

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

Muskelfunktion in der Erholungsphase nach Critical Illness Myopathie - der Effekt von Immobilisation und Inflammation anhand eines Rattenmodells

Serkan Buyar

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. E. Kochs

Die Dissertation wurde am 24.02.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.05.2010 angenommen.

*„Alles, was Du heute lernst und kannst,
wird Dir morgen keiner mehr nehmen können“*

Mein Vater

*Für meine Eltern,
meinen Bruder Hakan
und
meine Yasemin*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Myopathien	6
1.1.1. Systematik.....	6
1.1.2. Risikofaktoren für Muskelschwäche bei Intensivpatienten	7
1.2. Neuromuskuläre Erkrankung bei Intensivpatienten.....	8
1.2.1. Critical Illness Polyneuropathie.....	8
1.2.2. Critical Illness Myopathie.....	8
1.3. Neuromuskuläre Übertragung.....	10
1.4. Azetylcholinrezeptor.....	10
1.5. Muskelfunktion	11
1.6. Erholung der Muskelfunktion	12
1.7. Stimulationsmuster	13
2. Zielsetzung der Arbeit	14
3. Versuchstiere und Methoden	15
3.1. Versuchstiere.....	15
3.2. Tiermodell.....	15
3.2.1. Inflammation.....	15
3.2.2. Immobilisation	16
3.2.3. Erholungszeitraum	16
3.3. Studienprotokoll.....	17
3.4. Anästhesie zum Versuch.....	20
3.4.1. Narkose	20
3.4.2. Monitoring	21
3.5. Instrumentierung	22
3.5.1. Gelenksfixation	22
3.5.2. Injektion	23
3.5.3. Drahtentfernung	23
3.5.4. Venöse und arterielle Kanülierung am Messtag	24
3.5.5. Neuromuskuläre Messung	24

3.6.	Versuchsablauf.....	26
3.7.	Statistik	28
4.	Ergebnisse	29
4.1.	Inflamationsparameter	29
4.2.	Immobilisationsparameter.....	32
4.3.	Modellstabilität	33
4.4.	Expression des Azetylcholinrezeptors	33
4.5.	Kontraktionsparameter.....	35
4.5.1.	Maximale Einzelkontraktionskraft.....	35
4.5.2.	Spezifische Einzelkontraktionskraft	36
4.5.3.	Maximale tetanische Kraft.....	37
4.5.4.	Spezifische tetanische Kraft.....	39
5.	Diskussion.....	41
6.	Zusammenfassung	45
7.	Bibliographie	47
8.	Danksagung	50
9.	Lebenslauf.....	51

Abkürzungsverzeichnis

α_1 -AGP:	α_1 -saures Glykoprotein
ARDS:	Acute Respiratory Distress Syndrome
BE:	Basenexzess
BGA:	Blutgasanalyse
CIM:	Critical Illness Myopathie
CIP:	Critical Illness Polyneuropathie
C.p.:	Corynebacterium parvum Bakterien
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
FiO ₂ :	inspiratorischer Sauerstoffanteil
Hb:	Hämoglobin
Hz:	Hertz
Immob:	Immobilisation
KG:	Körpergewicht
M.:	Musculus
MetHb:	Methämoglobin
N:	Newton
NaCl:	Natriumchlorid (Kochsalz)
Kontroll-Bein:	nicht-operiertes Bein
Op-Bein:	Operationsbein
paCO ₂ :	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
paO ₂ :	arterieller Sauerstoffpartialdruck
Sham:	Sham-Immobilisation
SIRS:	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TIVA:	Total intravenöse Anästhesie

1. Einleitung

1.1. Myopathien

1.1.1. Systematik

Myopathien sind teils hereditäre, teils erworbene Systemerkrankungen der Muskulatur. Von Myopathie spricht man beim Auftreten der Kardinalsymptome Muskelschwäche und Muskelatrophie. Der Begriff „Muskelschwäche“ wird in der Literatur aber oft mit Myopathie gleichgesetzt.

Die häufigste Form der erbten Myopathie ist die progressive Muskeldystrophie vom Typ Duchenne. Hierbei handelt es sich um eine X-chromosomal-rezessiv vererbte Krankheit, bei der zuerst die Beckengürtel-Oberschenkel-Muskulatur befallen wird und die meist im zweiten Lebensjahrzehnt zur Immobilisation führt.

Die häufigste erworbene Myopathie ist die Polymyositis, eine akut oder subakut auftretende Muskelkrankheit. Bevorzugt finden sich bei diesen Patienten proximal betonte Paresen der Extremitäten unter Einschluss der Nacken- und Pharynxmuskulatur. Die Ursachen sind noch nicht vollständig bekannt, es werden aber Immunreaktionen vermutet (Classen 2004, S. 1804-1805).

Eine weitere Patientengruppe bei denen es oft zu erworbener Myopathie kommt sind Intensivpatienten. Sehr unterschiedliche Risikofaktoren, z.B. Immobilisation, Sepsis sowie verschiedene Medikamente (z.B. Muskelrelaxantien oder Steroide) können hier zu einer Muskelschwäche führen. Eine Mitbeteiligung des peripheren Nervensystems wird als Critical Illness Polyneuropathie (CIP) bezeichnet (Bolton 1996, S. 1408-1416). Hierbei können motorische oder sensible Fasern sowohl einzeln als auch kombiniert geschädigt werden, wobei die motorischen Bahnen häufiger betroffen sind (Fletcher

2003, S. 1012-1016). Ist nur die Muskulatur betroffen, so spricht man von der Critical Illness Myopathie (CIM) (Hund 1999, S. 2544-2547).

Die Critical Illness Myopathie und die Critical Illness Polyneuropathie treten aber oft zusammen auf und lassen sich daher häufig nicht klar voneinander abgrenzen. Aus diesem Grund entstand in jüngerer Zeit der Begriff Critical Illness Polyneuromyopathie (CIPM), der beide Krankheitsbilder zusammenfasst (Op de Coul 1991, S. 27-33).

1.1.2. Risikofaktoren für Muskelschwäche bei Intensivpatienten

Ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung einer CIP oder CIM ist die Sepsis bzw. die systemische Inflammationsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome = SIRS). Bei der Sepsis handelt es sich um eine den primären Herd überschreitende, systemische Entzündungsreaktion als Antwort auf eine Infektion. SIRS hingegen entwickelt sich unabhängig von einer Infektion als generalisierte, überschießende Immunantwort auf einen geeigneten Reiz, wie z.B. Verbrennung, Trauma, große Operationen, aber auch Infektion. De Letter et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass bei einer SIRS die Inzidenz für CIP um 70% steigt (De Letter 2001, S. 2281-2286).

Die kontinuierliche Gabe von Corticosteroiden und Muskelrelaxantien erhöht bei Intensivpatienten das Risiko einer CIM (Bolton 2005, S. 140-163). Behbehani et al. konnten in ihrer retrospektiven Studie beweisen, dass Muskelrelaxantien signifikant die Inzidenz für eine Myopathie erhöhen (Behbehani 1999, S. 1627-1631).

Auch eine längerfristige Immobilisation der Patienten führt zu einer Muskelschwäche. Die genauen molekularen Mechanismen sind zwar noch nicht erforscht, doch spielt eine Permeabilitätsstörung am Sarkolemm laut Gianelli et al. eine wichtige Rolle. Durch Diffusionsstörungen kommt es zu Proteinverschiebungen, die durch Proteinkatabolismus eine Muskelatrophie verursachen. So zeigten Gianelli et al. in

ihrem Rattenmodell, dass nach 2 Wochen Immobilisation die Muskelmasse an Mm. Soleus und Gastrocnemius signifikant abgenommen hatte (Giannelli 2005, S. 99-106).

1.2. Neuromuskuläre Erkrankung bei Intensivpatienten

1.2.1. Critical Illness Polyneuropathie

Von CIP spricht man beim Zusammentreffen von Schwächegefühl mit reduzierten oder nicht vorhandenen Muskeleigenreflexen im Rahmen einer Intensivtherapie. Die CIP tritt bei 58% bis 96% der Patienten auf, die länger als 28 Tage auf einer Intensivstation behandelt werden und ist somit eine häufig auftretende Komplikation. Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer CIP sind Sepsis, SIRS, Multiorganversagen sowie ein längerer Intensivaufenthalt. Als Folge der Muskelschwäche verlängert sich die Rehabilitationsphase. Die Mobilisation ist erschwert und die Patienten klagen über Schwäche und frühzeitige Ermüdung der Muskulatur, die teilweise bis zu vier Jahre nach dem Intensivaufenthalt noch nachweisbar ist. Bei über 90% der Patienten lassen sich auch fünf Jahre nach einer CIP oder nach einer motorischen Neuropathie neurophysiologische Zeichen einer chronischen Teildeneration nachweisen (Fletcher 2003, S. 1012-1016). Bei der CIP sind oft die motorischen Bahnen betroffen, weshalb es zu symmetrisch angeordneten, distal betonten, schlaffen Paresen der Extremitätenmuskulatur kommt, die bei einigen Betroffenen in einer Tetraplegie münden können (Lindner 2000, S. 455-469).

1.2.2. Critical Illness Myopathie

Die CIM wurde das erste Mal 1987 von Bolton als eigenständige Erkrankung beschrieben (Bolton 1987, S. 129-135). Definitionsgemäß spricht man von einer CIM bei Patienten, die eine Muskelschwäche erst nach der Aufnahme auf die Intensivstation

entwickeln. Sie tritt bei 20-50% aller Intensivpatienten auf, die länger als eine Woche beatmet werden müssen und führt zu einer Muskelschwäche der Extremitäten. Die Entwöhnung von der Beatmung ist bei diesen Patienten durch Beteiligung der Atem- und Atemhilfsmuskulatur erschwert. Pathogenetische Faktoren der CIM sind Immobilisation und Inflammation. Zudem kann die Entstehung einer CIM auch durch Muskelrelaxantien und Corticosteroide hervorgerufen werden. Allerdings werden diese Medikamente heutzutage in der Intensivmedizin eher zurückhaltend eingesetzt und bleiben speziellen Indikationen vorbehalten (Bolton 2005, S. 140-163). Die Arbeit von Fink et al. zeigte bereits, dass Immobilisation und systemische Inflammation jeweils einzeln und unabhängig voneinander zu einer Muskelschwäche und Hochregulation von Azetylcholinrezeptoren führen (Fink 2008, S. 910-916).

Herridge et al. untersuchten die Erholung der Muskelschwäche bei Patienten mit „Akutem Atemnotsyndrom“ (engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome = ARDS) über einen Zeitraum von einem Jahr nach Aufenthalt auf einer Intensivstation. In der Arbeit sollte gezeigt werden, dass ein längerer Intensivaufenthalt zu Symptomen der CIM führt und die Patienten selbst nach einer Erholungsphase noch muskuläre Defizite haben. Diese Defizite wurden mit einem standardisierten 6-Minuten-Gehtest nach je 3, 6 und 12 Monaten untersucht. Sowohl 3, 6 als auch 12 Monate nach Verlassen der Intensivstation schafften die Patienten beim 6-Minuten-Gehtest geringere Distanzen als angenommen. Zusätzlich wurde auch die periphere Sauerstoffsättigung der Patienten gemessen. Diese fiel selbst nach einem Jahr bei einigen Patienten während der Belastung auf unter 88 % (Herridge 2003, S. 683-693). Die Entwicklung einer Polyneuropathie oder Myopathie im Rahmen einer Intensivtherapie spielt somit eine wesentliche Rolle für eine prolongierte Rehabilitationsphase.

1.3. Neuromuskuläre Übertragung

Eine motorische Einheit setzt sich zusammen aus einem Motoneuron 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. Erreicht ein Aktionspotential des Axons das präterminale Nervenende, 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 die postsynaptischen Azetylcholinrezeptoren der Muskeloberfläche. Diese Bindung des Azetylcholin 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 Muskelmembran, welche ihrerseits ein Muskelmembranpotential auslösen. Durch eine nachfolgende Kaskade an zellulären Prozessen kommt es schlussendlich zu einer Kontraktion des Muskels (Martyn 1992, S. 822-843).

1.4. 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. 527-532). Alle muskarinischen Azetylcholinrezeptoren weisen unterschiedliche pharmakologische und funktionelle Eigenschaften auf. So sind beispielsweise im zentralen Nervensystem muskarinische Rezeptoren in eine Vielzahl

vegetativer, sensorischer und motorischer Prozesse involviert (Peralta 1987, S. 3923-3929).

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 α - und β - Untereinheiten in einer zwei zu drei Stoichiometrie ($\alpha_2\beta_n$) aufgebaut. Es gibt mindestens sieben verschiedene neuronale α - Untereinheiten ($\alpha_2 - \alpha_8$) und drei neuronale β -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. 143-164).

1.5. Muskelfunktion

Ein Sarkomer hat eine Länge von 2 μm und ist die kleinste funktionelle Einheit eines Muskels. Begrenzt wird dieses durch zwei zur Zugrichtung senkrecht stehende Z-Scheiben. An diesen hängen jeweils Aktin-Filamente, die sich nicht direkt berühren, sondern über Myosin-Filamente indirekt in Kontakt stehen. Durch die Spaltung von Adenosintriphosphat in anorganisches Phosphat und Adenosindiphosphat kommt es zum Abkippen einzelner Myosin-Elemente, wodurch sich die Aktin-Filamente aneinander nähern. Damit verkürzt sich das Sarkomer und es entsteht so letztendlich eine Kontraktion des Muskels. Durch anschließenden Verbrauch von Energie in Form von Adenosintriphosphat lösen sich die Myosinköpfe wieder und kehren in den

ursprünglichen Ruhezustand zurück. Somit sind die Muskelfasern bereit zu einer erneuten Kontraktion. (Schwegler 2002, S. 33-36).

