

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

**Eine systemische Inflammation führt zu einer
Resistenz gegenüber Atracurium ohne Auswirkung
auf die Expression der Azetylcholinrezeptoren**

Heidrun Fink

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 13.04.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2004 angenommen.

Nichts trägt einen Sinn in sich; der wirkliche Sinn der Dinge liegt im Gefüge

Antoine de Saint-Exupéry

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Entwicklung von Muskelrelaxanzien.....	6
1.2. Neuromuskuläre Übertragung.....	7
1.3. Der Azetylcholinrezeptor.....	8
1.4. Der nikotinische Azetylcholinrezeptor des Skelettmuskels.....	9
1.5. Muskelrelaxanzien.....	11
1.5.1. Depolarisierende Muskelrelaxanzien.....	11
1.5.2. Nicht-depolarisierende Muskelrelaxanzien.....	12
1.6. Pharmakologische Variablen von Muskelrelaxanzien.....	12
1.7. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Muskelrelaxanzien.....	13
1.8. Resistenzen gegenüber Muskelrelaxanzien.....	14
2. Zielsetzung der Arbeit.....	16
3. Versuchstiere und Methoden.....	17
3.1. Versuchstiere.....	17
3.1. Tiermodell.....	17
3.2. Studienprotokoll.....	17
3.3. Anästhesie zum Versuch.....	18
3.4. Instrumentierung.....	19
3.5. Monitoring.....	20
3.6. Versuchsablauf.....	20
3.7. Laborchemische Analysen.....	23
3.7.1. Stickstoffmonoxid.....	23
3.7.2. α_1 -saures Glykoprotein.....	23
3.7.2.1. Chemilumineszenz Immunoassay.....	23
3.7.2.2. Züchtung der polyklonalen Kaninchen Anti-Ratten α_1 -AGP Antikörper.....	24
3.7.2.3. Präparation des biotinylierten Ratten α_1 -AGP als Tracer.....	24
3.7.2.4. Assayprotokoll.....	25

3.7.3.	Atracurium Gesamtplasmaspiegel	26
3.7.4.	Freie Atracurium Plasmaspiegel	27
3.8.	Azetylcholinrezeptorassay	28
3.9.	Statistik	30
4.	Ergebnisse	32
4.1.	Inflamationsparameter	32
4.2.	Modellstabilität	35
4.3.	Pharmakokinetik von Atracurium.....	35
4.4.	Expression des Azetylcholinrezeptors	40
5.	Diskussion.....	41
6.	Zusammenfassung	46
7.	Bibliographie	47
8.	Danksagung	50
9.	Lebenslauf.....	51

Abkürzungsverzeichnis

α_1 -AGP:	α_1 -saures Glykoprotein
α BTX:	α -Bungarotoxin
cpm:	counts pro Minute
EKG:	Elektrokardiogramm
ED:	Effektivitätsdosis
FiO ₂ :	inspiratorischer Sauerstoffanteil
HPLC:	high performance liquid chromatography
H ₂ SO ₄ :	Schwefelsäure
kDa:	Kilodalton
KG:	Körpergewicht
MW:	Molekulargewicht
NO:	Stickstoffmonoxid
NO ₂ /NO ₃ :	Nitrit/Nitrat
P _a O ₂ :	Sauerstoffpartialdruck
P _a CO ₂ :	Kohlendioxidpartialdruck
RI:	recovery interval
T ₀ :	Ausgangs-Kontraktionsamplitude der mechanomyographischen Messung
T ₁ :	Kontraktionsantwort zum Zeitpunkt T ₁

