tibiales craniales freipräpariert, entnommen, sofort auf Trockeneis tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Das Blutbild wurde nach Versuchsende automatisiert bestimmt (Cellcounter System 9000, Serono Baker Diagnostic Inc., Allentown, Pennsylvania, USA).

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Messungen zur Pharmakodynamik von Succinylcholin



## **3.8. Laborchemische Analysen**

### **3.8.1. Met-Hämoglobin**

Nach Injektion von hitzeinaktivierten *Corynebacterium parvum* Bakterien exprimieren in erster Linie Makrophagen die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (Rees, 1995, S. 691). Diese generiert das Radikal Stickstoffmonoxid. Durch die hohe Reaktivität und Instabilität von Stickstoffmonoxid ist der direkte Nachweis der erhöhten Spiegel aufwendig und kann nur für einen definierten Augenblick gelingen. Stickstoffmonoxid oxidiert jedoch Hämoglobin zu Methämoglobin. Deshalb wurde zur individuellen Verlaufskontrolle der Inflamationsreaktion in diesem Versuch die venöse Methämoglobin-Konzentration im Vollblut durch eine automatisierte Blutgasanalyse (Rapidlab™ 860, Bayer Diagnostics, Fernwald) an den Tagen 0, 4, 8, und 12 bestimmt.

### **3.8.2. $\alpha_1$ -saures Glykoprotein**

Zur Bestimmung der  $\alpha_1$ -AGP Spiegel wurde ein Chemilumineszenz Immunoassay benutzt (Metzger, 2001, S. 514). Der Assay basiert auf einem Antigen Capture Assay mit biotinyliertem Ratten- $\alpha_1$ -AGP als Tracer.

### **3.8.3. Plasmacholinesterase**

Die Plasmacholinesterase ist verantwortlich für den Abbau von Succinylcholin im Plasma. Der größte Teil des injizierten Succinylcholins wird auf diesem Weg bereits vor Erreichen des synaptischen Spalts in unwirksames Succinylmonocholin und Cholin umgewandelt. Zum Ausschluss einer Verminderung des Plasmacholinesterase-Spiegels als Ursache einer veränderten Pharmakodynamik von Succinylcholin wurde der Plasmacholinesterase-Spiegel



mit einem automatisierten Standardverfahren im Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar bestimmt.

### **3.9. Azetylcholinrezeptor Assay**

Die Oberflächenexpression der Azetylcholinrezeptoren wurde mittels  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin ( $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ BTX) Bindung quantifiziert (Ibebunjo, 1999, S. 277).  $\alpha$ BTX (Molekulargewicht [MW] = 8000), ein Extrakt aus dem Kobragift, ist ein spezifischer Ligand des Azetylcholinrezeptors, der irreversibel an den Rezeptor bindet. Durch Konjugation des  $\alpha$ -BTX mit einem geeigneten Marker, wie z.B.  $^{125}\text{I}$ , lässt sich die Menge der Azetylcholinrezeptoren indirekt über die Messung der  $\gamma$ -Emission quantifizieren.

Die gefrorenen Tibialis cranialis Muskeln wurden auf Eis getaut und bei 4°C in einem 0,01 M Kaliumphosphatpuffer homogenisiert (pH 7,4, versetzt mit den Proteaseinhibitoren EDTA [1mM], Phenylmethylsulfonylfluorid [0,1M], Benzamidinhydrochlorid [2mM], 0,5 mg/ml Bacitracin und dem bakteriziden Wirkstoff Natriumazid [0,02%]). Das Homogenat wurde mit 20.000-facher Erdanziehungskraft bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die durch das Zentrifugen entstandenen Präzipitate wurden erneut in dem Kaliumphosphatpuffer suspendiert. Zusätzlich enthielt der Puffer bei diesem Schritt 2% (v/v) Triton X-100 - einem Detergens mit der Eigenschaft Membranproteine, unter anderem den Azetylcholinrezeptor, aus der Zellmembran zu lösen (alle Chemikalien von Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C auf einer Rotationsplattform inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension mit 20.000-facher Erdanziehungskraft bei 4°C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand mit dem gelösten Azetylcholinrezeptor wurde abpipettiert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Bio-Rad Detergent Compatible (DC) Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,

USA) bestimmt. Die  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$  Bindung an die gelösten Azetylcholinrezeptoren wurde in einem dreifach Ansatz aus dem Extrakt analysiert. In drei Reagenzgläsern wurden je 100  $\mu\text{l}$  Muskelextrakt mit 2.5 nM  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$  (spezifische Aktivität  $\sim 16,8 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ , NEN, Boston MA) bei Zimmertemperatur für 90 Min inkubiert. Überschüssiges, nicht gebundenes  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$  wurde von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$ -Azetylcholinrezeptor-Komplexen mittels Vakuumfiltration durch Whatman GF/B Glasfaserfilter (getränkt in 10%iger Polyethylenimin Lösung) getrennt. Um Bindung von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$  an Proteinen ausserhalb des Azetylcholinrezeptors zu bestimmen, musste die sogenannte „unspezifische Bindung“ zusätzlich bestimmt werden. Dies wurde ebenfalls in einem 3-fach Ansatzes durchgeführt. Vor der Inkubation mit  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$  wurden je 100 $\mu\text{l}$  Muskelextrakt mit nicht-radioaktivem  $\alpha$ -BTX versetzt. Das nicht radioaktiv markierte BTX bindet an Azetylcholinrezeptor ohne dabei später ein radioaktives Signal abzugeben. Die erst nachträglich hinzugefügte radioaktive  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$  Lösung bindet somit nur an nicht Azetylcholin spezifische (=unspezifische) Bindungsstellen. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Gammazähler in counts pro Minute (cpm) gemessen. Aus den einzelnen cpm wurde der Mittelwert der jeweiligen 3-fach Ansätze (spezifische und unspezifische) berechnet. Die Menge der Azetylcholinrezeptoren wurde aus dem Molekulargewicht, der spezifischen Aktivität des  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$  und den cpm an Hand folgender Schritte berechnet:

Gleichung 1: Molare Konzentration von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha\text{BTX}$

$$\text{Konzentration } ^{125}\text{I}-\alpha\text{BTX [M]} = \frac{\text{Gesamtaktivität } [\mu\text{Ci}]}{(\text{Spezifische Aktivität } [\mu\text{Ci}/\mu\text{g}] \times (\text{MW} = 8000) \times 10^6)}$$

Gleichung 2: Korrektur für den Radioaktiven Zerfall

$$\text{Gesamtaktivität } [\mu\text{Ci}] \times \text{Zerfallsfaktor (aus Tabelle)} = \text{Gesamtaktivität}_{\text{Zerfall}} [\mu\text{Ci}]$$

Gleichung 3: Berechnung des DPM (decay = Zerfall pro min) – Äquivalents:

$$\text{DPM Äquivalent} = \frac{\text{Gleichung 1}}{(\text{Gleichung 2} \times 2,22 \times 10^6) \times 10^{-15}}$$

Anmerkungen:  $1 \mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6$

Division mit  $10^{-15}$  konvertiert das Ergebnis von mol zu fmol

Gleichung 4: Konzentration der Azetylcholinrezeptoren in 100  $\mu\text{l}$  Muskelextrakt