1.6. Erholung der Muskelfunktion

Wie oben bereits beschrieben können Immobilisation und Inflammation zu Myopathien führen. Daher werden diese beiden Faktoren sowohl einzeln als auch kombiniert untersucht. Inwieweit diese beiden Faktoren aber Auswirkungen auf die Erholung der Muskelfunktion haben, soll in unserem Modell untersucht werden.

Im Erholungsmodell nach Immobilisation von Zarzhevsky et al. wurde einer Gruppe von Ratten das Knie über einen externen Fixateur für 4 Wochen ruhig gestellt und anschließend die Daten erhoben. Eine weitere Gruppe erhielt im Anschluss an die Immobilisation eine vier wöchige Erholungsphase. Die Muskelmasse nahm in der ersten Gruppe im Betrachtungszeitraum um bis zu 60% an Gewicht ab. Selbst nach der vierwöchigen Erholungsphase waren die Werte noch signifikant erniedrigt (Zarzhevsky 1999, S. 896-901).

In einem Inflammationsmodell von Minnaard et. al wurde Ratten einmalig Zymosan intraperitoneal injiziert. Die Tiere entwickelten nach einer chemischen Peritonitis eine systemische Inflammationsreaktion (SIRS). Die Inflammations- und Erholungsphase wurde 11 Tage lang beobachtet. Nach 6 Tagen zeigten die mit Zymosan behandelten Tiere eine signifikante Reduktion der Muskelmasse des M. tibialis anterior gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe, die aber nach 11 Tagen nicht mehr zu erkennen war. Ebenso verhielt es sich mit dem Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechsel, der als wichtiger intrazellulärer Proteinkatabolismus fungiert. Dieser erreichte nach 11 Tagen ebenfalls Ausgangswerte zurück (Minnaard 2005, S. 2217-2225).

1.7. Stimulationsmuster

Durch den Einsatz von Nervenstimulation und Messung der daraus resultierenden Muskelkontraktion lassen sich Muskelkraft und bestehende neuromuskuläre Blockaden erfassen. Der Muskel und der dazugehörige Nerv bilden eine motorische Einheit. Nicht jeder elektrische Reiz ruft aber eine Muskelkontraktion hervor, denn die Muskelantwort folgt der Alles-oder-Nichts-Regel. Eine bestimmte Reizschwelle muss überschritten werden, damit es zu einem Natrium-Einstrom und letztendlich zur Einzelkontraktion der Muskelzelle kommt. Die Skelettmuskulatur kann im Gegensatz zur Herz- und glatten Muskulatur neben einer Einzelzuckung auch einen Tetanus hervorrufen. Durch schnelle Abfolge mehrerer Aktionspotenziale und deren Superposition kommt durch dieses Verschmelzen der Einzelkontraktionen eine tetanische Kontraktion zustande. Ein Muskel kann aber nicht unbegrenzt belastet werden. Denn schon nach kurzer Zeit kommt es zur Ermüdung des Muskels, einhergehend mit einem Verbrauch der Adenosintriphosphat-Reserven, weil der Muskel nicht die Möglichkeit erhält, sich zwischen den einzelnen Kontraktionen zu erholen und die Adenosintriphosphatreserven aufzufüllen. Erst durch erneute Sauerstoffaufnahme und Adenosintriphosphat-Rückgewinnung kommt es zur Regenerierung und somit zur Erholung des Muskels. (Silbernagel 2003, S. 104-106).

Neben diesen beiden physiologischen Stimulationsmustern, gibt es auch rein experimentelle bzw. klinische Untersuchungsmuster, unter anderem den „Train of Four“. Es besteht aus einer Serie von 4 Einzelreizen, die mit einer Frequenz von 2 Hz aufeinanderfolgen (Ali 1971, S. 473-477) (Ali 1971, S. 478-485). Das „Train of Four“ ist daher im klinischen Alltag mittlerweile eine der gebräuchlichsten Methoden zum neuromuskulären Monitoring.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Erholung der Muskelfunktion nach 12-tägiger Immobilisation und Inflammation jeweils isoliert sowie in Kombination zu untersuchen.

Dabei wurden folgende Fragen bearbeitet:

- 1) Wie verändert eine isolierte, systemische Inflammation, eine alleinige Immobilisation oder die Kombination der beiden Faktoren die Kontraktionseigenschaften des Musculus tibialis cranialis während der Erholungsphase? Wirken die beiden Faktoren individuell, synergistisch oder potenzierend auf das muskuläre System?
- 2) Welchen Einfluss haben Inflammation und Immobilisation alleine oder in Kombination auf die Expression der Azetylcholinrezeptoren?
- 3) Welche Veränderungen treten bei Einzelkraftmessungen, wie auch tetanischen Messungen in der Erholungsphase auf?

3. Versuchstiere und Methoden

3.1. Versuchstiere

Nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern (AZ 209.1/ 211-2531-4/ 04) wurden insgesamt 258 männliche Sprague-Dawley Ratten vom Stamm CD (Charles River GmbH Deutschland, Niederlassung Sulzfeld), mit einem Ausgangsgewicht von 170-220 g untersucht. Die Haltung erfolgte in Makrolonkäfigen Typ IV in Gruppen von je maximal fünf Tieren. Eine Akklimatisierungsphase von 7 Tagen vor Versuchsbeginn erlaubte den Tieren die Anpassung an die neue Umgebung, sowie einen mikrobiellen Abgleich untereinander. Die Haltung erfolgte in einem klimatisierten Raum bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden. Raumtemperatur, Lichtintensität, Luftfeuchtigkeit und Luftwechsel wurden kontrolliert und konstant gehalten. Futter (Altromin-Haltung 1324, Altromin GmbH, Lage) und Wasser in Trinkflaschen war den Tieren zu jeder Zeit frei zugänglich.

3.2. Tiermodell

3.2.1. Inflammation

Als Modell der systemischen Inflammation diente die intravenöse Injektion einer Suspension (21mg in einem Gesamtvolumen von 0,6ml) aus hitzeinaktiviertem *Corynebacterium parvum* (Roche, Penzberg). *Corynebacterium parvum* führt zu einer granulomatösen Leberentzündung mit einem Höhepunkt am fünften Tag und einer Gesamtdauer von acht Tagen (Farquhar 1983, S. 1275 -1280). Um eine zwölf Tage anhaltende systemische Inflammation hervorzurufen, wurde die Injektion dreimal im Abstand von jeweils vier Tagen wiederholt. Hierzu wurde die Vena dorsalis penis mit einer 26G-Venenverweilkanüle (26G BD Vasculon™ Plus, Becton Dickinson Infusion

Therapy AB, Helsingborg, Schweden) kanüliert und die *Corynebacterium parvum*-Suspension intravenös appliziert. Im Rahmen der granulomatösen Leberentzündung steigt die Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase an, wodurch vermehrt Stickstoffmonoxid gebildet wird. Dieses Stickstoffmonoxid wiederum führt zu einer Bildung von Methämoglobin (MetHb), welches deshalb als indirekter Verlaufsparemeter für die Inflammation verwendet wurde. Den Ratten, die als Kontrollgruppe dienten, wurde jeden vierten Tag 0,9 %-ige Kochsalzlösung (NaCl) volumenäquivalent zur *Corynebacterium parvum* Gruppe injiziert.

3.2.2. Immobilisation

Als Modell für die Immobilisation eines Hinterlaufs diente die Fixation von Knie- und Sprunggelenk mittels 1mm dicker Kirschner-Drähte. Die Kontinuität der motorischen Einheit bleibt dabei erhalten. Eine isometrische Muskelkontraktion ist weiterhin möglich. Bei der „Sham-Immobilisation“ werden die Kirschner-Drähte direkt nach dem Einbringen wieder entfernt (Ibebunjo 1999, S. 275-285). Die genaue Instrumentierung ist unter 3.5.1. beschrieben.

3.2.3 Erholungszeitraum

Nach einer 12-tägigen Immobilisations-/Inflammationsphase folgte eine Erholungsphase von unterschiedlicher Dauer. Die Kirschner-Drähte wurden am Tag 0 entfernt, bei sham-immobilisierten Ratten wurde eine weitere Sham-Operation durchgeführt. Es wurden keine weiteren Injektionen oder Untersuchungen außer der täglichen Gewichtskontrolle bis zur Messung durchgeführt. Die Tiere wurden randomisiert den verschiedenen Erholungszeiträumen zugeteilt. Die Messung der

Muskelfunktion erfolgte dann an den Tagen 0, 4, 12 oder 36 nach Beginn der Erholungsphase (Vorgehen unter 3.5.5).

3.3. Studienprotokoll

Die Ratten wurden randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Gruppe „Inflammation“ (n=156) erhielt an den Tagen -12, -8 und -4 in Narkose unter Spontanatmung je 21 mg einer Suspension von *Corynebacterium parvum* (Gesamtvolumen je 0,6 ml) intravenös injiziert. Der Gruppe „Schein-Inflammation“ injizierten wir zur Kontrolle 0,6 ml einer isotonischen Kochsalzlösung intravenös (n =102). Beide Gruppen wurden weiter unterteilt: einer Subgruppe wurde an Tag -12 ein Hinterbein mittels Kirschner-Drähten in Knie- und Sprunggelenk immobilisiert (Immobilisation: n = 129), in der zweiten Untergruppe wurden die Kirschner-Drähte direkt nach dem Einbringen wieder entfernt (Sham-Immobilisation: n = 129). Wir bezeichneten sowohl den immobilisierten, als auch den sham-immobilisierten Hinterlauf als Op-Bein. Der nicht-operierte, kontralaterale Hinterlauf diente als Kontrolle (Kontroll-Bein). Vor jeder Injektion wurden den Ratten mittels einer Glaskapillare über die gelegte Venenverweilkanüle 175 µl venösen Blutes abgenommen. Aus der Probe bestimmten wir mit einem Blutgasanalyse-(BGA)-Gerät (Rapidlab 860, Bayer Vital GmbH, Fernwald, Deutschland) den MetHb-Anteil am Gesamthämoglobin. Dieser Wert wurde zur Beurteilung des Entzündungsverlaufs herangezogen. Während der 12-tägigen Immobilisations-/Inflammationsphase wurden die Tiere täglich gewogen, klinisch beurteilt und die Immobilisation auf ihre Stabilität hin überprüft. Nach diesen zwölf Tagen wurden die Tiere vorher festgelegten unterschiedlich langen Erholungsphasen zugeordnet. Zu Beginn der Erholungsphase wurden die Kirschner-Drähte entfernt bzw. die Ratten sham-operiert. Die

immobilisierte Extremität wurde im Anschluss an die Entfernung des Drahtes komplett durchbewegt, um Kontraktionen weitgehend auszuschließen. Nach Beendigung der Corynebacterium parvum Injektionen kam es zu einem Abklingen der Inflammation. In der Erholungsphase erfolgte ebenso eine Kontrolle des Gewichtsverlaufs. Im Anschluss daran wurde an Tag 0, 4, 12 oder 36 (Versuchstag) die Kontraktionskraft des M. tibialis cranialis unter Intubationsnarkose mittels der evozierten Mechanomyographie gemessen.

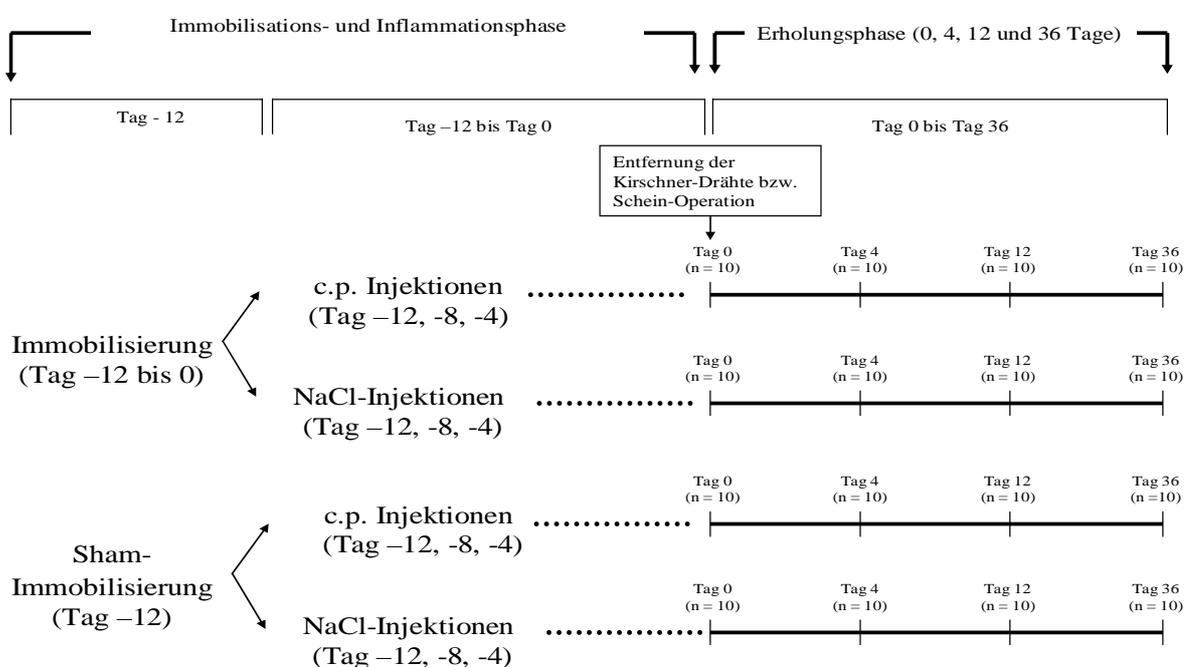


Abb. 1 : Gruppenbildung zum Studienprotokoll

Am Versuchstag wurden folgende in-vivo-Parameter gemessen:

- Einzel- und tetanische Kontraktionskraft
- Blutdruck, Puls, Temperatur, Elektrolyte, Blutgase
- Blutbild

α_1 -AGP wurde im Serum bestimmt. Dies erfolgte durch das Institut für klinische Chemie, Klinikum Rechts der Isar der TU München, mit einem eigens für diese Untersuchung entwickelten sensitiven Chemilumineszenz Immunoassay (Metzger 2001, S. 514-518). Die Expression der Azetylcholinrezeptoren wurde in vitro anhand der ^{125}I - α -Bungarotoxin-Bindung an den M. tibialis cranialis quantifiziert (Ibebunjo 1999, S. 275-285).