1. Einleitung

1.1. Entwicklung von Muskelrelaxanzien

Die Geschichte der Muskelrelaxanzien reicht zurück in die Kultur der Indianer im Amazonasdelta. Dort wurden Curareextrakte aus der Pflanze *Chondrodendron tomentosum* gewonnen und als Pfeilgift zu Jagd verwendet (D'Anghiera 1516, S. 154-155). Die pharmakologische Wirkung des Giftes wurde jedoch erst im 19. Jahrhundert von Claude Bernard (1811 – 1878) untersucht. Er fand heraus, dass Curare einen Muskel für Nervenimpulse unempfindlich macht und ihn lähmen. Eine Kontraktion des Muskels ist aber durch eine direkte Reizung weiterhin möglich. Bernard schloss daraus, dass die Wirkung auf einer Übertragungshemmung der Nervenimpulse beruht (Bernard 1864, S. 164-190; Bernard 1857, S. 311-324). Diese Entdeckung stellt einen Meilenstein in der Erforschung der Schnittstelle zwischen Nerv und Muskel dar: der neuromuskulären Endplatte. Erste dokumentierte Anwendung im klinischen Gebrauch fand Curare im Jahre 1912 durch Artur Läwen (1876 – 1958), welcher als Chirurg bereits damals monierte: „ein großer Übelstand bei oberflächlicher Narkose ist der, dass die Kranken, namentlich bei der Bauchdeckennaht, die Bauchdeckenmuskulatur übermäßig anspannen.“ Abhilfe war auch damals schnell gefunden: „Ich habe bisher Erwachsenen die Curarinlösungen ... subkutan oder intramuskulär ... in der größten Dosis von 0,8 mg gegeben. Bei dieser Dosierung war die Wirkung bei der Bauchdeckennaht sehr angenehm“ (Läwen 1912, S. 168-180). Zu beachten bleibt aber, dass ein gesicherter Atemweg und eine kontrollierte Beatmung zur damaligen Zeit gänzlich unbekannt waren und Läwens Patienten trotz Curareinjektion wohl spontan atmeten. Erst in den 40er Jahren des 19ten Jahrhunderts fand ein Curarepräparat in Amerika weitverbreitete klinische Anwendung in der Anästhesie (Griffith 1942, S.

418). Der eigentliche Wirkstoff des Curare wurde 1943 als d-Tubocurarin identifiziert (Wintersteiner 1943, S. 467). Die Weiterentwicklung der Muskelrelaxanzien führte mit der Herstellung einer ganzen Palette unterschiedlicher Medikamente dazu, dass Muskelrelaxanzien heutzutage im Rahmen des Konzeptes der balancierten Anästhesie routinemäßig verwendet werden. Sie erleichtern durch die reversible medikamentöse Paralyse der Patienten die endotracheale Intubation und verbessern die operativen Bedingungen. In der Intensivmedizin werden Muskelrelaxanzien gelegentlich angewandt, um eine maschinelle Beatmung der Patienten zu erleichtern, den Sauerstoffverbrauch zu senken und Anstiege des intrakraniellen oder intrathorakalen Druckes abzuschwächen, wie sie während Husten und Pressen der Patienten, zum Beispiel während endotrachealer Absaugung, auftreten können.

1.2. 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 Endplatte. Um Signale des Nerven auf den Muskel zu übertragen, bedarf es Botenstoffe (Transmitter); im Falle der neuromuskulären Endplatte ist dies das Acetylcholin. Wenn ein Aktionspotential des Axons das präterminale Nervenende erreicht, fusionieren Acetylcholin enthaltende Vesikel mit der präsynaptischen Axonmembran und entleeren Acetylcholin exozytotisch in den neuromuskulären Spalt. Acetylcholin diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an postsynaptische Acetylcholinrezeptoren der Muskeloberfläche. Diese Bindung des Acetylcholins 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. 824).

1.3. 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 α - und β -Untereinheiten in einer zwei zu drei Stoichiometrie ($\alpha_{2n}\beta_n$) aufgebaut. Es gibt mindestens sieben verschiedene neuronale α -Untereinheiten (α_2 - α_8) und drei neuronale β -Untereinheiten (β_2 - β_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, weisen jedoch

Homologien zwischen 37% und 57% auf, was vermuten läßt, dass sie aus einem einzelnen Vorläufergen entstanden sind (Utkin Yu 2000, S. 145-146).