$\text{cpm} \times \text{Gleichung 3} = \text{Azetylcholinrezeptoren [fmol / 100}\mu\text{l Extrakt]}$

Gleichung 5: Expression des Azetylcholinrezeptors

$$\text{Azetylcholinrezeptor-Expression [fmol/mg Protein]} = \frac{\text{Gleichung 4}}{\text{Proteinkonzentration [mg/100}\mu\text{l]}} \times 10$$

### 3.10. Statistik

Die individuellen Succinylcholineffektivitätsdosen um eine 5%, 50%, respektive 95% neuromuskuläre Blockade zu erzielen ( $\text{ED}_5$ ,  $\text{ED}_{50}$ , und  $\text{ED}_{95}$ ) wurden anhand der jeweiligen kumulativen Dosis-Wirkungsbeziehung berechnet. Dies geschah durch Interpolation der linearen Regression der prozentuale Blockade in logit und dem Logarithmus der jeweiligen kumulativen Succinylcholindosis.

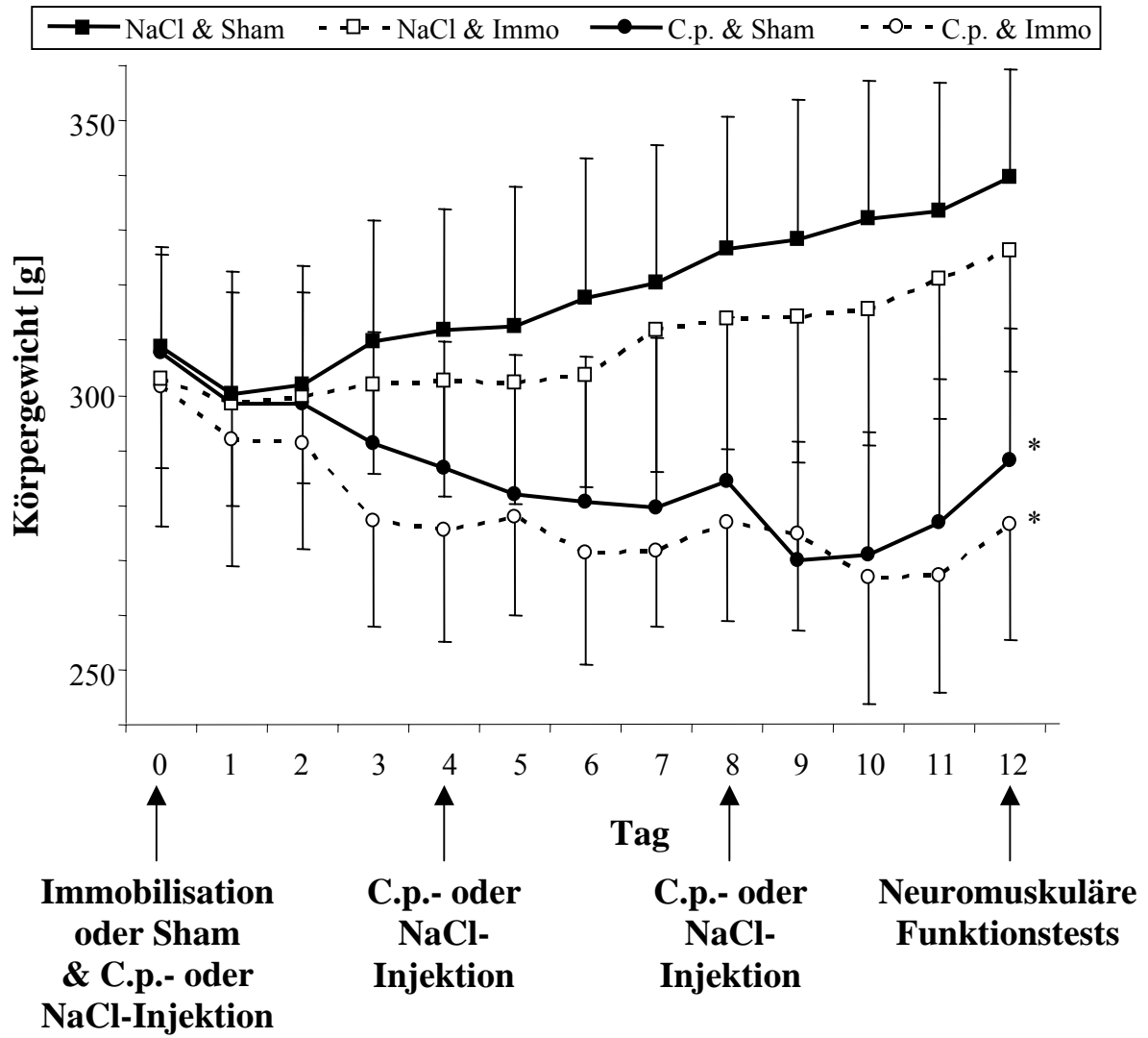
Alle Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung präsentiert. Die statistische Auswertung wurde mit einer faktoriellen ANOVA durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem  $p < 0,05$  angenommen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Inflammationsparameter**

12 Tiere starben aufgrund der systemischen Inflammation nach den C.p.-Injektionen. Nach Induktion einer systemischen Inflammation durch Injektion von *Corynebacterium parvum* verloren die Ratten ab Tag 4 signifikant an Gewicht verglichen mit den NaCl-Tieren. Immobilisierte Tiere unterschieden sich im Körpergewicht nicht signifikant von den Werten der entsprechenden sham-immobilisierten Tiere (Abbildung 6). Met-Hb-Konzentrationen waren in den C.p.-Gruppen ab Tag 4 signifikant erhöht und erreichten zwischen Tag 8 und Tag 12 ihr Maximum (Tabelle 1a).  $\alpha_1$ -AGP Spiegel am Tag 12 waren in beiden C.p.-Gruppen signifikant erhöht, die Erythrozyten- und Thrombozytenzahl zu diesem Zeitpunkt signifikant niedriger als in der NaCl-Gruppe (Tabelle 1b).