Tiere wurden aus dem Versuch ausgeschlossen, wenn sie folgende Kriterien erfüllten:

- Verlust des Körpergewichts im Verlauf der Inflammation um mehr als 30% des Ausgangsgewichtes am Tag -12
- schlechter klinischer Allgemeinzustand
- Lockerung der Gelenksimmobilisation
- Nicht korrigierbare Abweichungen der respiratorischen, hämodynamischen und metabolischen Parameter am Versuchstag (siehe 3.4.2. Monitoring)
- Wundinfektion

55 Tiere verstarben an den Folgen der systemischen Inflammation. Bei neun weiteren Tieren lockerte sich die Fixation des Knie- oder Sprunggelenks und eine Ruhigstellung der Extremität konnte nicht mehr garantiert werden. Ebenso mussten neun Tiere ausgeschlossen werden, da sich die Operationswunde infiziert hatte. Zudem mussten 25 weitere Tiere während der Messphase herausgenommen werden, da bei diesen Probleme in der Präparation auftraten (Verletzung der Arteria. carotis, Durchreißen der Sehne des M. tibialis cranialis, Verletzung des Nervus ischiadicus). Somit sind 160 Versuchstiere in die Versuchsauswertung eingegangen, die Gruppengröße betrug $n = 10$.

3.4. Anästhesie zum Versuch

3.4.1. Narkose

Für die Bakterieninjektion und die Immobilisation am Tag -12, bzw. die repetitiven Injektionen an den Tagen -8 und -4 und Draht- bzw. Scheindrahtentfernung am Tag 0, wurden die Ratten in einer Plexiglaskammer mit Sevofluran (Sevorane[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und reinem Sauerstoff eingeleitet. Anschließend wurde die Tierschnauze in eine sogenannte „Kopfkammer“ eingebracht, über welche die Narkose bei Spontanatmung mit 4-5 Volumen-% Sevofluran in reinem Sauerstoff aufrechterhalten wurde.

Nach Beendigung der Eingriffe (Injektion, Immobilisation, Draht- bzw. Scheindrahtentfernung) wurde die Sevofluran-Zufuhr beendet und die Ratten erlangten nach 1-2 Minuten wieder das Bewusstsein. Durch das erreichte Stadium der chirurgischen Toleranz stellten wir eine schmerzlose Durchführung von Injektionen und Immobilisationen sicher.

Am Versuchstag (Tag 0, 4, 12 oder 36) wurden die Ratten ebenfalls in der oben beschriebenen Plexiglasbox mit Sevofluran bis zum Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums narkotisiert und anschließend unter Sicht mit Hilfe der direkten Laryngoskopie endotracheal intubiert. Als Tubus diente eine modifizierte Venenverweilkanüle (16-18 G, Braun, Melsungen). Für die Dauer des gesamten Versuchs wurden die Tiere volumenkontrolliert beatmet (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Apparatus Inc. South Nattick, Massachusetts, 01760 USA). Zu Beginn wurde ein Atemzugvolumen von 10 ml/ kg KG bei einer Atemfrequenz von 60/ min gewählt. Sobald es nach der arteriellen Kanülierung möglich war, Blutgase zu

analysieren, wurde die Beatmungsfrequenz so angepasst, dass der arterielle Kohlendioxidpartialdruck (paCO_2) zwischen 35 und 45 mmHg lag. Die Anästhesie wurde primär mit 4-6 Volumen-% Sevofluran in einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (FiO_2 : 0,4) aufrechterhalten. Da Sevofluran selbst eine inhibierende Wirkung auf den Azetylcholinrezeptor ausübt (Scheller 1997, S. 118-127) stellten wir nach der venösen Kanülierung der Vena jugularis externa die Narkose auf die intravenöse Gabe von Fentanyl (Fentanyl-Janssen) ($4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) und Propofol 2 %-ig (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) ($20\text{-}40 \text{ mg}/\text{kg}/\text{h}$) um. Die Narkosetiefe wurde anhand kardiovaskulärer Parameter beurteilt und nach Bedarf angepasst. Mit Hilfe eines Beatmungsmonitors (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) war es uns jederzeit möglich, die FiO_2 und das endexpiratorische CO_2 , sowie den Beatmungsdruck (6-9 mmHg) zu kontrollieren.

3.4.2. Monitoring

Am Versuchstag wurden die Ratten kardiovaskulär überwacht, um sowohl eine adäquate Narkose sicherzustellen, als auch die Versuchsbedingungen stabil zu halten. Der Herzrhythmus wurde durch drei subkutan platzierte Nadelelektroden überwacht. Der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck wurde über einen Katheter in der Arteria carotis communis gemessen. Dieser Zugang diente auch zur Gewinnung der arteriellen Blutgase. Anhand der arteriellen Blutgasanalyse bestimmten wir folgende Parameter:

- Hämoglobin (Hb, MetHb)
- pH, BE, paCO_2 , paO_2 , Bikarbonat
- Blutzucker.

Folgende Grenzen für die Parameter wurden festgelegt:

- arterieller Mitteldruck (MAP) > 75 mmHg und < 180 mmHg
- pH: 7,36-7,44
- Basenexzess (BE): -2 ± 3
- paCO_2 : 35-45 mmHg, paO_2 > 90 mmHg
- Körpertemperatur (rektal): 36,8-37,2 °C
- Blutzucker (BZ) > 75 mg dl⁻¹

Falls nötig, wurden BE und pH-Wert durch Veränderung des Atemminutenvolumens oder durch venöse Applikation von 8,4%-igem Natriumhydrogencarbonat (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) korrigiert.

Allen Tieren wurde nach der Gefäßpräparation 1 ml Hydroxyethylstärke (HAES steril 6%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) injiziert, um einen Volumenmangel auszugleichen und dennoch bei allen Tieren den gleichen Verdünnungseffekt zu erzielen. Die Körpertemperatur wurde über eine rektale Messsonde (EXACON[®], ASMUTH Medizintechnik GmbH, Minden) überwacht und mit einer Wärmelampe stabil gehalten.

3.5. Instrumentierung

3.5.1. Gelenksfixation

Nach Einleitung der Narkose rasierten wir das zu immobilisierende Bein und desinfizierten das Operationsgebiet. Der jeweilige Hinterlauf wurde mit einem sterilen Lochtuch (Secu-Drape[®], Sengewald Klinikprodukte, Rohrdorf-Thansau) abgedeckt. Das Sprung- und Kniegelenk wurden mit je einem Kirschner-Draht (Bühler

Instrumente Medizintechnik GmbH, Tuttlingen) (Durchmesser 1,0 mm) im rechten Winkel fixiert. Am Sprunggelenk brachten wir den Draht mit Hilfe eines Handbohrers, beginnend am Calcaneus, in die distale Tibia ein. Am Kniegelenk erfolgte die Spickung ebenfalls mittels Handbohrer von der proximalen Tibia (Tuberositas) aus in den distalen Femur. Die überstehenden Drahtteile wurden so entfernt, dass die Enden unter dem Hautniveau verschwanden und somit die Gefahr einer Keimaszension soweit als möglich reduziert werden konnte. Etwaige größere Hautdefekte wurden mit einer Naht geschlossen (ETHICONTM, PROLENETM, 4-0, Johnson & Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien).

3.5.2. Injektion

Zur Injektion der Bakterien bzw. der Kochsalzlösung und Gewinnung des Blutspirats (Bestimmung des systemischen MetHb-Spiegels), wurde die dorsale Penisvene mit einer 26 G Venenverweilkanüle (Firma Vasculon TM Plus) punktiert. Nach Aspiration von ca. 175 µl Blut mit einer Glaskapillare zur Bestimmung der MetHb-Konzentration (MultiCap, Bayer Vital GmbH, Fernwald, Deutschland), injizierten wir die *Corynebacterium parvum* Suspension bzw. die Kochsalz-Lösung langsam über die Kanüle und spülten mit 0,4 ml einer isotonischen Kochsalzlösung nach.

3.5.3. Drahtentfernung

Nach zwölf Tagen wurde den Tieren der Draht wieder entfernt. Dazu wurden die Ratten, wie oben bereits beschrieben, in Narkose gelegt und die Haut oberhalb des Drahtes leicht mit einem Skalpel eröffnet. Anschließend wurde mit einem Nadelhalter der Kirschner-Draht herausgezogen, die Wunde wieder verschlossen und ein flüssiger Sprühverband (OpSite, Firma Smith+Nephew Medical Limited, England) aufgetragen.

Um die Regeneration nach der Immobilisation zu erleichtern, wurden die Gelenke durch mehrmaliges, vorsichtiges Durchführen einer Extensions-Flexions-Bewegung mobilisiert. Den Sham-Tieren wurde ebenso ein Hautschnitt gesetzt, wieder zugenäht und ein Sprühverband aufgetragen.

3.5.4. Venöse und arterielle Kanülierung am Messtag

Nach der Intubation wurden die Ratten auf den Rücken gelagert und das Präparationsgebiet oberhalb des Sternums rasiert. Wir präparierten die Vena jugularis externa frei und kanülierten sie mit 2 Kathetern (Innendurchmesser: 0,58 mm) (Intramedic Non Radioopaque Polyethylene Tubing, Clay Adams, Division of Beckton & Dickinson, Parsipanny, New Jersey 07054, USA). Über einen der Katheter erfolgte die kontinuierliche Infusion von Fentanyl und Propofol mit 2 Spritzenpumpen (Harvard Pump 11 Plus, Harvard Apparats, Holliston, Massachusetts, USA), der andere Katheter diente als Zugang, um bei Bedarf Natriumbikarbonat und 50 %-ige Glucoselösung i.v. applizieren zu können (DeltaSelect GmbH, Pfullingen).

Über die ebenfalls kanülierte Arteria carotis communis erfolgte die invasive, kontinuierliche Blutdruckmessung und die Entnahme der Proben für die arterielle BGA.

3.5.5. Neuromuskuläre Messung

Die neuromuskuläre Funktion wurde mittels evozierter Mechanomyographie gemessen. Hierzu präparierten wir den Nervus ischiadicus beidseits proximal als möglich frei und versahen ihn je mit einer Reizelektrode (Modell FT03E, Grass Instruments, West Warwick, RI0283, USA). Durch beide Schienbeinköpfe wurde von lateral je ein 1,0 mm starker und circa 5 cm langer Kirschner-Draht gebohrt, der in einer Zirkelvorrichtung fixiert wurde. Desweiteren legten wir die Endsehne des M. tibialis

cranialis beidseits durch einen Hautschnitt frei, lösten sie von ihrem Knochenansatz und befestigten das distale Ende nach Luxation über das Retinaculum mit Hilfe von Polyesterfäden (Mersilene[®], 2-0, Ethicon, Norderstedt) an einem Kraftabnehmer (Force Displacement Transducer, Model FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI 02893). Die fixierte Tibia, der M. tibialis cranialis und der Kraftabnehmer bildeten somit eine Ebene (Abb. 2).

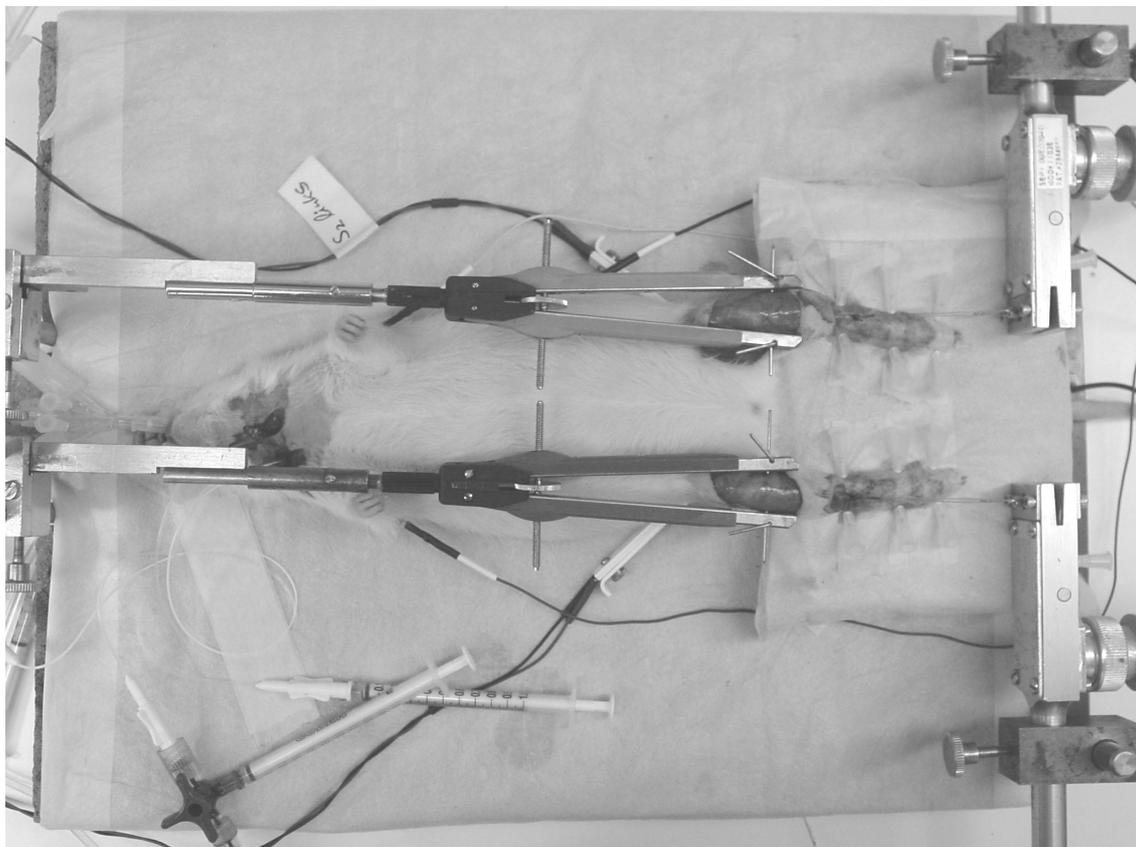


Abb. 2: Versuchsaufbau am Versuchstag (fixierte Tibia, M. tibialis cranialis und der Kraftabnehmer liegen annähernd in einer Ebene).