1.4. Der nikotinische Azetylcholinrezeptor des Skelettmuskels

Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschliesslich mit der Expression des nikotischen Azetylcholinrezeptors der Skelettmuskulatur, welcher im Folgenden etwas näher beschrieben wird. Der nikotinische Azetylcholinrezeptor der Muskeloberfläche ist ein pentamerisches Glykoprotein bestehend aus zwei α -, und je einer β - und δ -Untereinheit sowie entweder einer γ - oder einer ε -Untereinheit. Die Untereinheiten der Rezeptoren haben Molekülmassen zwischen 45 und 60 kDa, was ein Molekulargewicht von etwa 295 kDa für den Azetylcholinrezeptorkomplex ergibt. Diese fünf Untereinheiten bilden einen transmembranösen Rezeptor. Nach Bindung von zwei Molekülen Azetylcholin an die beiden α -Untereinheiten öffnet der Rezeptorkanal seine Pore und ermöglicht so eine Ionenverschiebung zwischen intra- nach 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 zur Verfügung.

In einem gesunden, innervierten Muskel sind die Azetylcholinrezeptoren streng auf die neuromuskuläre Endplatte begrenzt. Kommt es jedoch zu einem Stopp an neuronalen Einflüssen oder Aktivitäten, wie nach einer Denervierung, langandauernder Immobilisation oder Verbrennungsverletzungen, exprimiert der Muskel Rezeptoren, in denen die ϵ -Untereinheit durch ein γ -Untereinheit ersetzt worden ist. Diese Rezeptorkonfiguration entspricht derjenigen eines Fötus, bei dem sich noch keine neuromuskulären Synapsen gebildet haben. Sie wird daher auch fötaler, 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) werden deutlich langsamer umgesetzt als unreife (Halbwertszeit ca. 24 Stunden). Fötale 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 oder Denervierung durch die Gabe des Azetylcholinrezeptoragonisten Succinylcholin lebensgefährliche Hyperkaliämien entwickelt haben (Gronert 1999, S. 320; Kohlschütter 1976, S. 557; Tobey 1970, S. 359). Diese Konstellation wird begünstigt durch die Tatsache, dass die fötalen Azetylcholinrezeptoren eine viel höhere Affinität zu Agonisten wie Azetylcholin oder Succinylcholin haben. Bereits ein Zehntel bis ein Hundertstel der

normalen Dosierung bewirkt eine Depolarisation der fötalen Rezeptoren (Martyn 1992, S. 824).

1.5. 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).

1.5.1. Depolarisierende Muskelrelaxanzien

Das einzig klinisch verwendete depolarisierende Muskelrelaxans ist Succinylcholin. Strukturell ist Succinylcholin die Verbindung von zwei Azetylcholinmolekülen. 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 hydrolysiert.

1.5.2. Nicht-depolarisierende Muskelrelaxanzien

Nicht-depolarisierende Muskelrelaxanzien binden ebenfalls 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.

Unter den nicht-depolarisierenden Muskelrelaxanzien nimmt Atracurium hinsichtlich seines Abbauweges eine Sonderstellung ein. Atracurium wird weitestgehend unabhängig von hepatischer und renaler Funktion mittels der Hofmannschen Hydrolyse eliminiert. Hauptdeterminanten dieses spontanen Zerfalls des Moleküls sind Temperatur und pH-Wert. Bei höheren Temperaturen und höheren pH-Werten wird Atracurium schneller degradiert.

1.6. 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.

Recovery interval: Der recovery interval (RI) beschreibt die Abklinggeschwindigkeit eines Muskelrelaxans. Er ist definiert als die Zeit, welche die Reizantwort benötigt, um sich nach kompletter neuromuskulärer Blockade ($T_1 = 0\%$) von 25% auf 75% zu erholen.

1.7. 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.