**Abbildung 6:** Verlauf des Körpergewichts



\* p<0,05 versus entsprechende NaCl-Gruppe

**Tabelle 1a:** Verlauf der Met-Hb Konzentration

	<b>Met-Hb Tag 0</b> [%]	<b>Met-Hb Tag 4</b> [%]	<b>Met-Hb Tag 8</b> [%]	<b>Met-Hb Tag 12</b> [%]
<b>NaCl &amp; Sham</b>	0,32 ± 0,15	0,29 ± 0,04	0,30 ± 0,08	0,28 ± 0,07
<b>NaCl &amp; Immo</b>	0,25 ± 0,07	0,40 ± 0,27	0,21 ± 0,14	0,16 ± 0,15
<b>C.p. &amp; Sham</b>	0,29 ± 0,03	3,39 ± 2,08 *	8,94 ± 4,45 *	8,55 ± 4,33 *
<b>C.p. &amp; Immo</b>	0,28 ± 0,05	2,46 ± 1,58 *	3,29 ± 1,42 *	9,20 ± 8,36 *

\* p<0,05 versus NaCl & Sham

**Tabelle 1b:** Systemische Entzündungszeichen am Tag 12

	<b>α<sub>1</sub>-AGP</b> [mg/ml]	<b>Leukozyten</b> [*1000/mm <sup>3</sup> ]	<b>Thrombozyten</b> [*1000/mm <sup>3</sup> ]	<b>Erythrozyten</b> [*1000000/mm <sup>3</sup> ]
<b>NaCl &amp; Sham</b>	0,25 ± 0,16	7,29 ± 3,16	755 ± 152	6,74 ± 0,86
<b>NaCl &amp; Immo</b>	0,26 ± 0,24	7,48 ± 3,51	822 ± 220	6,10 ± 0,90
<b>C.p. &amp; Sham</b>	1,60 ± 0,48 *	5,83 ± 1,94	355 ± 92 *	4,52 ± 0,89*
<b>C.p. &amp; Immo</b>	1,69 ± 0,49 *	7,76 ± 2,83	491 ± 287 *	4,34 ± 0,68*

\* p<0,05 versus NaCl & Sham

## 4.2. Immobilisationsparameter

3 Tiere wurden aus dem Versuch genommen, da die Immobilisation insuffizient war. Die Muskelgewichte des M. tibialis cranialis und des M. gastrocnemius des operierten Beins waren am Tag 12 in beiden immobilisierten Gruppen, sowie in der sham-immobilisierten C.p.-Gruppe signifikant erniedrigt. Am nicht operierten Bein kam es nur nach Inflammation zu einer signifikanten Abnahme des Muskelgewichts, während für die Immobilisation hier kein systemischer Effekt nachweisbar war (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Muskelgewichte

Gruppe	M. tibialis cranialis [g]		M. gastrocnemius [g]	
	Operiertes Bein	Nicht operiertes Bein	Operiertes Bein	Nicht operiertes Bein
<b>NaCl &amp; Sham</b>	0,61 ± 0,06	0,66 ± 0,06	1,54 ± 0,15	1,76 ± 0,19
<b>NaCl &amp; Immo</b>	0,38 ± 0,05 *	0,65 ± 0,05	0,98 ± 0,20 *	1,65 ± 0,10
<b>C.p. &amp; Sham</b>	0,40 ± 0,06 *	0,52 ± 0,06 *	1,04 ± 0,10 *	1,26 ± 0,13 *
<b>C.p. &amp; Immo</b>	0,30 ± 0,03 *	0,46 ± 0,07 *	0,86 ± 0,10 *	1,26 ± 0,16 *

\*p < 0,05 versus NaCl & Sham

## 4.3. Modellstabilität

Die hämodynamischen Parameter wurden während des gesamten Versuchs in jeder Ratte stabil gehalten. Die Werte unterschieden sich in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant voneinander und werden deshalb als Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen aller Gruppen dargestellt. Unmittelbar vor der Succinylcholininjektion war der mittlere arterielle Druck  $111 \pm 12$  mmHg, die Herzfrequenz  $392 \pm 27$  /min, der arterielle pH-Wert  $7,39 \pm 0,04$ , der Basenüberschuss  $-0,9 \pm 2,3$  mM und die Körpertemperatur betrug  $37,1 \pm 0,2$  °C. Direkt nach Injektion von Succinylcholin war der mittlere arterielle Druck  $116 \pm 15$

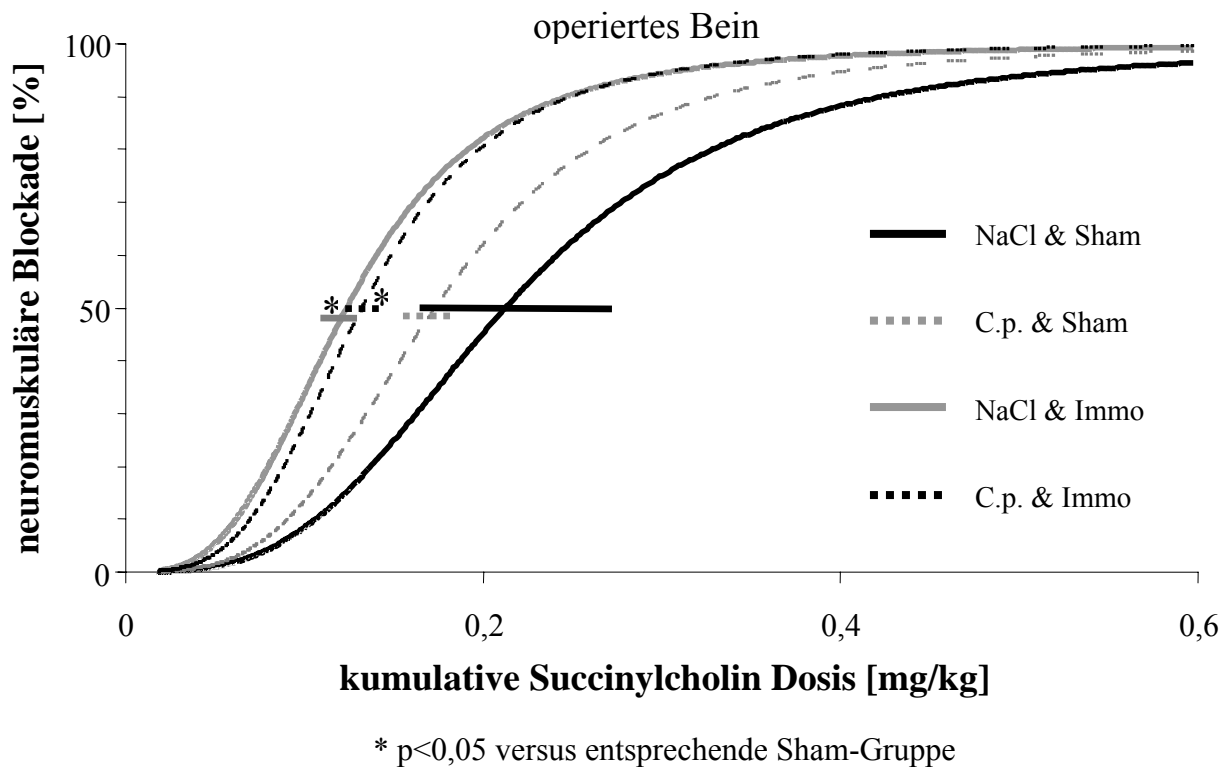
mmHg, die Herzfrequenz  $390 \pm 37$  /min, der arterielle pH Wert  $7,35 \pm 0,04$ , der Basenüberschuss  $-0,9 \pm 5,1$  mM und die Körpertemperatur lag bei  $37,0 \pm 0,2$  °C.