Die Stimulation des Nervus ischiadicus erfolgte mittels Stimulator (Dual Chanel Square Pulse Stimulator, Model S88K, Grass Instruments, West Warwick, RI 02893 USA) der mit einem externen Impulsgeber (Innervator, Fisher & Paykel, Astro-Med, Inc., Grass

Instrument Division) gekoppelt war. Die muskuläre Kontraktionsantwort wurde in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieses erfuhr eine Verstärkung (RPS 107 Regulated Power Supply, Grass Instruments Co, West Warwick RI 02893, USA) und wurde graphisch von einem Nadelschreiber (Schwarzer Uniscript DU 210) auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Vor jeder Muskelmessung bestimmten wir eine Eichzacke mit einem Gewichtszug von 1000 g und die supramaximale Stimulationsstärke. Durch Vorspannung des Muskels („Preload“) mit 50 g, wurde sowohl am Op-Bein, als auch am Kontroll-Bein eine isometrische Kontraktion erreicht, welche optimale evozierte Kontraktionsamplituden liefert.

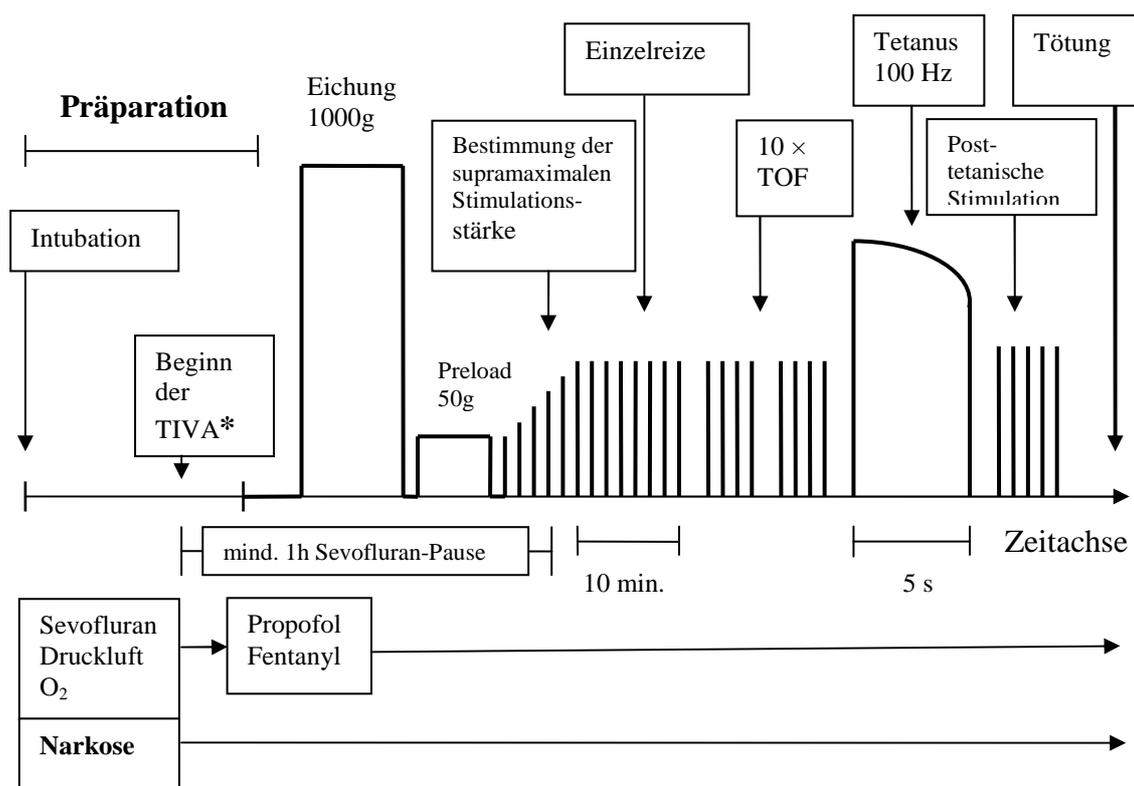
3.6. Versuchsablauf

Nach Abschluss der Präparation, Eichung des Messinstrumentariums, Fertigstellung des Versuchsaufbaus und Bestimmung der supramaximalen Stimulationsstärke, erfolgte zur Stabilisierung der mechanomyographischen Messung eine 10-minütige Einzelreizung. Anschließend wurde durch eine Blutgasanalyse und die Erhebung der Vitalparameter die sogenannte „Baseline“ bestimmt.

War eine Korrektur abweichender Parameter nötig, so wurde, nach einer Stabilisierungsperiode von ca. 10 Minuten, durch eine erneute BGA solange eine korrigierte „Baseline“ erstellt, bis deren Werte innerhalb des Referenzbereichs lagen. Während dieses Zeitraums erfolgte eine kontinuierliche Einzelreizung. Anschließend stimulierten wir den Nervus ischiadicus mit 10 Serien von „Train of Four“ (TOF)-Stimulationen (Messung der maximalen Einzelkontraktionskraft). Diesen folgt ein tetanischer Reiz (Frequenz: 100 Hz, Reizdauer: 5 s) und im Abstand von drei Sekunden dazu eine posttetanische Stimulation (Frequenz: 1 Hz). Unmittelbar danach wurden eine weitere BGA und Erfassung der Kreislaufparameter durchgeführt. Nach

Beendigung der neuromuskulären Messung wurden die Tiere in tiefer Narkose über den arteriellen Katheter entblutet und euthanasiert. Das Blut wurde in mit EDTA-versetzten Blutbildmonovetten (S-Monovette[®], 66× 11,5 mm, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürnberg) gesammelt, anschließend in Eppendorf-Cups pipettiert und bei 4 °C, mit 3500 Umdrehungen/ min., 10 Minuten lang zentrifugiert (Varifuge 3.OR, Heraeus Sepatech). Das hieraus gewonnene Serum diente der weiteren Bestimmung von α_1 -AGP und wurde bei -80 °C aufbewahrt.

Desweiteren wurden der M. tibialis cranialis, der M. soleus, der M. gastrocnemius und der M. flexor digitorum entnommen, gewogen und für weitere Analysezwecke bzw. histologische Untersuchungen kryokonserviert.



* Zeitraum zwischen der Umstellung von Gasnarkose auf TIVA und Beginn der evozierten Mechanomyographie mindestens 1 Stunde

Abb. 3: Messplan am Versuchstag.

3.7. Statistik

Um die multiplen Messwertwiederholungen zu berücksichtigen, wurden die Daten mit einem hierarchischen Modell statistisch analysiert. Die jeweiligen abhängigen Variablen wurden mit Zweifache-ANOVA für wiederholte Messungen sowie mit faktoriellen ANOVA geprüft. Bei den postoperativen Variablen gingen als unabhängige Variablen zwischen den Gruppen die Infektion [C.p. vs. NaCl], die Beweglichkeit des operierten Beines [Immobilisation vs. Sham-Immobilisation] sowie die Erholungsdauer [0, 4, 12 und 36 Tage] und das Bein [Op-Bein vs. Non-Op-Bein] als Binnenfaktoren ein. Während der Infektions- und Immobilisationsphase sowie intraoperativ wurden zusätzlich diese jeweils relevanten Zeitpunkte (z.B. Tage [-12 bis 0], Messzeitpunkte während der OP [vor Tetanus; nach Tetanus]) als Binnengruppenfaktoren verwendet. Wenn ein Hautdefekt oder eine Wechselwirkung signifikant ($p < 0,05$) war wurde posthoc mit gepaarten bzw. ungepaarten t-Testen in den zugehörigen Subgruppen geprüft. Dargestellt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der einzelnen Variablen. Die statistische Analyse führten wir mit SPSS 15.0 für Windows (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durch.

4. Ergebnisse

4.1. Inflammationsparameter

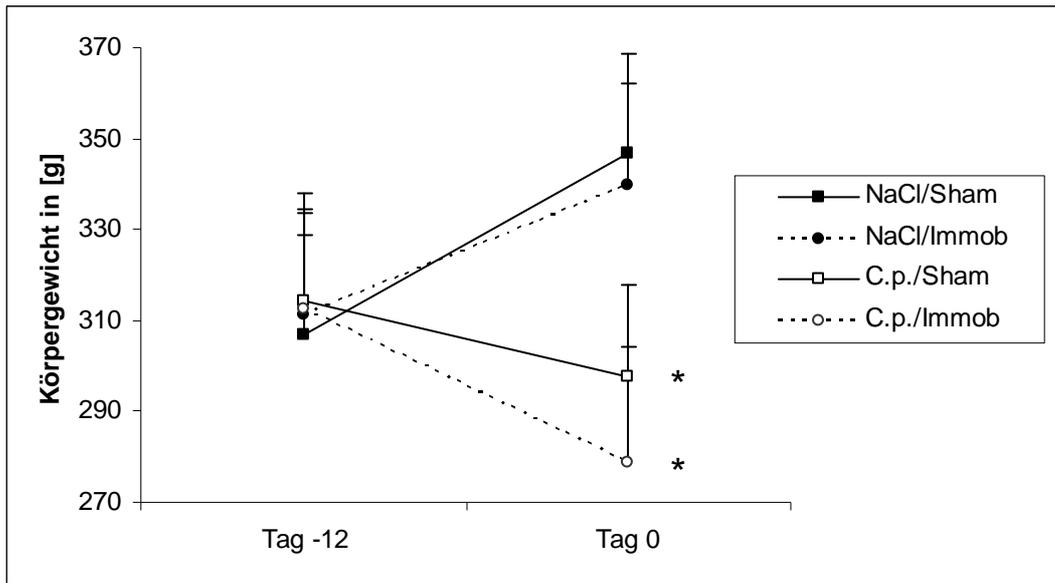
Durch die Injektion von *Corynebacterium parvum* starben 55 von insgesamt 258 Ratten, dies entspricht einer Mortalität von 21,3%.

In der Schädigungsphase führte die Injektion von *Corynebacterium parvum* im Vergleich zur Kochsalzinjektion zu einem signifikanten Gewichtsverlust bei den Versuchstieren (Abb. 4 a).

Ab dem 4. bis 12. Tag der Erholungsphase waren keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen den Tieren nach der Injektion von *Corynebacterium parvum* oder Kochsalz nachweisbar. Unabhängig davon nahmen alle Tiere durch ihr normales Wachstum an Gewicht zu (Abb. 4 b).

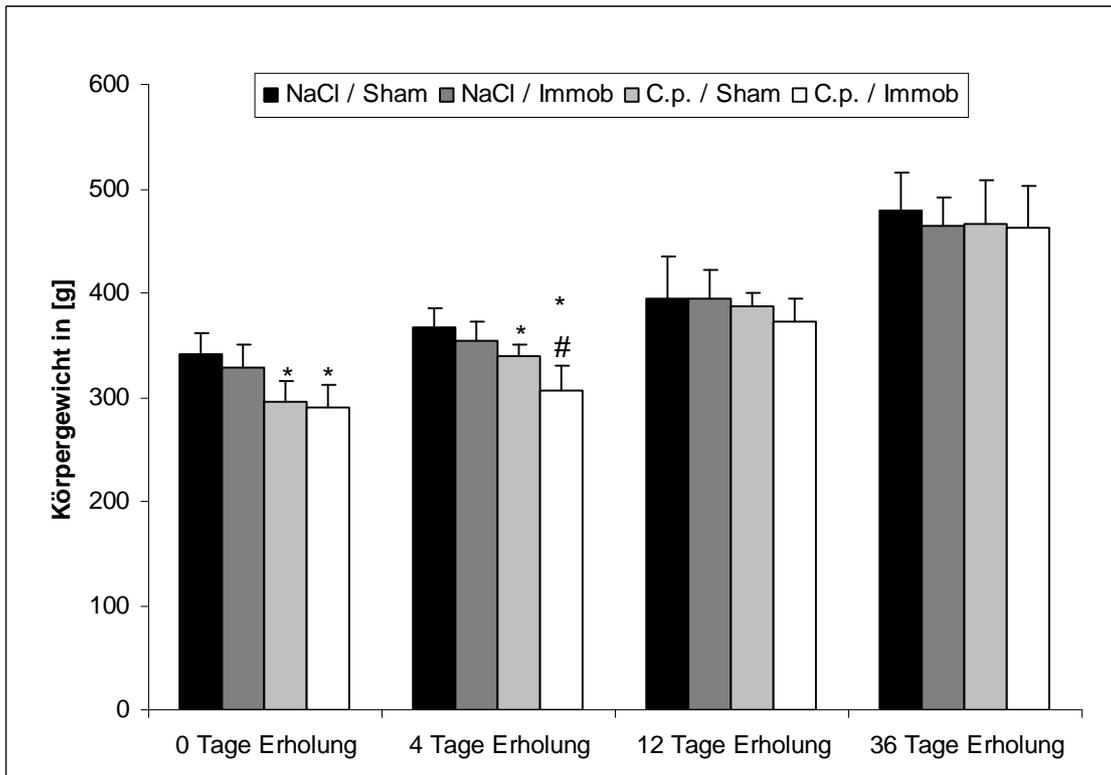
Die initial erhöhten Methämoglobinspiegel erholten sich ebenso zwischen dem 4. und 12. Tag (Abb. 5).