1.8. Resistenzen gegenüber Muskelrelaxanzien

Resistenzen gegenüber nicht-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 Resistenzen machen sich klinisch bemerkbar als verlängerte Anschlagszeit eines Muskelrelaxans, inkomplette neuromuskuläre Blockade oder schnelle Erholung nach kompletter Paralyse. Mehrere pharmakokinetische und pharmakodynamische Faktoren, einschließlich der Möglichkeit der Erhöhung der Anzahl der Azetylcholinrezeptoren auf der Muskeloberfläche können potentielle Erklärungen für die beobachteten Resistenzen liefern. Kommt es zu einer Erhöhung der Anzahl der Rezeptoren, so ist entsprechend mehr Muskelrelaxans nötig, um die kompetitive Balance zu Gunsten des Muskelrelaxans ausfallen zu lassen. Die beschriebenen Resistenzen könnten jedoch auch durch eine erhöhte Plasmaproteinbindung des Muskelrelaxans erklärt werden (Garcia 1995, S. 1021). Im Zeitverlauf von Entzündungsreaktionen erhöhen sich die Plasmaspiegel von sog. Akut-Phase Proteinen, wie z.B. dem α_1 -sauren Glykoprotein (α_1 -AGP), welches Kationen, also auch Muskelrelaxanzien bindet (Kremer 1988, S. 5-10; Martyn 1984, S. 538).

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 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.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer Infektion auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans Atracurium zu untersuchen. Anhand eines etablierten Tiermodells, in dem die intravenöse Injektion von *Corynebakteria parva* Bakterien zu einer systemischen Inflammation führt (Cummins 1974, S. 436-438; Farquhar 1983, S. 1277-1278), werden dabei folgende Fragen bearbeitet:

- (1) die neuromuskulären Effekte von Atracurium während einer systemischen Inflammation,
- (2) der Einfluss des zeitlichen Ablaufes der Inflammation auf die Atracurium Pharmakokinetik und
- (3) die Bedeutung der Azetylcholinrezeptoren und des Akut-Phase-Proteins α_1 -AGP für die Atracurium Pharmakokinetik.

3. Versuchstiere und Methoden

3.1. Versuchstiere

Nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-70/97) wurden 99 männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River GmbH, Kisslegg) mit einem Ausgangsgewicht von 250 - 300 g in unseren Tierversuchsställen angeliefert. Eine Akklimatisierungszeit von 14 Tagen erlaubte den Tieren eine Anpassung an die Umgebung, sowie einen mikrobiellen Abgleich der Tiere untereinander. Futter und Trinken wurden den Tieren zu jeder Zeit angeboten.

3.1. Tiermodell

Als Modell für die systemische Inflammation diente eine Injektion der Ratten mit hitzeinaktivierten *Corynebacteria parva* Bakterien. Dazu wurde den Ratten 56 mg/kg einer Suspension aus hitzeinaktivierten *Corynebacteria parva* (Roche, Penzberg) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml in die Vena dorsalis penis injiziert. 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). Da im Rahmen der granulomatösen Entzündung der Leber die Aktivität der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase steigt und vermehrt NO gebildet wird, dient die Konzentration der stabilen Stickstoffmonoxidendprodukte Nitrit und Nitrat ($\text{NO}_2 / \text{NO}_3$) als Parameter für die Infektion. Die Ratten der Kontrollgruppe erhielten eine Injektion von 0,5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung.

3.2. Studienprotokoll

Nach der Infektion wurden die Ratten randomisiert in eine von 8 Gruppen eingeteilt. Um den Zeitverlauf der Infektion und deren Auswirkung auf die Pharmakodynamik

von Atracurium zu untersuchen, wurden je 11 Ratten pro Gruppe (= Tag) am Tag 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, oder 16 nach der Infektion untersucht. Die Untersuchung der Kontrollgruppe erfolgte 2 Tage nach der Kochsalzinjektion.