#### **4.4. Succinylcholin-Pharmakodynamik und Azetylcholinrezeptor-Expression**

Die ED<sub>5</sub>-, ED<sub>50</sub>- und ED<sub>95</sub>- Werte für Succinylcholin waren am operierten Bein von den immobilisierten Ratten im Vergleich mit den NaCl-Sham-Tieren signifikant verringert (Abbildung 7 und Tabelle 3a). Am nicht operierten Bein gab es keine signifikanten Unterschiede der Effektivitätsdosen (Tabelle 3b). Interessanterweise induzierte Succinylcholin signifikante muskuläre Kontraktionen (Abbildung 8a) in den operierten Beinen beider immobilisierten, sowie der sham-immobilisierten C.p.-Gruppe. Diese Kontraktionen waren am nicht operierten Bein nicht nachweisbar (Abbildung 8b). Die Plasmacholinesterase war in allen vier Gruppen erniedrigt ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 3a). Am operierten Bein der Ratten mit Immobilisation, Inflammation, und der Kombination beider Schädigungen kam es zu einer signifikanten Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren im M. tibialis cranialis. Ebenso waren die Azetylcholinrezeptoren beider C.p.-Gruppen am nicht operierten Bein verglichen mit den jeweiligen NaCl-Gruppen signifikant hochreguliert (Abbildung 9). Das Serumkalium stieg um  $0,2 \pm 0,4$  mmol/l an, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.



**Abbildung 7:** Dosis-Wirkungs-Kurve von Succinylcholin am operierten Bein  
 (Querbalken zeigen das jeweilige 95 % Konfidenzintervall bei 50 % neuromuskulärer Blockade)



**Tabelle 3a:** Effektivitätsdosen von Succinylcholin am operierten Bein  
und Plasmacholinesterase-Spiegel

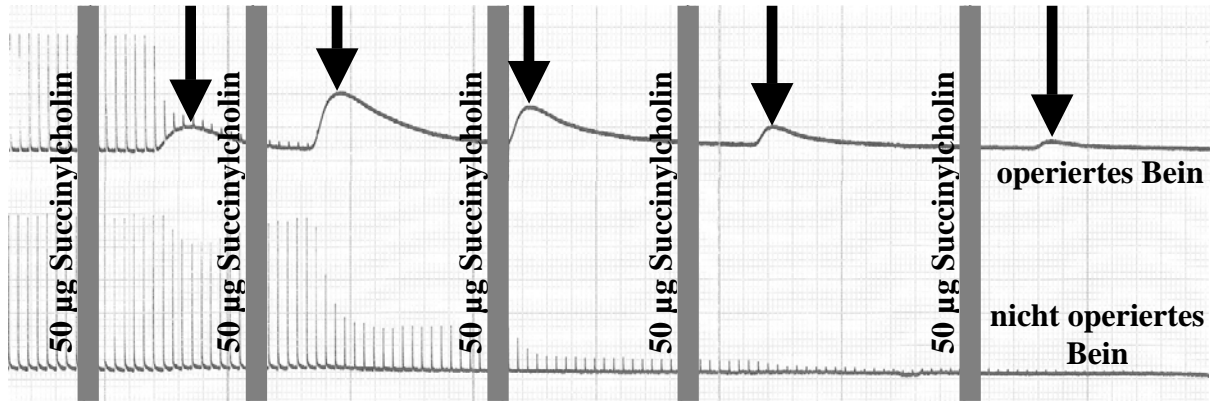
Gruppe	ED <sub>5</sub> [mg/kg]	ED <sub>50</sub> [mg/kg]	ED <sub>95</sub> [mg/kg]	PChE [IU]
<b>NaCl &amp; Sham</b>	0,10 ± 0,06	0,29 ± 0,18	0,88 ± 0,64	113 ± 28
<b>NaCl &amp; Immo</b>	0,05 ± 0,02 *	0,13 ± 0,04 *	0,34 ± 0,15 *	122 ± 30
<b>C.p. &amp; Sham</b>	0,07 ± 0,03	0,18 ± 0,05	0,47 ± 0,22	120 ± 15
<b>C.p. &amp; Immo</b>	0,06 ± 0,01 *	0,14 ± 0,04 *	0,36 ± 0,18 *	117 ± 32

\* p<0,05 versus entsprechende Sham-Gruppe

**Tabelle 3b:** Effektivitätsdosen von Succinylcholin am nicht operierten Bein

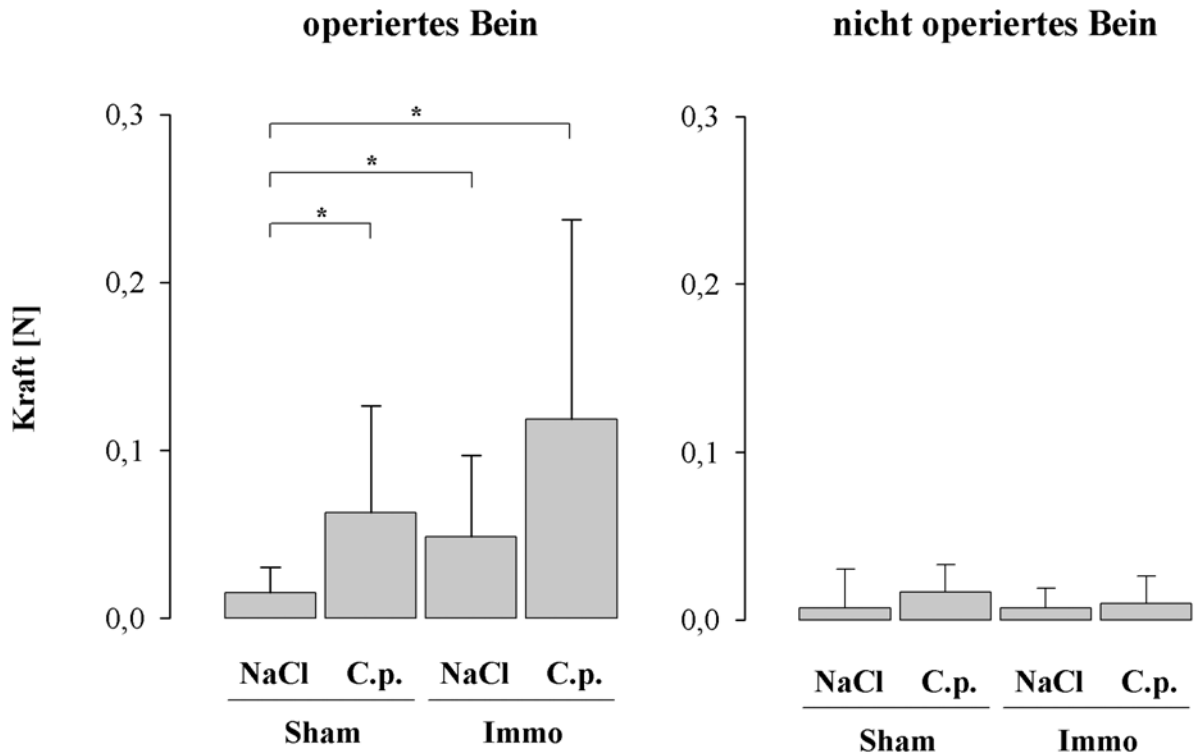
Gruppe	ED <sub>5</sub> [mg/kg]	ED <sub>50</sub> [mg/kg]	ED <sub>95</sub> [mg/kg]
<b>NaCl &amp; Sham</b>	0,09 ± 0,06	0,25 ± 0,17	0,69 ± 0,53
<b>NaCl &amp; Immo</b>	0,07 ± 0,02	0,18 ± 0,07	0,51 ± 0,35
<b>C.p. &amp; Sham</b>	0,09 ± 0,05	0,22 ± 0,12	0,66 ± 0,47
<b>C.p. &amp; Immo</b>	0,10 ± 0,05	0,20 ± 0,07	0,43 ± 0,13