Ein signifikanter Unterschied in der Erythrozytenzahl war ab dem 12. bis 36. Tag nicht mehr zu erkennen. Eine Injektion von *Corynebacterium parvum* führte bei den immobilisierten Tieren bis 36 Tage und bei den sham-immobilisierten Tieren zwischen 12 und 36 Tage zu signifikant erhöhten α_1 -AGP-Spiegeln (Tabelle 1).



* $p < 0,05$ C.p. versus NaCl

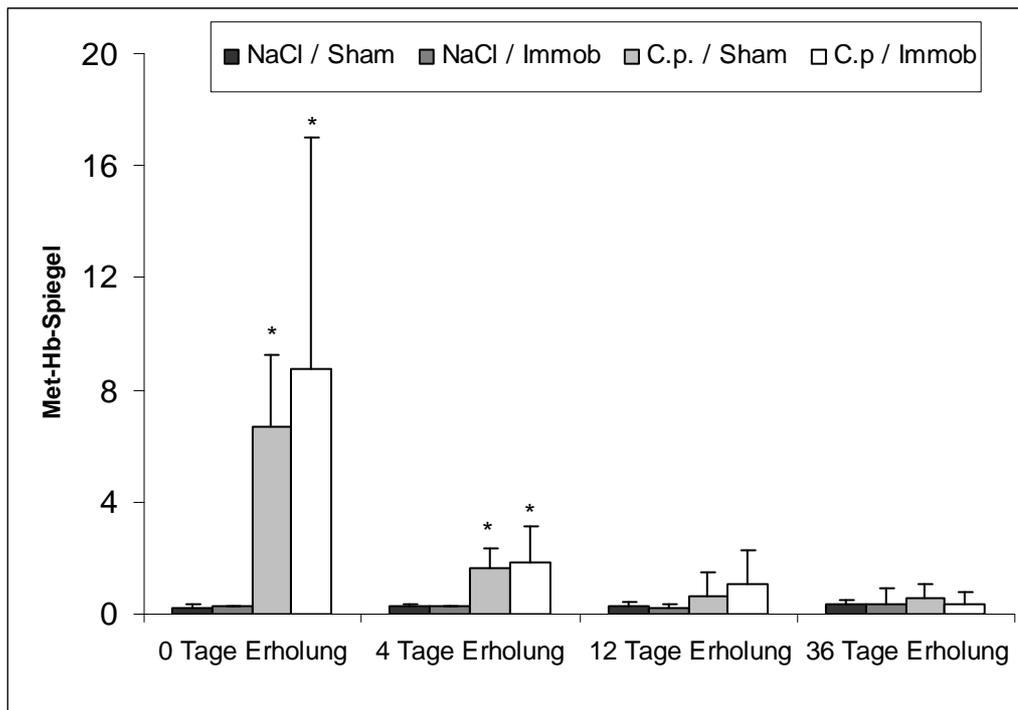
Abb. 4 a : Verlauf des Körpergewichts in der Schädigungsphase



* $p < 0,05$ C.p. versus NaCl

$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

Abb. 4 b : Körpergewichte jeweils am Messtag nach der Erholungsphase



* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

Abbildung 5 : Methämoglobin-Spiegel jeweils am Messtag

		Sham-Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
Erholung					
Erythrozyten [Mio./ μ l]	0 Tage	6,97 \pm 0,82	4,49 \pm 0,88 *	6,46 \pm 0,87	4,21 \pm 0,63 *
	4 Tage	6,62 \pm 0,60	4,41 \pm 0,43 *	6,54 \pm 0,64	4,55 \pm 0,75 *
	12 Tage	6,72 \pm 0,40	5,44 \pm 0,84 *	6,82 \pm 0,69	5,13 \pm 0,60 *
	36 Tage	7,07 \pm 0,62	7,26 \pm 1,20	7,25 \pm 0,64	6,84 \pm 0,83
α 1-AGP [mg/ml]	0 Tage	0,22 \pm 0,16	1,41 \pm 0,55 *	0,25 \pm 0,25	1,41 \pm 0,66 *
	4 Tage	0,07 \pm 0,01	0,26 \pm 0,13 *	0,09 \pm 0,01 #	0,25 \pm 0,14 *
	12 Tage	0,08 \pm 0,02	0,14 \pm 0,03 *	0,08 \pm 0,01	0,17 \pm 0,06 *
	36 Tage	0,1 \pm 0,05	0,13 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	0,12 \pm 0,03 *

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

Tabelle 1 : Entzündungsparameter am Messtag

4.2. Immobilisationsparameter

Es wurden neun Tiere aus dem Versuch genommen, da sich die Operationswunde infiziert hatte, bei weiteren neun war die Immobilisation insuffizient.

Eine alleinige Immobilisation führt zu einem signifikanten Gewichtsverlust des M. tibialis cranialis in allen Erholungszeiträumen, nach einer reinen Inflammation hingegen zwischen 4 und 12 Tage.

Im Vergleich zwischen operiertem und Kontroll-Bein sind nach 36 Tagen Erholung noch Signifikanzen sichtbar (Tabelle 2).

		Sham - Immobilisation		Immobilisation	
		NaCl	C.p.	NaCl	C.p.
Erholung					
OP- Bein	0 Tage	0,60 ± 0,04 §	0,43 ± 0,07 §*	0,39 ± 0,06 §#	0,30 ± 0,04 §# *
	4 Tage	0,66 ± 0,07 §	0,60 ± 0,06	0,38 ± 0,05 §#	0,33 ± 0,07 §#
	12 Tage	0,74 ± 0,13 §	0,74 ± 0,05	0,52 ± 0,06 §#	0,52 ± 0,06 §#
	36 Tage	0,85 ± 0,05 §	0,87 ± 0,12 §	0,75 ± 0,05 §#	0,73 ± 0,07 §#
Kontroll- Bein	0 Tage	0,66 ± 0,05	0,54 ± 0,05 *	0,65 ± 0,05	0,47 ± 0,07 *
	4 Tage	0,71 ± 0,07	0,62 ± 0,06 *	0,69 ± 0,04	0,59 ± 0,07 *
	12 Tage	0,76 ± 0,11	0,79 ± 0,06	0,79 ± 0,08	0,75 ± 0,06
	36 Tage	0,89 ± 0,05	0,93 ± 0,11	0,88 ± 0,05	0,88 ± 0,07

p < 0,05 Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* p < 0,05 C.p. vs. NaCl

§ p < 0,05 Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Tabelle 2 : Muskelgewichte [g] am Messtag des M. tibialis cranialis

4.3. Modellstabilität

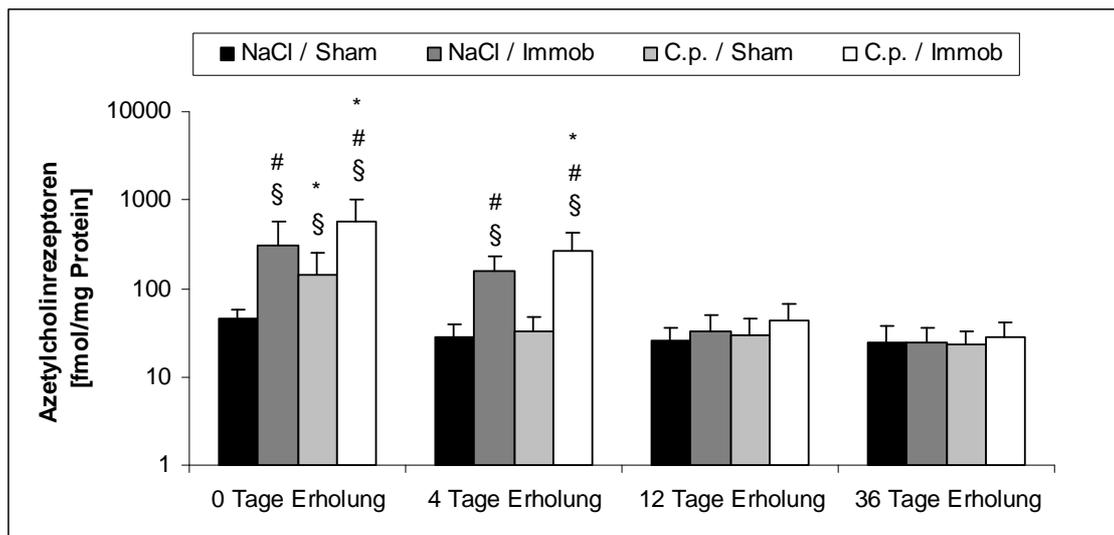
Die hämodynamischen Parameter wurden während des gesamten Versuchs bei jeder Ratte stabil gehalten. Abweichungen von den gesetzten Ober- und Untergrenzen wurden korrigiert. Die Werte zwischen und innerhalb der Gruppen unterscheiden sich nicht. Daher beinhalten die Mittelwerte die Parameter aller Versuchstiere.

Zu Beginn der Versuche, vor der tetanischen Reizung, lag der mittlere arterielle Blutdruck bei 124 ± 22 mmHg, die Herzfrequenz betrug 367 ± 40 / min, der arterielle pH-Wert war bei $7,39 \pm 0,03$ und der Basenüberschuss war $-0,1 \pm 2,2$. Der Blutzucker betrug 100 ± 20 mg/ dl und die Körpertemperatur lag bei $36,9 \pm 0,1$ °C. Nach der tetanischen Stimulation war der mittlere arterielle Blutdruck 131 ± 26 mmHg, die Herzfrequenz war 377 ± 40 / min, der arterielle pH war $7,37 \pm 0,04$ und der Basenüberschuss war $-0,9 \pm 2,3$. Der Blutzucker war 95 ± 18 mg/ dl und die Körpertemperatur lag bei $37,0 \pm 0,2$ °C. Der paO_2 war zu jeder Zeit größer als 90 mmHg.

Bei 25 Ratten kam es zu intraoperativen Problemen, weshalb bei diesen Tieren keine Daten erhoben werden konnten.

4.4. Expression des Azetylcholinrezeptors

Eine reine Inflammation führte lediglich zu einer milden Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren. Diese Hochregulation ist bereits vier Tage nach Ende der Inflammation nicht mehr signifikant. Eine alleinige oder zusätzliche Immobilisation zeigte deutlich höhere Azetylcholinrezeptorwerte. Diese Hochregulierung dauerte nach Immobilisation zwischen 4 und 12 Tage (Abb. 6a und 6b).

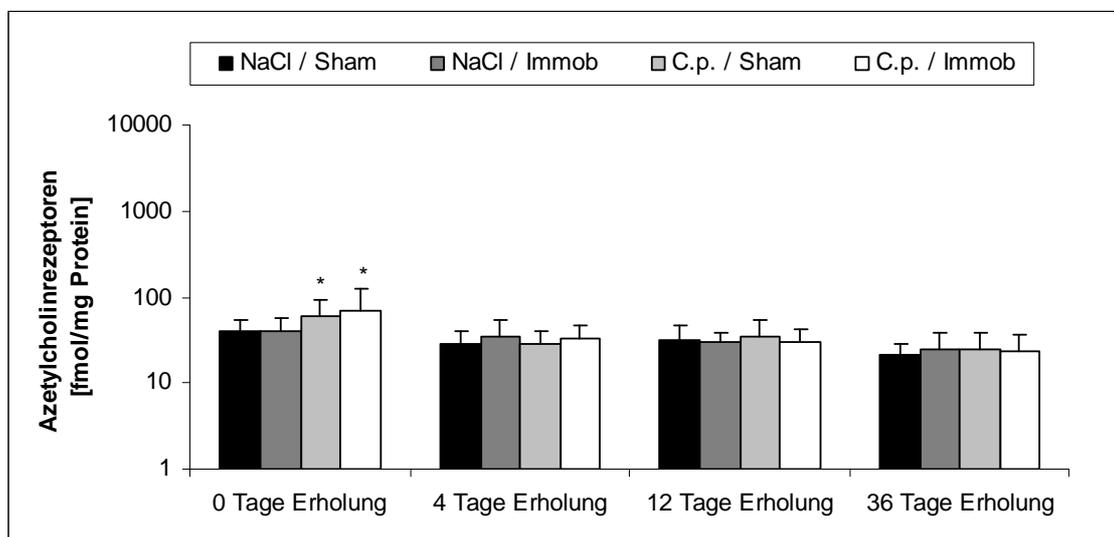


$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

§ $p < 0,05$ Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Abbildung 6 a: Azetylcholinrezeptoren aus Muskeln am operierten Bein



$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

§ $p < 0,05$ Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Abbildung 6 b : Azetylcholinrezeptoren aus Muskeln am Kontroll-Bein