Die *in vivo* Parameter, welche am jeweiligen Versuchstag gemessen wurden, beinhalteten die Pharmakodynamik von Atracurium sowie Plasmaspiegel von α_1 -AGP und NO₂/NO₃. *In vitro* wurde die Expression der Azetylcholinrezeptor auf dem Muskelus gastrocnemius bestimmt.

Die individuelle Gruppengröße verkleinerte sich, da während der Narkoseeinleitung und der chirurgischen Präparation einige Tiere verstarben. Ebenfalls konnte bei Tieren, die zu Versuchsbeginn hämodynamisch instabil, respiratorisch insuffizient oder metabolisch entgleist waren, keine Messungen durchgeführt werden. Im Endeffekt bedeutete dies folgende Gruppenreduktion: insgesamt absolvierten 69 Ratten den Versuch: 8 Tiere am Tag 2; 11 am Tag 4; 8 am Tag 6; 7 am Tag 8; 8 am Tag 10; 6 am Tag 12; 8 am Tag 14; 5 am Tag 16, und 8 Tiere in der Kontrollgruppe.

3.3. Anästhesie zum Versuch

Die Narkose wurde durch Inhalation von Sevofluran in einem Glassturz eingeleitet. Für die Injektion der Bakterien war diese Inhalationsanästhesie ausreichend. Die Tiere atmeten die gesamte Zeit spontan und wachten wenige Sekunden nach Entfernen aus dem Glassturz wieder auf. Die 5 - 10 Sekunden chirurgisches Toleranzstadium sind ausreichend, um die Bakterien für die Tiere schmerzlos zu injizieren. Für die Messung am entsprechenden Versuchstag wurden die Tiere nach Erreichen des Toleranzstadiums endotracheal intubiert. Als Tubus diente eine zurechtgeschnittene Cavafix[®] Kanüle (14-18 G, Braun, Melsungen). Für die Zeitdauer des gesamten Versuchs wurden die Tiere

volumenkontrolliert beatmet (Small Animal Ventilator, Harvard Apparatus, Natick, USA). 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 ($P_a\text{CO}_2$) zwischen 36 und 40 mmHg befand. Die Anästhesie wurde primär mit 4 - 6% Sevofluran in einem Sauerstoff - Luft Gemisch (FiO_2 : 40%) aufrechterhalten. Da Sevofluran selbst eine inhibierende Wirkung auf den Azetylcholinrezeptor besitzt, wurde nach Kanülierung der linken Vena jugularis externa die Narkose auf die intravenöse Gabe von Fentanyl ($4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) und Propofol ($20 - 40 \text{ mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) umgestellt. Die Narkosetiefe wurde anhand kardiovaskulärer Werte beurteilt und bei Bedarf angepasst.

3.4. Instrumentierung

Nach der Intubation wurden die Ratten auf dem Rücken gelagert. Die linke Vena jugularis externa wurde freipräpariert und mit 2 Kathetern kanüliert. Über einen Katheter wurden die intravenösen Narkosemittel Propofol und Fentanyl kontinuierlich infundiert, der andere Katheter diente als Injektionsmöglichkeit für weitere Medikamente, wie z.B. Natriumbikarbonat zum Ausgleich eines negativen Basenüberschusses. Die rechte Vena jugularis externa wurde ebenfalls kanüliert und diente als Injektionsschenkel für Atracurium. In der linken Arteria carotis wurde der Blutdruck invasiv kontinuierlich gemessen. Ebenso dient der arterielle Verweilkatheter als Entnahmestelle für arterielles Blut zur Blutgasanalyse.

Die neuromuskuläre Funktion wurde mit evozierter Mechanomyographie (Myograph, Biometer, Kopenhagen, Dänemark) gemessen. Der linke Nervus ischiadicus wurde so weit proximal als möglich freipräpariert und mit Reizelektroden versehen. Durch beide

Femurkondylen des linken Knies wurde ein Kirschnerdraht gebohrt, der über eine hufeisenförmige Apparatur nach kranial fixiert wurde. Die Sehne des linken Muskulus gastrocnemius wurde freipräpariert und mit Hilfe von Vicrylfäden nach kaudal an den Kraftaufnehmer des Mechanomyographen befestigt. Fixiertes Knie, Muskulus gastrocnemius und Kraftaufnehmer bildeten somit eine Gerade.