**Abbildung 8a:** Succinylcholin-induzierte Kontraktionen



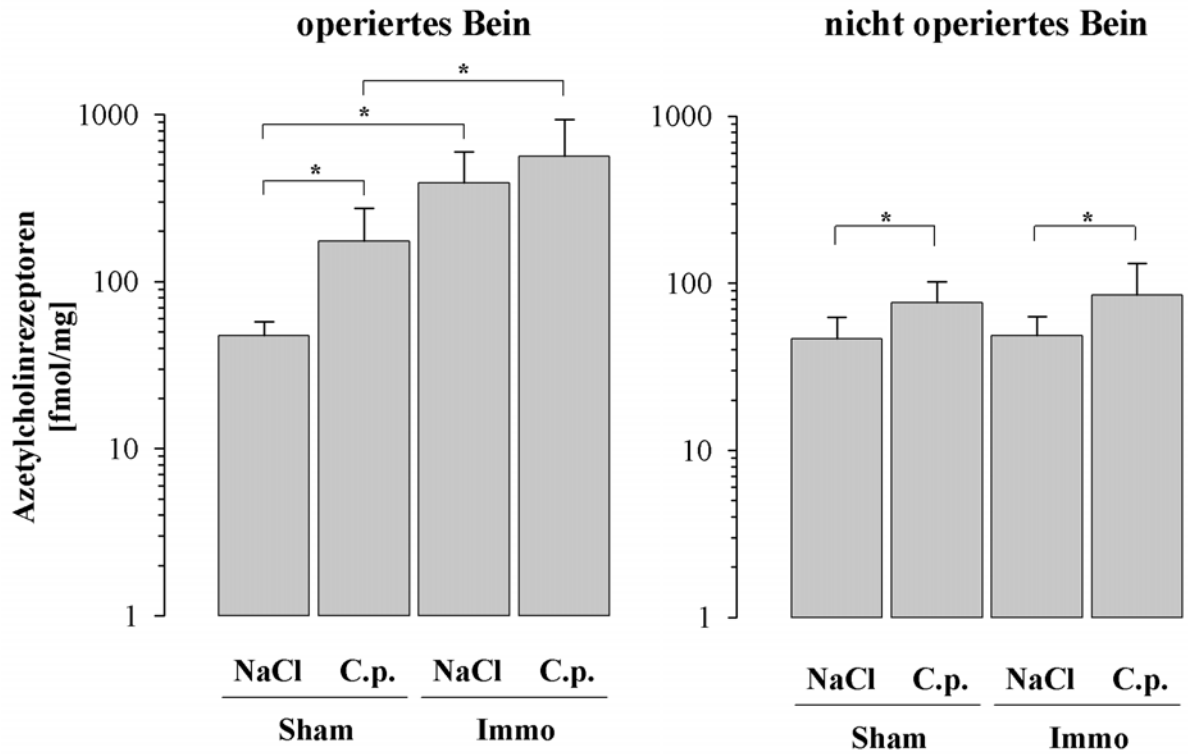
Mechanomyographie nach 12 Tagen Immobilisation und Inflammation: die obere Spur zeigt das operierte, die untere das nicht operierte Bein der selben Ratte. Die Pfeile markieren die Succinylcholin-induzierten Kontraktionen (1mm entspricht 0,048 N)

**Abbildung 8b:** Succinylcholin-induzierte Kontraktionen



\*  $p < 0,05$

**Abbildung 9:** Expression der Azetylcholinrezeptoren



\* p < 0,05

## 5. Diskussion

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass sowohl eine Immobilisation als auch eine systemische Inflammation zu einer Hochregulierung muskulärer Azetylcholinrezeptoren führt. Am chirurgisch vorbehandelten Bein wirkte sich diese Hochregulation in einer erhöhten Sensibilität gegenüber Succinylcholin aus, während die inflammationsbedingte Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren am nicht operierten Bein zu keiner veränderten Succinylcholin-Pharmakodynamik führte. Interessanterweise bewirkte Succinylcholin aber am operierten Bein beider C.p.-Gruppen, sowie in der immobilisierten NaCl-Gruppe signifikante muskuläre Kontraktionen. Hyperkaliämie Reaktionen blieben in diesem Modell in allen Gruppen aus.

Eine Hochregulation von Azetylcholinrezeptoren ist bisher nachgewiesen bei Läsionen des oberen (Brett, 1987, S. 838) oder unteren (Hogue, 1990, S. 706) Motoneurons, Verbrennungen (Kim, 1988, S. 1748), längerdauernder Applikation von Muskelrelaxanzien (Hogue, 1992, S. 1329) und Immobilisation (Pestronk, 1976, S. 352). Die Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren konnte in unserem Modell ebenfalls bestätigt werden. Klinisch gesehen führt diese Hochregulierung zu einer Hyposensitivität gegenüber nicht-depolarisierenden, sowie zu einer Hypersensitivität gegenüber depolarisierenden Muskelrelaxanzien, das heisst Succinylcholin. Letzteres kann schließlich zu einem schwer zu therapierenden, hyperkaliämen Kreislaufstillstand nach einer Succinylcholininjektion führen (Gronert, 1975, S. 91, Yanez, 1996, S. 389), zumindest wenn größere Muskelgruppen betroffen sind.

Es gibt beträchtliche Kontroversen über den Auslöser erhöhter Azetylcholinrezeptoren bei Patienten nach längerer Intensivtherapie, SIRS sowie schwerer Infektion. Das Hauptproblem ist, dass eine Sepsis oder ein SIRS fast immer mit einer Ganzkörper-, zumindest aber mit

einer Teilimmobilisation der Patienten auf der Intensivstation verbunden ist. Durch diese Koinzidenz wird bei Patienten eine Differenzierung zwischen den beiden hauptsächlich in Betracht kommenden Auslösern einer Hochregulation - Immobilisation und Inflammation - nahezu unmöglich. In einigen Fallberichten wird die systemische Inflammation als Hauptursache für Succinylcholinhypersensitivität mit konsekutivem hyperkaliämen Kreislaufstillstand postuliert (Baur, 1976, S. 6, Khan, 1983, S. 329), ein endgültiger Nachweis dafür steht jedoch noch aus. In einer vorausgegangenen Studie fanden Fink et al. jedoch nach einem durch einmalige C.p.-Injektion hervorgerufenen SIRS keine Erhöhung der Azetylcholinrezeptoren (Fink, 2003, S. 85). Bei unserem Modell einer chronisch systemischen Inflammation nahmen dagegen am nicht operierten Bein in beiden C.p.-Gruppen verglichen mit den entsprechenden NaCl-Gruppen die Azetylcholinrezeptoren signifikant zu, was als systemischer Effekt der Inflammation auf die Azetylcholinrezeptor-Regulation gewertet werden kann. Da die Pharmakodynamik von Succinylcholin hiervon jedoch unbeeinflusst blieb, handelt es sich vermutlich um einen subklinischen Effekt. Am operierten Bein hatte die Inflammation bei immobilisierten Tieren verglichen mit der entsprechenden NaCl-Gruppe keinen additiven Effekt in Bezug auf die Rezeptoranzahl. Bei sham-immobilisierten Muskeln kam es nach der Inflammation hingegen zu einer signifikanten Azetylcholinrezeptoren-Hochregulierung sowie zu Succinylcholin-induzierten Kontraktionen. Die Effektivitätsdosen von Succinylcholin waren am operierten Bein der C.p.-Tiere verglichen mit den entsprechenden NaCl-Tieren nicht signifikant verringert. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine chronisch systemische Inflammation in Kombination mit einer geringfügigen, normalerweise irrelevanten Schädigung wie der Sham-Immobilisierung durchaus zu einer klinisch apparenten Zunahme der Azetylcholinrezeptoren führen kann. Inflammation ist somit sicher ein wichtiger Modulator der vermehrten Azetylcholinrezeptor-