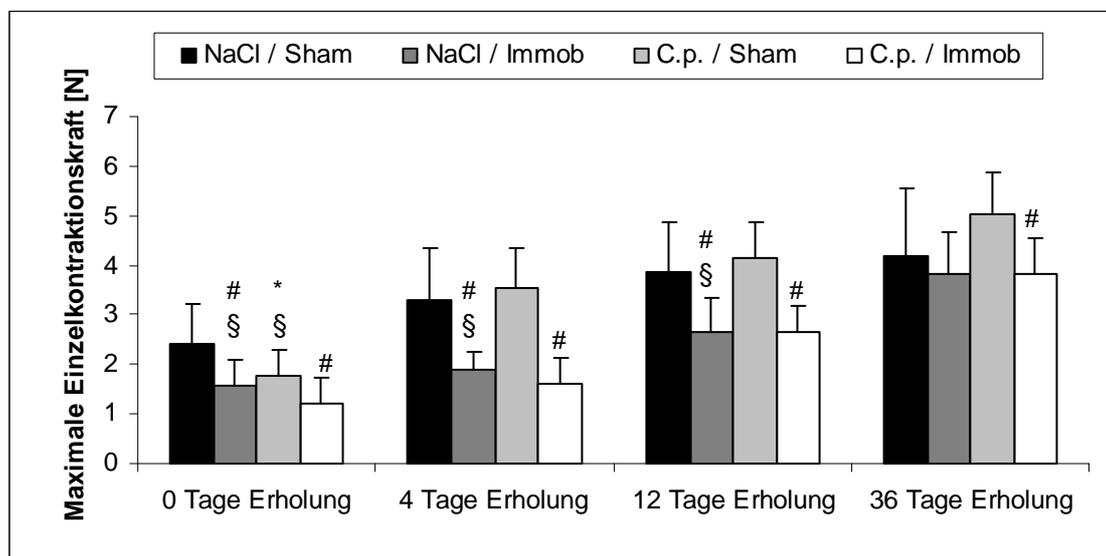
4.5. Kontraktionsparameter

4.5.1. Maximale Einzelkontraktionskraft

Die maximale Einzelkontraktionskraft erreichte am operierten Bein nach einer reinen Immobilisation zwischen dem 12. und 36. Tag annähernd die Werte der Kontrollgruppe (Tiere mit Kochsalz-Injektion und Sham-Immobilisation). Bei einer zusätzlichen Inflammation war die Kraft nach 36 Tagen immer noch signifikant geringer. Im Vergleich zwischen operiertem und Kontroll-Bein dauert die Erholung der Einzelkontraktionskraft nach reiner Immobilisation 12 bis 36 Tage.

Die verminderte maximale Einzelkontraktionskraft nach Inflammation ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nach spätestens 4 Tagen Erholung nicht mehr signifikant.

Im Verlauf der 36 Tage Erholung ist eine allgemeine Zunahme der Kraft sowohl des operierten Beins als auch am Kontroll-Bein zu erkennen (Abb. 7a und b).

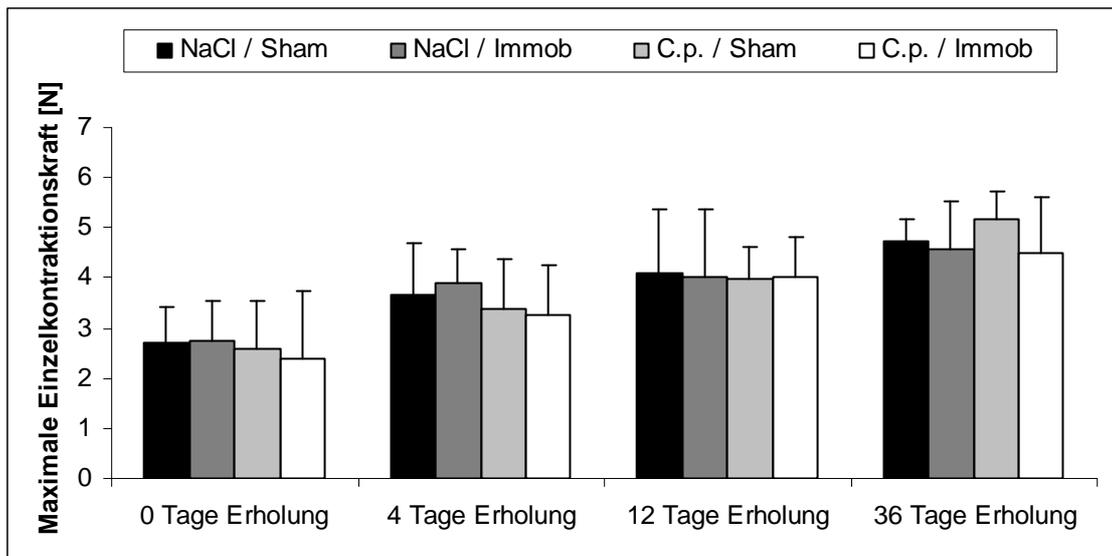


$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

§ $p < 0,05$ Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Abb. 7 a : Maximale Einzelkontraktionskraft des M. tibialis cranialis am Op-Bein



$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

§ $p < 0,05$ Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Abb. 7 b : Maximale Einzelkontraktionskraft des M. tibialis cranialis am Kontroll-Bein

4.5.2. Spezifische Einzelkontraktionskraft

Die spezifische Einzelkontraktionskraft des M. tibialis cranialis zeigte keine Signifikanzen auf (Abb. 8 a und b).

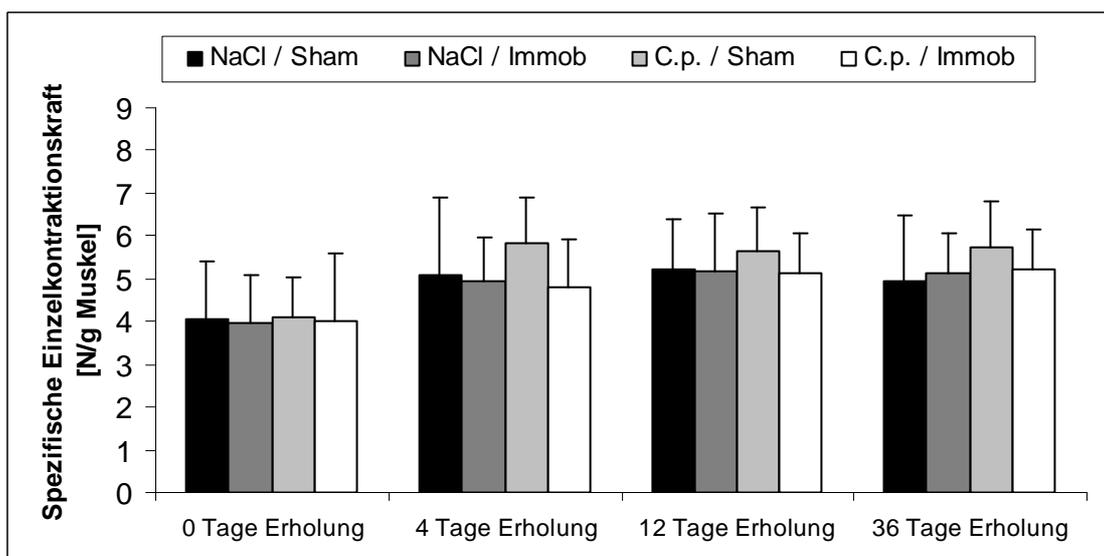


Abb. 8 a : Spezifische Einzelkontraktionskraft des M. tibialis cranialis am Op-Bein

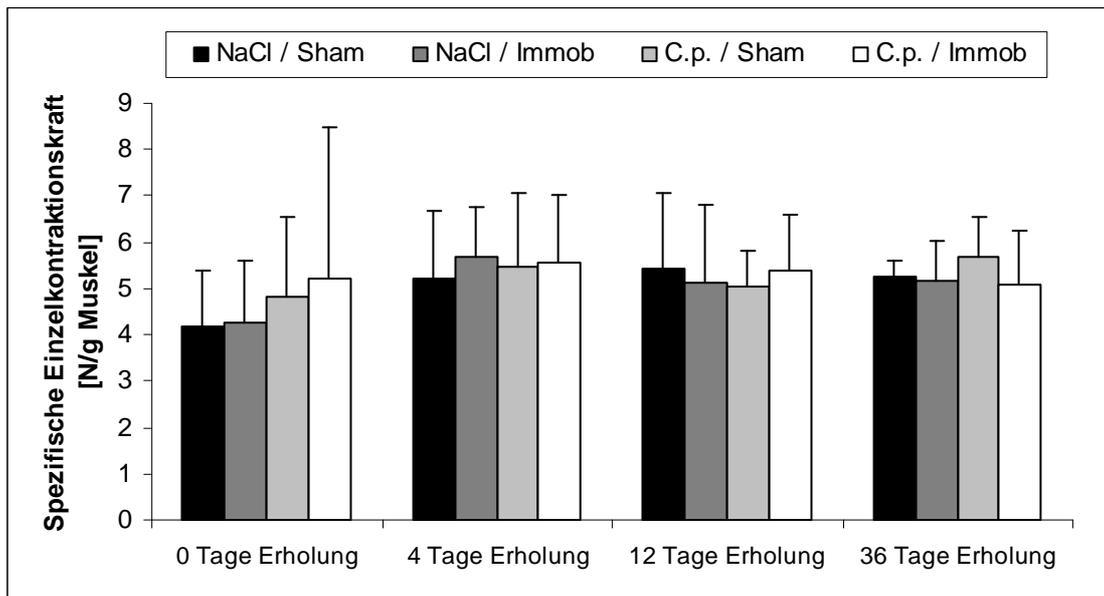
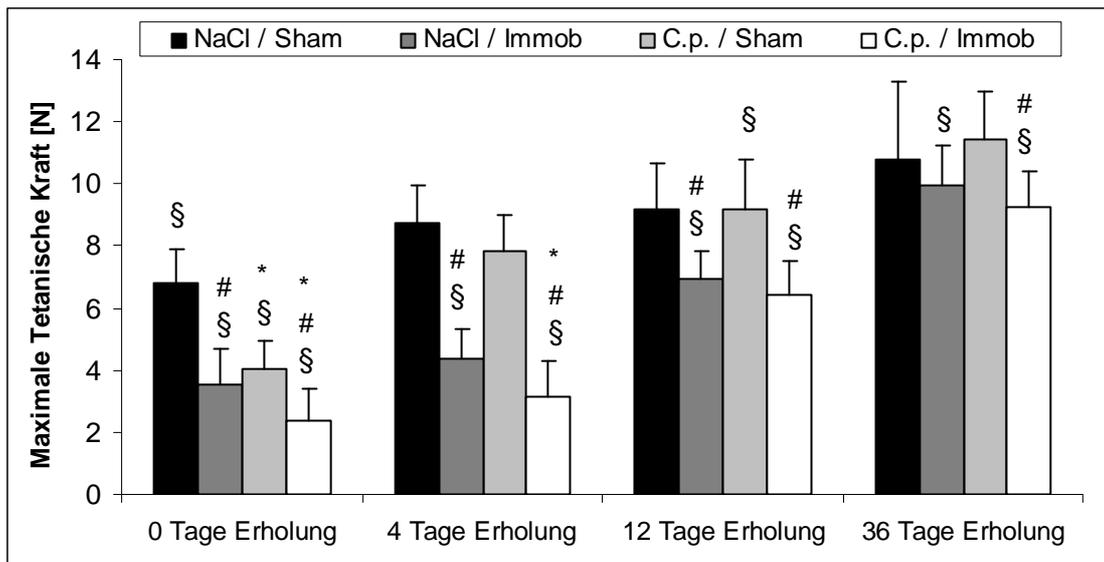


Abb. 8 b: Spezifische Einzelkontraktionskraft des M. tibialis cranialis am Kontroll-Bein

4.5.3. Maximale tetanische Kraft

Die maximale tetanische Kraft erholte sich am operierten Bein nach einer reinen Immobilisation zwischen dem zwölften und 36. Tag. Bei einer zusätzlichen Inflammation war die Kraft nach 36 Tagen immer noch signifikant geringer. Im Vergleich zwischen operiertem und Kontroll-Bein war nach 36 Tagen keine Angleichung der tetanischen Kraft zu erkennen.

Ein Vergleich zwischen Ratten mit *Corynebacterium parvum* und Kochsalz-Injektion zeigte zwischen dem vierten und zwölften Tag der Erholung keine signifikanten Unterschiede mehr (Abb. 9 a und b).