3.5. Monitoring

Um stabile hämodynamische Verhältnisse während des gesamten Versuchsablaufs zu garantieren, wurden Herzfrequenz (mittels subkutaner EKG Elektroden) und mittlerer arterieller Druck kontinuierlich kontrolliert. Die rektale Temperatur wurde unter zu Hilfenahme einer Wärmedecke und einer Heizlampe zwischen 36,8 und 37,2 °C konstant gehalten. Ein stabiler Gasaustausch wurde durch konstante arterielle Sauerstoffpartialdrücke (P_{aO_2}) > 100mmHg, P_{aCO_2} innerhalb eines Intervall von 36 und 40 mmHg sowie einem Basenüberschuss zwischen -4 und 0 mM gewährleistet. Falls nötig, wurden Abweichungen in pH, P_{aCO_2} oder Basenüberschuss durch Anpassung des Atemminutenvolumens und/oder mit 1mM Natriumbikarbonat behandelt.

3.6. 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 schliessen wir einen 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 im „train of four“ Muster (2 Hz für 2 Sekunden alle 12 Sekunden) stimuliert und die Kontraktionsantwort des Gastrocnemius Muskels mittels eines Schreibers auf skaliertem Papier dokumentiert. Die supramaximale Stimulationsstärke und die Ausgangs-Kontraktionsamplitude T_0 wurden bestimmt. Die Muskelkontraktionen wurde über einen Zeitraum von 10 min aufgezeichnet. Danach wurde für jede Ratte die individuelle Dosis-Wirkungskurve für Atracurium mit Hilfe der kumulativen Dosis-Wirkungsmethode bestimmt (Ward 1993, S. 350): Einzeldosen von Atracurium zwischen 0,2 und 0,8 mg/kg Körpergewicht wurden den Ratten intravenös verabreicht. Die jeweils folgende Dosis wurde erst verabreicht, wenn die maximale Wirkung der vorangegangenen Dosis erreicht war, erkennbar an 3 aufeinanderfolgenden gleich hohen Kontraktionsantworten T_1 . Die Einzeldosen wurden nacheinander injiziert, bis $T_1 < 5\% T_0$ war. Es wurde versucht, die kumulative Dosis-Wirkungskurve mit 3 - 5 Einzeldosen von Atracurium zu etablieren, um in weniger als 3 min ein $T_1 < 5\% T_0$ zu erreichen. Nach der letzten Dosis Atracurium erholte sich die Kontraktionsantwort auf Ausgangswerte ($T_1 = 100\%$). Das recovery interval wurde anhand der folgenden Gleichung kalkuliert: $RI [s] = \text{Zeit } (T_1/T_0 = 75\%) - \text{Zeit } (T_1/T_0 = 25\%)$. Nach vollständiger Erholung von T_1 wurde eine kontinuierliche Infusion mit Atracurium begonnen. Arterielle Blutgase und hämodynamische Parameter wurden erneut erfasst. Die Infusionsrate wurde so titriert, dass eine konstante Kontraktionsantwort von $T_1/T_0 = 50\%$ erreicht wurde. Nach einem Zeitintervall von 10 min mit stabilem $T_1/T_0 (50\% \pm 2)$ und unveränderter Infusionsrate wurden steady state Bedingungen angenommen (siehe Abbildung 1).