Expression und kann auch eigenständig die Hochregulierung auslösen. Ob es jedoch nach alleiniger Inflammation zu einer klinisch relevanten Erhöhung der Rezeptoranzahl kommen kann, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

Im Gegensatz hierzu führt die Immobilisation eines Hinterlaufs zu signifikant reduzierten Effektivitätsdosen sowie signifikant erhöhten Azetylcholinrezeptoren.

Systemische Auswirkungen der Immobilisation, die sich am nicht operierten Bein widerspiegeln würden, konnten wir nicht nachweisen. Interessanterweise löste die Gabe von Succinylcholin signifikante muskuläre Kontraktionen am operierten Bein beider immobilisierten Gruppen, sowie der schein-immobilisierten C.p.-Gruppe aus. Diese Kontraktionen konnten am nicht operierten Bein nicht beobachtet werden. Solche muskulären Kontraktionen nach Anwendung von Succinylcholin wurden erstmals in den späten 70er Jahren an einer Gruppe junger Männer nach traumatischer Nervenläsion an einer Extremität beobachtet (Baraka, 1978, S. 195, Lee, 1977, S. 475). Da diese Kontraktionen auch nach kompletter Blockade der neuromuskulären Endplatte - im Versuch durch das Verschwinden der muskulären Antwort auf die elektrische Stimulation des N. ischiadicus erkennbar – durch weitere Succinylcholin-Boli hervorgerufen werden konnten, sind präsynaptische und synaptische Mechanismen sehr unwahrscheinlich. Mögliche postsynaptische Mechanismen sind unter anderem Veränderungen der Rezeptoraffinität beziehungsweise der intrinsischen Aktivität von Succinylcholin, oder aber eine relevante Hochregulation extrajunktionaler Azetylcholinrezeptoren. Yost et al. konnten in der Affinität von Succinylcholin zur Bindungsstelle keinen Unterschied zwischen juvenilen und adulten Rezeptor-Subtypen feststellen, Succinylcholin zeigte aber an den juvenilen Subtypen eine verringerte intrinsische Aktivität (Yost, 1997, S. 45). Im Unterschied zu den Faszikulationen des gesunden Muskels nach Succinylcholininjektion lassen sich die Succinylcholin-

induzierten Kontraktionen dadurch erklären, dass die nach Immobilisation auftretende vermehrte Expression und die ubiquitäre Verteilung der Azetylcholinrezeptoren auf der gesamten Zelloberfläche (Suliman, 1997, S. 2822) zu einer erhöhten relativen Bindungswahrscheinlichkeit von Succinylcholin führt. Dadurch kommt es in einem zeitlich engeren Abstand zur Erregung mehrerer Muskelfasern. Die einzelnen Muskelaktionspotentiale verschmelzen somit zu den von uns beobachteten Succinylcholin-induzierten Kontraktionen. Durch die extrajunktionale Verteilung der Rezeptoren können diese Kontraktionen auch bei einer vollständig blockierten neuromuskulären Endplatte ausgelöst werden.

Hochregulierte Azetylcholinrezeptoren erklären auch die nach Succinylcholininjektion auftretenden hyperkaliämischen Reaktionen. In unserer Studie blieb eine hyperkaliämische Reaktion nach Succinylcholin allerdings in allen Gruppen aus. Hierfür gibt es mindestens vier mögliche Ursachen: Die wichtigste ist unserer Meinung nach der geringere Anteil der betroffenen Muskulatur. In diesem Modell wurde lediglich ein Hinterlauf immobilisiert. Das Ausmass der Hyperkaliämie ist aber unter anderem von der betroffenen Muskelmasse abhängig. Ein weiterer möglicher Grund ist, dass in diesem Versuch das Succinylcholin auf mehrere Boli verteilt nach Wirkung titriert und nicht wie im klinischen Gebrauch üblich als über das Körpergewicht errechnete Einmaldosis appliziert wurde. Das Spülen der Infusionsleitung mit 0,4 ml einer 0,9% NaCl-Lösung nach jedem Bolus hat durch den Verdünnungseffekt in diesem Experiment die Erhöhung des Serum-Kaliums weiter minimiert. Zuletzt bleibt noch zu erwähnen, dass das Blut zur Bestimmung des Serum-Kaliums direkt nach Gabe des letzten Succinylcholin-Bolus abgenommen wurde. In anderen Studien sahen Yanez et al. den maximalen Kaliumwert erst nach 5 Minuten



(Yanez, 1996, S. 387), sodass die von uns gemessenen Serumkaliumspiegel eventuell nicht die Maximalspiegel repräsentieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine chronisch systemische Inflammation alleine eine Hochregulation von Azetylcholinrezeptoren auslösen kann. Diese Hochregulation wird jedoch pharmakodynamisch erst apparent, wenn eine weitere Schädigung, wie z.B. Sham-Immobilisation, hinzukommt. Die immobilisationsbedingte Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren ist in unserem Modell der Hauptfaktor für eine veränderte Pharmakodynamik von Succinylcholin.

## 6. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Während bei immobilisierten Patienten die Succinylcholingabe wegen möglicher Hyperkaliämien kontraindiziert ist, wird bei systemischer Inflammation die Anwendung kontrovers diskutiert. Ziel dieser Studie ist, bei Ratten die Auswirkungen von Immobilisation und Inflammation isoliert oder in Kombination auf die Pharmakodynamik von Succinylcholin und die Expression von muskulären Azetylcholinrezeptoren zu untersuchen.

**Methoden:** Nach Zustimmung der Tierschutzkommission erhielten 55 männliche CD Ratten entweder *Corynebakterium parvum* (C.p.) oder Kochsalzlösung (NaCl) am Tag 0, 4, und 8 i.v. injiziert. Beide Gruppen wurden weiter unterteilt: eine Subgruppe erhielt einen Hinterlauf (operiertes Bein) mittels Spickdrähten immobilisiert (Immo), in der zweiten Subgruppe wurde der Spickdraht direkt nach dem Einbringen wieder entfernt (Sham). Das jeweilige kontralaterale Bein (nicht operiertes Bein) diente als Kontrolle. Am Tag 12 wurde mittels kumulativer Dosis-Wirkung-Methode die individuelle Effektivitäts-Dosis von Succinylcholin bestimmt. Kalium,  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein und Plasma-Cholinesterase wurden im Serum, die Acetylcholinrezeptoren im M. tibialis cranialis bestimmt. Die Werte wurden mittels faktorieller ANOVA verglichen ( $p < 0,05$ ).