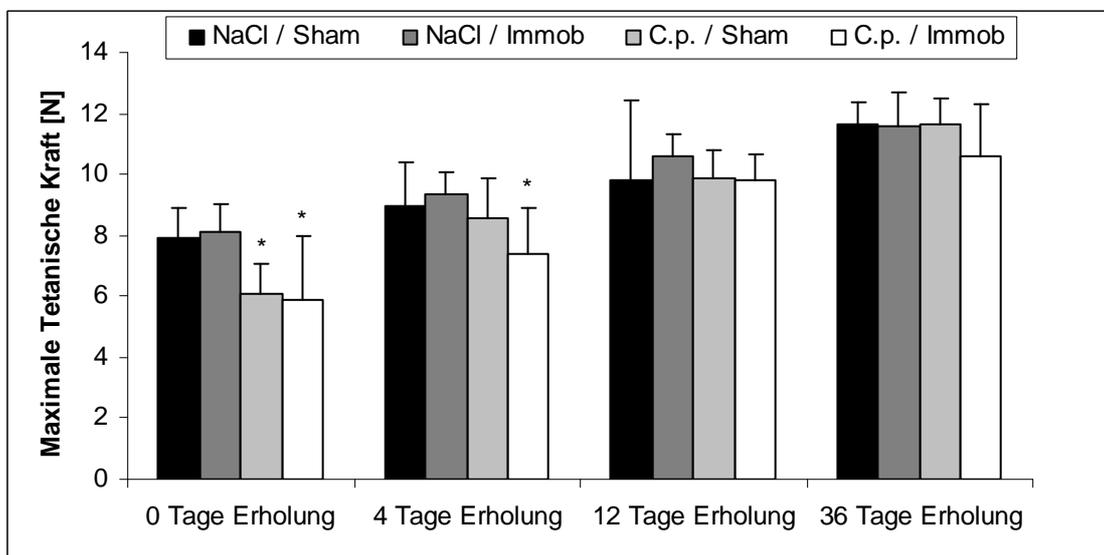


$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

§ $p < 0,05$ Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Abb. 9 a : Maximale Tetanische Kraft des M. tibialis cranialis am Op-Bein



$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

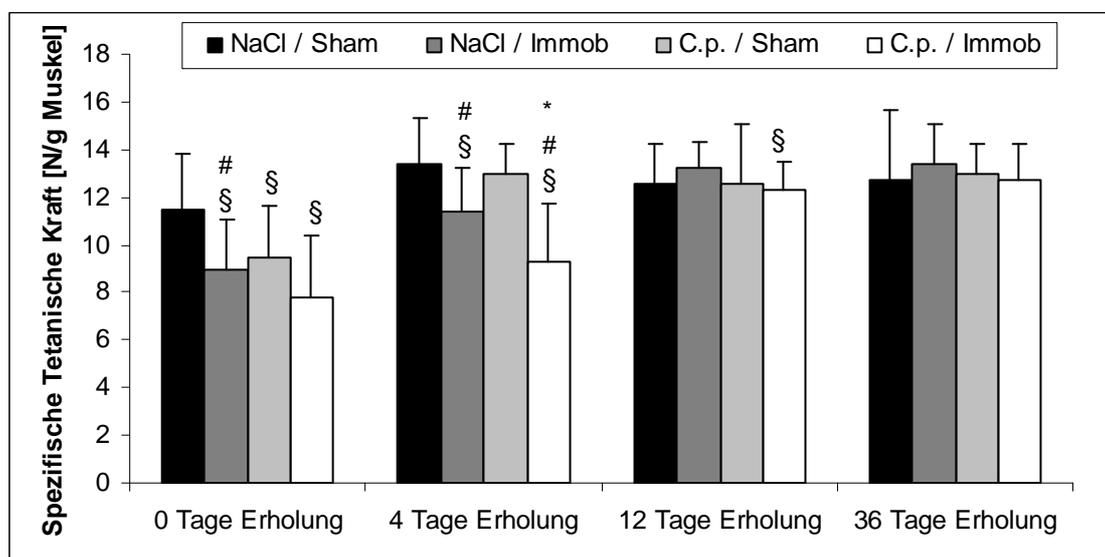
§ $p < 0,05$ Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Abb. 9 b : Maximale Tetanische Kraft des M. tibialis cranialis am Kontroll-Bein

4.5.4. Spezifische tetanische Kraft

Nach zwölf Tagen kam es zu einer Regeneration der spezifischen tetanischen Kraft nach Immobilisation am operierten Bein.

Im Vergleich zwischen operiertem und Kontroll-Bein war die Erholung nach einer reinen Immobilisation nach 12 Tagen und bei zusätzlicher Inflammation nach 36 Tagen zu sehen (Abb. 10 a und b).



$p < 0,05$ Immobilisation vs. Sham-Immobilisation

* $p < 0,05$ C.p. vs. NaCl

§ $p < 0,05$ Op-Bein vs. Kontroll-Bein

Abb. 10 a : Spezifische Tetanische Kraft des M. tibialis cranialis am Op-Bein

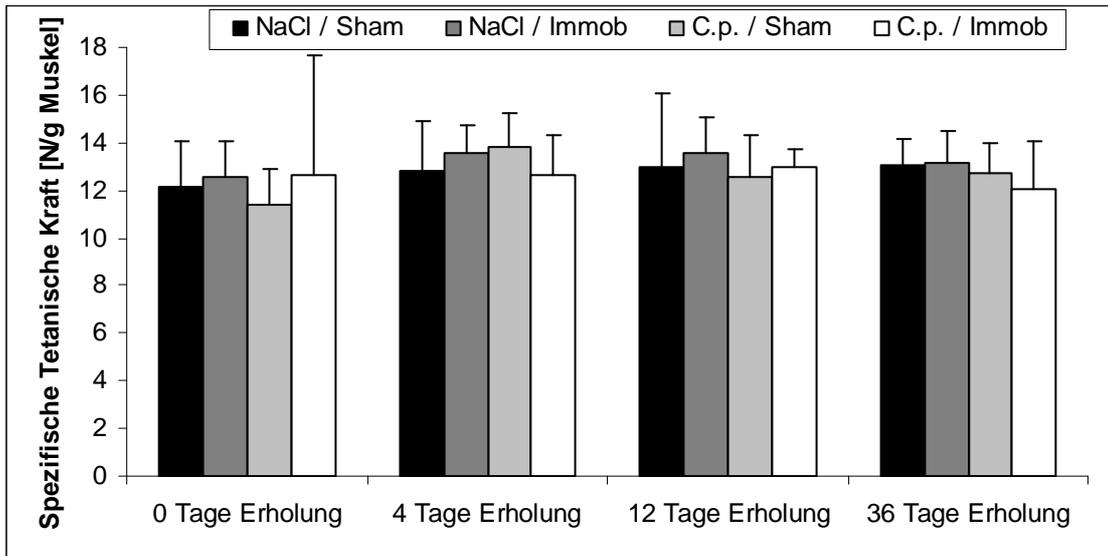


Abb. 10 b : Spezifische Tetanische Kraft des M. tibialis cranialis am Kontroll-Bein

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass Immobilisation in einem größeren Ausmaß als Inflammation für eine verzögerte Erholung nach neuromuskulärer Schwäche und für eine stärkere und länger anhaltende Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren an Skelettmuskeln verantwortlich ist. Auch für die Einzelkraftmessungen und die Messung der maximalen tetanischen Kraft konnten wir zeigen, dass nach einer Immobilisation im Vergleich zu einer Inflammation mehr Zeit für eine Erholung benötigt wird.

Immobilisation (Hinder 1997, S. 211-219), (Radell 2002, S. 358-364) und Inflammation (Hund 2001, S. 929-934), (Friedrich 2006, S. 403-409) sind zwei Hauptrisikofaktoren für das Entstehen einer Critical Illness Myopathie. Es gibt aber bisher nur Arbeiten, die lediglich einen der beiden pathogenetischen Faktoren aufgreifen. So gibt es verschiedene Ansätze eine Immobilisation zu simulieren: eine Aufhängung des Hinterlaufs (Anderson 1999, S. 2701-2707), ein Eingipsen eines Hinterlaufs (Coutinho 2002, S. 1329-1332), eine Infusion mit Muskelrelaxantien (Kim 1995, S. 309-315), eine Denervierung des Muskels (Hogue 1990, S. 703-709) oder eine Fixierung des Knie- und Sprunggelenks mittels Draht-Spickung (Ibebunjo 1999, S. 275-285). Wir haben uns für die von Ibebunjo publizierte Methode entschieden, da in diesem Versuchsaufbau die Kontinuität der nervalen Leitung, sowohl zentral als auch peripher erhalten bleibt. Es wird nur die isotonische Kontraktion blockiert, die isometrische hingegen bleibt intakt (Ibebunjo 1999, S. 275-285). Hierdurch erhalten wir immobilisationsbedingte Veränderungen wie Muskelatrophie, Muskelschwäche und Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren der Skelettmuskeln.

Um eine systemische Inflammation zu induzieren wurden Verfahren entwickelt wie die intraperitoneale Injektion von Zymosan (Minnaard 2005, S. 339-348), *Corynebacterium parvum* (Fink 2003, S. 82-88) oder eine Injektion von Endotoxinen (Chai 2003, S. 1802-1807). In all

diesen Ansätzen wurden jedoch nur die kurzfristigen Reaktionen nach einmaliger Stimulation einer Inflammationsreaktion untersucht. Wir wissen aber, dass sich die CIM bevorzugt dann entwickelt, wenn eine Sepsis bzw. SIRS oder die absolute Bettlägerigkeit über mindestens sieben Tage anhält (De Letter 2001, S. 2281-2286), (De Jonghe 2002, S. 2859-2867). Durch repetitive Gabe von *Corynebacterium parvum* erreichten wir eine zwölf Tage andauernde Inflammation. Eine Infektion durch *Corynebacterium parvum* führt in unserem Modell zu einer signifikanten Erniedrigung des Körpergewichts beziehungsweise Erhöhung des Methämoglobin-Spiegels. Die *Corynebacterium parvum* induzierte Mortalität betrug 21.3%.

Azetylcholinrezeptoren sind auf der Muskeloberfläche lokalisiert und verantwortlich für die neuromuskuläre Antwort. Kommt es durch pathogenetische Faktoren wie Immobilisation oder Inflammation zu Schädigungen an Muskeln, führt dies auch zu Veränderungen an den Rezeptoren. So zeigten Yanez et al. in ihrer Arbeit, dass eine Gabe des Muskelrelaxans d-Tubocurare oder eine Immobilisation über 28 Tage eine Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren zur Folge hat (Yanez 1996, S. 384-391). In unserem Modell zeigt sich nach Inflammation eine milde Hochregulierung der Azetylcholinrezeptoren, die sich aber nach spätestens vier Tagen wieder erholt hat. Eine Immobilisation hingegen führt zu einem deutlich stärkeren Anstieg, der sich erst nach zwölf Tagen annähernd normalisiert.

Am Kontroll-Bein führt die Inflammation sowohl zu einer signifikanten Reduktion der Muskelmasse als auch der maximalen tetanischen Kraft. Bei beiden Parametern kommt es nach zwölf Tagen zu einer kompletten Erholung. Hingegen weisen weder spezifische tetanische Muskelkraft noch Einzelkontraktionskraft oder spezifischen Einzelkontraktionskraft signifikante Veränderungen auf. So kommen wir zu dem Schluss, dass die Muskelschwäche nach Inflammation hauptsächlich aus einem Verlust der Muskelmasse resultiert. So konnten auch Minnaard et al. ihrem Inflammationsmodell zeigen, dass eine Infektion mit Zymosan zu

einem Verlust der Muskelmasse führte und es dadurch bedingt, zu einem Abfall der Muskelkraft kam (Minnaard 2005, S. 339-348).

Die Veränderungen nach Immobilisation sind dagegen viel gravierender. Es kommt zu einem signifikanten Verlust der Muskelmasse, der selbst nach 36 Tagen noch nachzuweisen ist. Entsprechend kommt es zu einem signifikanten Abfall der Muskelkraft. Die Einzelkontraktionskraft zeigt zwar innerhalb der Regenerationszeit eine Besserung, doch ist selbst am 36. Tag der Erholung eine Kraftreduktion sichtbar. Auch bei der Messung der maximalen tetanischen Kraft sind nach 36 Tagen noch Einbußen zu erkennen. Die spezifische tetanische Kraft hingegen erholt sich nach zwölf Tagen nahezu vollständig. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich ab dem zwölften Tag der Erholung um eine rein durch Muskelatrophie hervorgerufene Muskelschwäche handelt. In den ersten zwölf Tagen müssen demnach noch weitere Faktoren eine Rolle bei der Entstehung der Muskelschwäche spielen. Als ein möglicher Faktor kommt eine Veränderung der Anzahl oder Subtypen der Azetylcholinrezeptoren in Frage, da diese direkt in die neuromuskuläre Übertragung eingebunden sind. In unserer Untersuchung fiel auf, dass die Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren in den ersten zwölf Tagen nach Immobilisation einen ähnlichen Verlauf der Erholung zeigte wie die verminderte spezifische tetanische Kraft.

Die Arbeit von Fink et al. (Fink 2008, S. 910-916) zeigte, dass Immobilisation und Inflammation gleichermaßen verantwortlich sind für Muskelschwäche, Abnahme der Einzel- und tetanischen Muskelkraft. Auch die Zunahme der Acetylcholinrezeptoren ist nicht allein durch Muskelatrophie bedingt. Diskutiert wurden neben der Myositis, welche sich in erhöhten Entzündungsparametern darstellte, auch die Reduktion von Motoneuronen und Myosinfibrillen. Die Arbeit konnte aber belegen, dass sich keine signifikanten Veränderungen in den Typ1/Typ2-Fasern ergaben. In unserer Arbeit hingegen zeigt sich, dass die Ursache für die

verzögerte Erholung zwischen dem 12. und 36. Tag rein auf Muskelatrophie zurückzuführen ist. In den ersten zwölf Tagen aber spielen wohl weitere Mechanismen noch eine Rolle. Als eine mögliche Ursache kommt die Myositis in Frage, da die Methämoglobin- und α 1-AGP-Spiegel in den ersten Tagen der Erholungsphase noch signifikant erhöht sind. Weiterhin zu diskutieren ist das Zusammenspiel der Muskelfasertypen. Das Hauptaugenmerk unserer histologischen Auswertung lag zwar auf Muskelkraft, Muskelmasse und Azetylcholinrezeptoren, doch spielt sicherlich die Veränderung zwischen schnellen (Typ II) und langsamen (Typ I) Muskelfasertypen eine Rolle. Im M. tibialis der Ratte dominieren die schnellen (Typ II) Fasern. So konnte in der Arbeit von Gupta et al. gezeigt werden, dass eine Denervation im Sinne einer Immobilisation zu einer Atrophie der schnellen (Typ II) Fasern und zu einer Hypertrophie der langsamen (Typ I) Fasern im M. soleus von Ratten führt (Gupta 1989, S. 647-655).