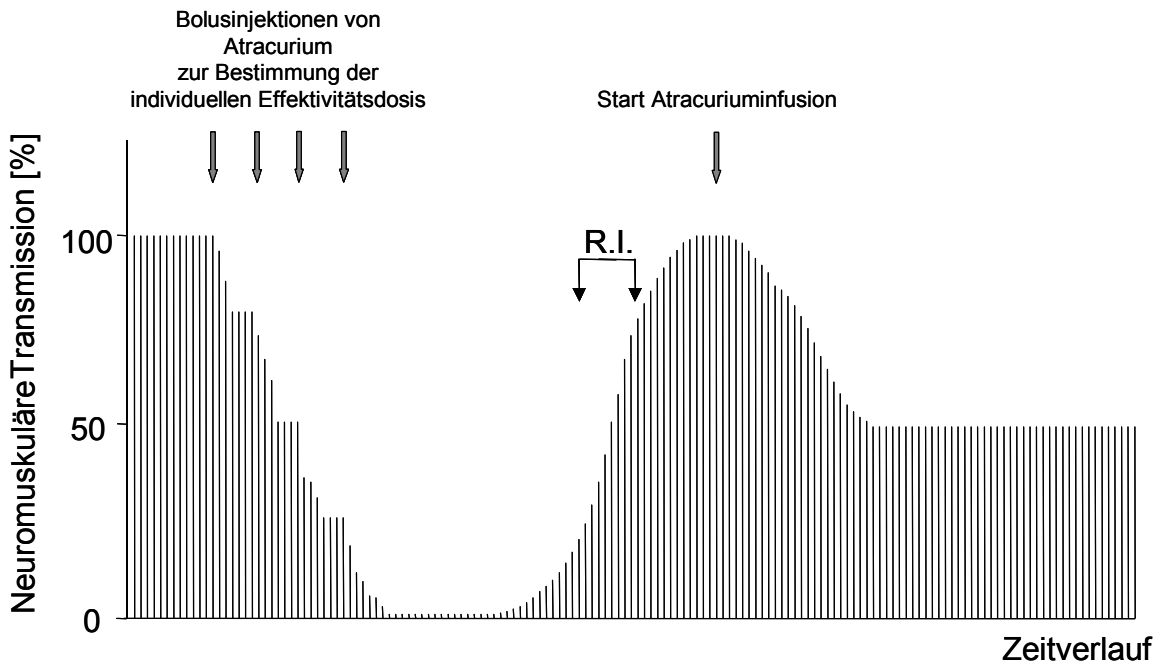


Abbildung 1: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Messungen zur Pharmakodynamik von Atracurium.

Die nötige Infusionsrate wurde dokumentiert und 1 ml heparinisiertes Blut zur Bestimmung der Atracurium Gesamtplasmaspiegel entnommen. Das Vollblut wurde sofort mit 20 μ l 1M H_2SO_4 versetzt und zentrifugiert (3,500 Umdrehungen pro min, 10 min, 4°C). Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und jeweils 0,2 ml mit 0,8 ml 15 mM H_2SO_4 versetzt. Die Ansäuerung der Proben verhindert den Abbau des Atracuriums im Plasma. Die derart aufbereiteten Proben wurden dann sofort bei -70°C eingefroren. Darauffolgend wurden beide Gastrocnemius Muskeln freipräpariert, entnommen, sofort in vorgekühltem Isopentan tiefgefroren und bei -70°C gelagert. Danach wurden die Tiere in Narkose durch Entbluten getötet. Das dabei entnommene heparinisierte Vollblut wurde zentrifugiert (3,500 Umdrehungen pro min, 10 min, 4°C) und das Plasma abpipettiert. Das Plasma wurde für die späteren Analysen von α_1 -AGP and NO_2/NO_3 -Plasmaspiegeln ebenfalls bei -70°C tiefgefroren.