**Ergebnisse:** 12 Tiere starben nach C.p.-Injektion, 3 Tiere waren insuffizient immobilisiert und vom Versuch ausgeschlossen. Eine chronische systemische Inflammation alleine kann eine Hochregulation von Azetylcholinrezeptoren bewirken (Azetylcholinrezeptoren „nicht operiertes Bein“ [fmol/mg Protein]; \*  $p < 0,05$  verglichen mit entsprechender NaCl-Gruppe: NaCl & Sham  $46 \pm 16$ ; NaCl & Immo  $49 \pm 15$ ; C.p. & Sham  $77 \pm 26^*$ ; C.p. & Immo  $85 \pm 47^*$ ) ohne dadurch die Pharmakodynamik von Succinylcholin signifikant zu verändern

(ED<sub>50</sub> „nicht operiertes Bein“ [mg/kg]: NaCl & Sham 0,25 ± 0,17; NaCl & Immo 0,18 ± 0,07; C.p. & Sham 0,22 ± 0,12; C.p. & Immo 0,20 ± 0,07). Immobilisation führte zu signifikant verringerten Effektivitätsdosen (ED<sub>50</sub> „operiertes Bein“ [mg/kg]; \* p<0,05 verglichen mit entsprechender Sham-Gruppe: NaCl & Sham 0,29 ± 0,18; NaCl & Immo 0,13 ± 0,04\*; C.p. & Sham 0,18 ± 0,05; C.p. & Immo 0,14 ± 0,04\*) als Ausdruck einer Sensibilisierung gegenüber Succinylcholin durch hochregulierte Azetylcholinrezeptoren (Azetylcholinrezeptoren „operiertes Bein“ [fmol/mg Protein]; \* p<0,05 verglichen mit NaCl & Sham: NaCl & Sham 47 ± 10; NaCl & Immo 391 ± 205\*; C.p. & Sham 175 ± 101\*; C.p. & Immo 564 ± 371\*). Die Kombination von Immobilisation mit Inflammation hatte keinen signifikanten zusätzlichen Effekt. Succinylcholin löste am operierten Bein beider C.p.-Gruppen, sowie der immobilisierten NaCl-Gruppe signifikante muskuläre Kontraktionen aus (Succinylcholin-induzierte Kontraktionen „operiertes Bein“ [mN]; \* p<0,05 verglichen mit NaCl & Sham: NaCl & Sham 5 ± 15; NaCl & Immo 121 ± 49\*; C.p. & Sham 67 ± 63\*; C.p. & Immo 139 ± 119\*), die höchstwahrscheinlich durch extrajunktionale Rezeptoren verursacht werden. Eine hyperkaliämische Reaktion blieb in diesem Versuch jedoch in allen Gruppen aus.

**Schlussfolgerung:** Chronische systemische Inflammation allein kann eine Hochregulierung von Azetylcholinrezeptoren auslösen. Wenn zur Inflammation eine geringfügige andere Schädigung hinzukommt, kann es durch die hochregulierten Azetylcholinrezeptoren zur Entstehung Succinylcholin-induzierter Kontraktionen ohne signifikanten Effekt auf die Effektivitätsdosen kommen. In diesem Modell war Immobilisation der Hauptfaktor für eine veränderte Pharmakodynamik von Succinylcholin und eine vermehrte Azetylcholinrezeptor-Expression.

## 7. Bibliographie

- 1 **Baraka, A.:** Suxamethonium-induced muscle contracture following traumatic denervation in man, *Br J Anaesth* 50 (1978): 195-199
- 2 **Baur, H., Kohlschütter, B., Roth, F.:** Hyperkaliämie nach Succinylcholin bei septischen Patienten der Abdominalchirurgie, *Anaesthesist* 25 (1976): 6-9
- 3 **Blobner, M., Kochs, E., Fink, H., Mayer, B., Veihelmann, A., Brill, T., Stadler, J.:** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vecuronium in rats with systemic inflammatory response syndrome: treatment with N(G)-monomethyl- L-arginine, *Anesthesiology* 91 (1999): 999-1005
- 4 **Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C., Brann, M.R.:** Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes, *Science* 237 (1987): 527-532
- 5 **Brett, R.S., Schmidt, J.H., Gage, J.S., Scharfel, S.A., Poppers, P.J.:** Measurement of acetylcholine receptor concentration in skeletal muscle from a patient with multiple sclerosis and resistance to atracurium, *Anesthesiology* 66 (1987): 837-839
- 6 **Cummins, C.S., Johnson, J.L.:** *Corynebacterium parvum*: a synonym for *Propionibacterium acnes*?, *J Gen Microbiol* 80 (1974): 433-442
- 7 **Dodson, B.A., Kelly, B.J., Braswell, L.M., Cohen, N.H.:** Changes in acetylcholine receptor number in muscle from critically ill patients receiving muscle relaxants: an investigation of the molecular mechanism of prolonged paralysis, *Crit Care Med* 23 (1995): 815-821
- 8 **Farquhar, D., Benvenuto, J.A., Kuttesch, N., Li Loo, T.:** Inhibition of hepatic drug metabolism in the rat after *corynebacterium parvum* treatment, *Biochem Pharmacol* 32 (1983): 1275 -1280
- 9 **Fink, H., Luppia, P., Mayer, B., Rosenbrock, H., Metzger, J., Martyn, J.A., Blobner, M.:** Systemic inflammation leads to resistance to atracurium without increasing membrane expression of acetylcholine receptors, *Anesthesiology* 98 (2003): 82-88
- 10 **Fish, D.N., Singletary, T.J.:** Cross-resistance to both atracurium- and vecuronium-induced neuromuscular blockade in a critically ill patient, *Pharmacotherapy* 17 (1997): 1322-1327
- 11 **Gronert, G.A., Theye, R.A.:** Pathophysiology of hyperkalemia induced by succinylcholine, *Anesthesiology* 43 (1975): 89-99
- 12 **Gronert, G.A.:** Succinylcholine hyperkalemia after burns, *Anesthesiology* 91 (1999): 320-322
- 13 **Hogue, C.W. Jr., Itani, M.S., Martyn, J.A.:** Resistance to d-tubocurarine in lower motor neuron injury is related to increased acetylcholine receptors at the neuromuscular junction, *Anesthesiology* 73 (1990): 703-709
- 14 **Hogue, C.W. Jr., Ward, J.M., Itani, M.S., Martyn, J.A.:** Tolerance and upregulation of acetylcholine receptors follow chronic infusion of d-tubocurarine, *J Appl Physiol* 72 (1992): 1326-1331
- 15 **Hughes, M., Grant, I.S., Biccard, B., Nimmo, G.:** Suxamethonium and critical illness polyneuropathy, *Anaesth Intensive Care* 27 (1999): 636-638
- 16 **Ibebunjo, C., Nosek, M.T., Itani, M.S., Martyn, J.A.:** Mechanisms for the paradoxical resistance to d-tubocurarine during immobilization-induced muscle atrophy, *J Pharmacol Exp Ther* 283 (1997): 443-451
- 17 **Ibebunjo, C., Martyn, J.A.:** Fiber atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization, *Crit Care Med* 27 (1999): 275-285