Zusammenfassend kann man sagen, dass in unserem Modell die Immobilisation der wesentliche Faktor für eine verzögerte Erholung der Muskelkraft ist und eine begleitende oder alleinige Inflammation nur zur kurzfristigen Verschlechterung der Muskelfunktion führt. Eine additive Wirkung der beiden pathogenetischen Faktoren ist nicht nachweisbar. Ebenso führt die Immobilisation im Vergleich zur Inflammation zu einer stärkeren und länger andauernden Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Systemische Inflammation und Immobilisation sind zwei Hauptrisikofaktoren in der Pathogenese der sog. CIM. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen dieser beiden Faktoren auf die Erholung der Muskelkraft sowie auf die Erholung der hochregulierten Azetylcholinrezeptoren zu untersuchen.

Methoden: Nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission erhielten 258 männliche Sprague-Dawley Ratten an den Tagen -12, -8 und -4 je eine intravenöse Injektion von entweder *Corynebacterium parvum* Bakterien (C.p.) oder physiologischer Kochsalzlösung (NaCl). Die Gruppen wurden weiter unterteilt, um einen Hinterlauf (Op-Bein) entweder mittels Kirschner-Draht zu immobilisieren (Immobilisation) oder nach der Operation mobil zu belassen (Sham-Immobilisation). Das entsprechende kontralaterale Bein diente als Kontrolle (Kontroll-Bein). Am Tag 0, 4, 12 oder 36 nach Erholung wurde die muskuläre Kontraktionskraft (maximale Einzelkontraktionskraft, maximale tetanische Kraft) mechanomyographisch am M. tibialis cranialis gemessen. Nach den Messungen wurden die Tiere getötet, die Muskelgewichte gemessen, sowie das Akute-Phase-Protein α_1 -AGP im Serum und die Expression der Azetylcholinrezeptoren auf dem M. tibialis cranialis bestimmt.

Ergebnisse: 55 Tiere starben nach Injektionen von *Corynebacterium parvum*. Bei neun Tieren infizierte sich die Op-Wunde und weitere neun Tiere waren insuffizient immobilisiert. 25 Tiere mussten Präparations- und Op-bedingt aus dem Versuch ausgeschlossen werden.

Nach *Corynebacterium parvum* Injektionen kam es bei allen Tieren zu einem signifikanten Gewichtsverlust, der bis zum zwölften Tag der Erholung anhielt (Minimum am Tag 10 Schädigungsphase: Cp/Sham 11,27%, Cp/Immob 16,3% Gewichtsverlust vom Ausgangsgewicht). MetHb und α_1 -AGP waren bei den C.p-Tieren signifikant erhöht, erreichten

aber am Tag zwölf der Erholung wieder nahezu den normalen Ausgangswert (Maximum Met-Hb [%] Tag 0: Cp/Sham $6,70 \pm 2,52$, $p < 0,05$ vs. NaCl/Sham; Cp/Immobilisation $8,75 \pm 8,24$, $p < 0,05$ vs. NaCl/Immobilisation; Maximum α_1 -AGP [mg/ml] Tag 0: Cp/Sham $1,41 \pm 0,55$, $p < 0,05$ vs. NaCl/Sham; Cp/Immobilisation $1,41 \pm 0,66$, $p < 0,05$ vs. NaCl/Immobilisation).

Das Gewicht [g] des M. tibialis cranialis zeigt bei Inflammation nach zwölf Tagen eine nahezu vollständige Erholung (Tag 12 Cp/Sham $0,79 \pm 0,06$), wohingegen nach reiner Immobilisation selbst nach 36 Tagen noch Einbußen zu erkennen sind (Tag 36 NaCl/Immobilisation $0,75 \pm 0,05$, $p < 0,05$ vs. NaCl/Sham).

Eine Immobilisation führt bei Messung der maximalen Einzelkontraktionskraft (Tag 36 Cp/Immobilisation $3,80 \pm 0,74$, $p < 0,05$ vs. Cp/Sham) und der maximalen tetanischen Kraft (Tag 36 Cp/Immobilisation $9,27 \pm 1,11$, $p < 0,05$ vs. Cp/Sham) zu einer Verringerung über die gesamte Erholungsphase. Bei Inflammation ist dieser Effekt nur vier Tage sichtbar.

Auch die Hochregulation der Azetylcholinrezeptoren hält nach Inflammation lediglich vier Tage an (Tag 4 Cp/Sham $33,21 \pm 15,51$), nach Immobilisation werden die Azetylcholinrezeptoren bis zu zwölf Tage exprimiert (Tag 4 NaCl/Immobilisation $159,98 \pm 71,31$, $p < 0,05$, vs. NaCl/Sham; Cp/Immobilisation $268,17 \pm 159,61$, $p < 0,05$, vs. Cp/Sham).

Schlussfolgerung: Chronisch systemische Inflammation alleine kann temporär eine Muskelschwäche bedingen und zu einer kurzfristigen Hochregulierung der Azetylcholinrezeptoren führen. Doch konnten wir in unserem Modell zeigen, dass die Immobilisation in der Erholungsphase nach CIM in viel höherem Maße für eine prolongierte Muskelschwäche und eine Hochregulierung der Azetylcholinrezeptoren verantwortlich ist.

7. Bibliographie

1. **Ali, H.H., Utting, J.E., Gray, T.C.:** Quantitative assessment of residual antidepolarizing block. I. Br J Anaesth 43 (1971): 473-477
2. **Ali, H.H., Utting, J.E., Gray, T.C.:** Quantitative assessment of residual antidepolarizing block. II. Br J Anaesth 43 (1971): 478-485
3. **Anderson, J., Almeida-Silveira, M.I., Perot, C.:** Reflex and muscular adaptations in rat soleus muscle after hindlimb suspension. J Exp Biol 202 (1999): 2701-2707
4. **Behbehani, N.A., Al-Mane, F., D'Yachkova, Y., Pare, P., FitzGerald, J.M.:** Myopathy following mechanical ventilation for acute severe asthma: the role of muscle relaxants and corticosteroids. Chest 115 (1999): 1627-1631
5. **Bolton, C.:** Neuromuscular manifestations of critical illness. Muscle and nerve 32 (2005): 140-163
6. **Bolton, C.F.:** Electrophysiologic studies of critically ill patients. Muscle Nerve 10 (1987): 129-135
7. **Bolton, C.F.:** Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations. Crit Care Med 24 (1996): 1408-1416
8. **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
9. **Chai, J., Wu, Y., Sheng, Z.Z.:** Role of ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia. Crit Care Med 31 (2003): 1802-1807
10. **Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K.:** Innere Medizin. Urban & Fischer 5. Auflage (2004): 1804-1805
11. **Coutinho, E.L., Gomes, A.R., Franca, C.N., Salvini, T.F.:** A new model for the immobilization of the rat hind limb. Braz J Med Biol Res 35 (2002): 1329-1332
12. **De Jonghe, B., Sharshar, T., Lefaucheur, J.P., Authier, F.J., Durand-Zaleski, I., Boussarsar, M., Cerf, C., Renaud, E., Mesrati, F., Carlet, J., Raphael, J.C., Outin, H., Bastuji-Garin, S.:** Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. JAMA 288 (2002): 2859-2867
13. **De Letter, M.A., Schmitz, P.I., Visser, L.H., Verheul, F.A., Schellens, R.L., Op de Coul, D.A., van der Meche, F.G.:** Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill patients. Crit Care Med 29 (2001): 2281-2286
14. **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
15. **Fink, H., Helming, M., Unterbuchner, C., Lenz, A., Neff, F., Martyn, J.A., Blobner, M.:** Systemic inflammatory response syndrome increases immobility-induced neuromuscular weakness. Crit Care Med 36 (2008): 910-916
16. **Fink, H., Lupp, 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
17. **Fletcher, S., Kennedy, D., Ghosh, I., Misra, V., Kiff, K., Coakley, G., Hinds, C.J.:** Persistent neuromuscular and neurophysiological abnormalities in long term survivors of prolonged critical illness In: Crit Care Med. 2003: 1012-1016. vol 31).
18. **Friedrich, O.:** Critical illness myopathy: what is happening? Curr Opin Clin Nutr Metab Care 9 (2006): 403-409
19. **Giannelli, G., De Marzo, A., Marinosci, F., Antonaci, S.:** Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy. Histol Histopathol 20 (2005): 99-106

20. **Gupta, R.C., Misulis, K.E., Dettbarn, W.D.:** Activity dependent characteristics of fast and slow muscle: biochemical and histochemical considerations. *Neurochem Res* 14 (1989): 647-655
21. **Herridge, M.S., Cheung, A.M., Tansey, C.M., Matte-Martyn, A., Diaz-Granados, N., Al-Saidi, F., Cooper, A.B., Guest, C.B., Mazer, C.D., Mehta, S., Stewart, T.E., Barr, A., Cook, D., Slutsky, A.S.:** One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 348 (2003): 683-693
22. **Hinder, F., Ludemann, P., Hinder, S., Ringelstein, E.B., Van Aken, H.:** [Prolonged muscle weakness in intensive care patients with special attention to the so-called intensive care polyneuromyopathy]. *Anaesthetist* 46 (1997): 211-219
23. **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
24. **Hund, E.:** Myopathy in critically ill patients. *Crit Care Med* 27 (1999): 2544-2547
25. **Hund, E.:** Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Neurol* 248 (2001): 929-934
26. **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
27. **Kim, C., Hirose, M., Martyn, J.A.:** d-Tubocurarine accentuates the burn-induced upregulation of nicotinic acetylcholine receptors at the muscle membrane. *Anesthesiology* 83 (1995): 309-315
28. **Lindner, A., Zierz, S.:** Auswirkungen der Sepsis auf das Nervensystem: Pathophysiologie, Klinik, Therapie der Critical-Illness-Encephalopathie, -Neuropathie und -Myopathie. 3. ed. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, (2000), S. Pages 29.
29. **Martyn, J.A.J., White, D.A., Gronert, G.A., Jaffe, R.S., Ward, J.M.:** Up-and-down regulation of skeletal muscle acetylcholine receptors. *Anesthesiology* 76 (1992): 822-843
30. **Metzger, J., Blobner, M., Lupp, P.B.:** Sensitive chemiluminescence immunoassay for the determination of rat serum alpha-1-acid glycoprotein. *Clin Chem Lab Med* 39 (2001): 514-518
31. **Minnaard, R., Drost, M.R., Wagenmakers, A.J., van Kranenburg, G.P., Kuipers, H., Hesselink, M.K.:** Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats. *Muscle Nerve* 31 (2005): 339-348
32. **Minnaard, R., Wagenmakers, A.J., Combaret, L., Attaix, D., Drost, M.R., van Kranenburg, G.P., Schaart, G., Hesselink, M.K.:** Ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic activity remains elevated after zymosan-induced sepsis in rats while muscle mass recovers. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005): 2217-2225
33. **Op de Coul, A.A., Verheul, G.A., Leyten, A.C., Schellens, R.L., Teepe, J.L.:** Critical illness polyneuromyopathy after artificial respiration. *Clin Neurol Neurosurg* 93 (1991): 27-33
34. **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
35. **Radell, P.J., Remahl, S., Nichols, D.G., Eriksson, L.I.:** Effects of prolonged mechanical ventilation and inactivity on piglet diaphragm function. *Intensive Care Med* 28 (2002): 358-364

36. **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
37. **Schwegler, J.S.:** *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. Thieme Verlag 3. Auflage (2002): 33-36
38. **Silbernagel, S., Klinke, R.:** *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme Verlag 4. Auflage (2003): 104-106
39. **Utkin Yu, N., Tsetlin, V.I., Hucho, F.:** Structural organization of nicotinic acetylcholine receptors. *Membr Cell Biol* 13 (2000): 143-164
40. **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
41. **Zarzhevsky, N., Coleman, R., Volpin, G., Fuchs, D., Stein, H., Reznick, A.Z.:** Muscle recovery after immobilisation by external fixation. *J Bone Joint Surg Br* 81 (1999): 896-901

8. Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eberhard Kochs, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München, für die zur Verfügung gestellten Rahmenbedingungen recht herzlich bedanken.

Großer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner, Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe „Sepsis und neuromuskuläre Übertragung“ und die in jeder Hinsicht engagierte Betreuung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Heidrun Fink. Danke für die Ideen, Inspiration und aufmunternden Worte in so manch anstrengender Phase der Versuche.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Projektpartner Herrn Dr. Marc Helming, Assistenzarzt der Technischen Universität München, für die sehr gute Zusammenarbeit, sowie auch Ratschläge und Korrekturvorschläge.

Auch Dr. Franziska Busch, die sich mühevoll mit der Histologie auseinandersetzte, gebührt mein Dank. Immer ein Lächeln und ein aufbauendes Wort parat, auch wenn es mal spät wurde.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium und die Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben und immer für mich da waren und an mich geglaubt haben.

Ebenso geht mein Dank an meinen Bruder, der mich in der langen Zeit der Versuche so manches Mal aufgebaut und motiviert hat.

Zuletzt noch eine Danksagung an meine Yasemin, die immer ein Lächeln für mich hatte und mir immer Zuversicht und Hoffnung gezeigt hat.

9. Lebenslauf

Name: Serkan Buyar

Geburtsdatum / -ort: 13. Oktober 1978 in München

Staatsangehörigkeit : deutsch

Familienstand : verheiratet (mit Yasemin Buyar)

Eltern : Durmus Buyar
Kibriye Buyar

Bruder : Hakan Buyar

1. Schulbildung:

1986 – 1990 Mariahilf Grundschule, München

1990 – 1998 Maria-Theresia-Gymnasium München mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur : 2,4)

2. Universität:

2000 – 2002 Vorklinik : Universität Regensburg

2002 - 2007 Klinik : Technische Universität München

Staatsexamen : Frühjahr 2007 (Note “gut”)

3. Beruf:

Seit 11 / 2007 Assistenzarzt in der Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
im Zentralklinikum Augsburg