- 18 **Khan, T.Z., Khan, R.M.:** Changes in serum potassium following succinylcholine in patients with infections, *Anesth Analg* 62 (1983): 327-331
- 19 **Kim, C., Martyn, J., Fuke, N.:** Burn injury to trunk of rat causes denervation-like responses in the gastrocnemius muscle, *J Appl Physiol* 65 (1988): 1745-1751
- 20 **Knüttgen, D., Jahn, M., Zeidler, D., Doehn, M.:** Atracurium during thoracic surgery: impaired efficiency in septic processes, *J Cardiothorac Vasc Anesth* 13 (1999): 26-29
- 21 **Kohlschütter, B., Baur, H., Roth, F.:** Suxamethonium-induced hyperkalaemia in patients with severe intra-abdominal infections, *Br J Anaesth* 48 (1976): 557-562
- 22 **Lee, C., Yang, E., Katz, R.L.:** Focal contracture following injection of succinylcholine in patients with peripheral nerve injury, *Can Anaesth Soc J* 24 (1977): 475-478
- 23 **Martyn, J., Goldhill, D.R., Goudsouzian, N.G.:** Clinical pharmacology of muscle relaxants in patients with burns, *J Clin Pharmacol* 26 (1986): 680-685
- 24 **Martyn, J.A., White, D.A., Gronert, G.A., Jaffe, R.S., Ward, J.M.:** Up-and-down regulation of skeletal muscle acetylcholine receptors. Effects on neuromuscular blockers, *Anesthesiology* 76 (1992): 822-843
- 25 **Metzger, J., Blobner, M., Luppa, P.B.:** Sensitive chemiluminescence immunoassay for the determination of rat serum alpha1-acid glycoprotein, *Clin Chem Lab Med* 39 (2001): 514-518
- 26 **Pavlin, E.G., Haschke, R.H., Marathe, P., Slattery, J.T., Howard, M.L., Butler, S.H.:** Resistance to atracurium in thermally injured rats. The roles of time, activity, and pharmacodynamics, *Anesthesiology* 69 (1988): 696-701
- 27 **Peralta, E.G., Ashkenazi, A., Winslow, J.W., Smith, D.H., Ramachandran, J., Capon, D.J.:** Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors, *Embo J* 6 (1987): 3923-3929
- 28 **Pestronk, A., Drachman, D.B., Griffin, J.W.:** Effect of muscle disuse on acetylcholine receptors, *Nature* 260 (1976): 352-353
- 29 **Rees, D. D., Cunha, F. Q., Assreuy, J., Herman, A. G., Moncada, S.:** Sequential induction of nitric oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse, *Br J Pharmacol* 114 (1995): 689-93
- 30 **Scheller, M., Bufler, J., Schneck, H., Kochs, E., Franke, C.:** Isoflurane and sevoflurane interact with the nicotinic acetylcholine receptor channels in micromolar concentrations, *Anesthesiology* 86 (1997): 118-127
- 31 **Suliman, I.A., Lindgren, J.U., Gillberg, P.G., Diab, K.M., Adem, A.:** Effect of immobilization on skeletal muscle nicotinic cholinergic receptors in the rat, *Neuroreport* 8 (1997): 2821-2824
- 32 **Tobey, R.E.:** Paraplegia, succinylcholine and cardiac arrest, *Anesthesiology* 32 (1970): 359-364
- 33 **Tomera, J.F., Martyn, J.J.:** Intraperitoneal endotoxin but not protein malnutrition shifts d-tubocurarine dose-response curves in mouse gastrocnemius muscle, *J Pharmacol Exp Ther* 250 (1989): 216-220
- 34 **Utkin Yu, N., Tsetlin, V.I., Hucho, F.:** Structural organization of nicotinic acetylcholine receptors, *Membr Cell Biol* 13 (2000): 143-164
- 35 **Ward, J.M., Martyn, J.A.:** Burn injury-induced nicotinic acetylcholine receptor changes on muscle membrane, *Muscle Nerve* 16 (1993): 348-354

- 36 **Ward, J.M., Rosen, K.M., Martyn, J.A.:** Acetylcholine receptor subunit mRNA changes in burns are different from those seen after denervation: the 1993 Lindberg Award, *J Burn Care Rehabil* 14 (1993): 595-601
- 37 **Yanez, P., Martyn, J.A.:** Prolonged d-tubocurarine infusion and/or immobilization cause upregulation of acetylcholine receptors and hyperkalemia to succinylcholine in rats, *Anesthesiology* 84 (1996): 384-391
- 38 **Yost, C.S., Winegar, B.D.:** Potency of agonists and competitive antagonists on adult- and fetal-type nicotinic acetylcholine receptors, *Cell Mol Neurobiol* 17 (1997): 35-50

## 8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eberhard Kochs, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München, für die zur Verfügung gestellten Rahmenbedingungen und die Unterstützung bei diesem und weiteren Forschungsprojekten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner, Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München für den Einstieg in die anaesthesiologische Forschung und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Heidrun Fink für die geduldige Einführung in den Versuch und die umfassende und sehr gute Betreuung und Hilfe während der Arbeit und meinem Mitstreiter Christoph Unterbuchner für das Durchhalten und so manche aufmunternde Worte.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. J. A. Jeevendra Martyn und Christiane Frick vom Massachusetts General Hospital der Harvard Medical School Boston für die Ermöglichung der Azetylcholinrezeptorbestimmung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Mr. Mponda Banda, Nkhotakota, Malawi, der mir während einer Famulatur sehr früh in meinem Studium das von ihm gelebte und mein ärztliches Handeln entscheidend prägende Eingangszitat mit auf den Weg gab.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meiner Frau, die immer an mich geglaubt, mich immer unterstützt und gefördert haben.

## **9. Lebenslauf**

Name: Marc Helming  
Geburtsdatum / -ort: 21. Juni 1973 in Lingen/Ems  
Familienstand: verheiratet

### **1. Schulbildung:**

1979 – 1983 Dreifaltigkeits-Grundschule, Münster  
Wartburg-Grundschule, Münster  
1983 – 1993 Lessing-Gymnasium, Mannheim  
Alexander von Humboldt Schule, Viernheim (Abitur: Note 3,2)

### **2. Universität:**

1995 – 1997 Vorklinik: Ludwig Maximilian Universität München  
1997 – 2001 Klinik: Ludwig Maximilian Universität München  
Staatsexamina: Erstes medizinisches Staatsexamen: 1998  
Zweites medizinisches Staatsexamen: 2000  
Drittes medizinisches Staatsexamen: 2001  
seit Juli 2002 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt  
Klinik für Anaesthesiologie  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München