3.7. Laborchemische Analysen

3.7.1. Stickstoffmonoxid

Nach Injektion von hitzeinaktivierten *Corynebacteria parva* Bakterien exprimieren in erster Linie Makrophagen die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase. Diese generiert das Radikal Stickstoffmonoxid (NO). Durch die hohe Reaktivität und Instabilität von NO ist der direkte Nachweis der erhöhten Spiegel aufwendig und kann nur für einen definierten Augenblick gelingen. Daher wurden in diesem Versuch die stabilen Endprodukte NO₂/NO₃ bestimmt. Die tiefgefrorenen Plasmaproben wurden aufgetaut und mit 0,5 M NaOH and 10 % ZnSO₄ deproteinisiert. NO₃ wurde mittels HPLC (high performance liquid chromatography) durch eine Cadmium Säule in NO₂ konvertiert. Die NO₂ Konzentration wurde spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm unter Zuhilfenahme einer Methode, basierend auf der Griessschen Reaktion, bestimmt (Archer 1993, S. 350-352).

3.7.2. α_1 -saures Glykoprotein

3.7.2.1. Chemilumineszenz Immunoassay

Zur Bestimmung der α_1 -AGP Spiegel wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Peter Lippa, Institut für Klinische Chemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, eigens für diese Untersuchungen ein sensitiver Chemilumineszenz Immunoassay etabliert. Der Assay basiert auf einem Antigen Capture Assay mit biotinyliertem Ratten α_1 -AGP als Tracer. Im Nachfolgenden werden die wichtigsten Schritte des Assays aufgeführt.

3.7.2.2. Züchtung der polyklonalen Kaninchen Anti-Ratten α_1 -AGP Antikörper

Vier deutschen Landkaninchen wurden 500 μ l Antigenlösung, bestehend aus 100 μ g Ratten α_1 -AGP gelöst in 500 μ l Freudschem Adjuvans, subkutan injiziert. Nach 14 Tagen wurden die Kaninchen mit der selben Menge Antigenlösung plus 500 μ l inkomplettem Freudschen Adjuvans geboostert. Weitere 4 Wochen später wurden die Kaninchen in Narkose entblutet und getötet. Das gewonnene Blut wurde zentrifugiert (3500 Umdrehungen pro min, 15 min, 4 °C). Das derart erhaltene Antiserum mit den Kaninchen Anti-Ratten α_1 -AGP Antikörper wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C tiefgefroren.

3.7.2.3. Präparation des biotinylierten Ratten α_1 -AGP als Tracer

Ratten α_1 -AGP (Sigma, Deisenhofen) wurde in Phosphat gepuffertem Kochsalz (Endkonzentration: 1mg α_1 -AGP/ml) aufgelöst. Biotinylierung des Ratten α_1 -AGP erfolgte durch Zugabe von Biotin-N-hydroxysuccinimid (Roche, Mannheim) in 50-fachem Überschuss. Die Mischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Rotationsplattform inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan im Überschuss gestoppt. Das biotinylierte Protein wurde durch eine Sephadex G-25 Säule durch Größenausschluss-Chromatographie (Amersham Pharmacia, Freiburg), gefolgt von einer reverse phase HPLC durch eine 5 μ m C₁₈-Säule (Machery und Nagel, Düren) gereinigt. In einem linearen Gradienten der Elutionslösungen A (0,05 % Trifluoroacetoacetat in destilliertem Wasser) und B (0,05 % Trifluoroacetoacetat in Acetonitril) von 15% nach 85% in 30 min wäscht sich das biotinylierte Ratten α_1 -AGP 90 Sekunden nach dem nativen Protein aus (Flussrate 1ml/min). Die homogene Spritzenfraktion wurde gesammelt. Nach Lyophilisierung

wurde das biotinylierte Ratten α_1 -AGP in einer Konzentration von 1 mg/ml in Phosphat gepuffertem Kochsalz gelöst.

3.7.2.4. Assayprotokoll

Beschichten der Mikrotiterplatte mit den Ziege Anti-Kaninchen Catcher Antikörper:

Die Beschichtung der Vertiefungen (wells) der Mikrotiterplatten (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) erfolgte mit 5 μ g/well Ziege Anti-Kaninchen Immunglobulinen (Dako, Hamburg) in 250 μ l Phosphat-gepufferten Kochsalz. Die Platten wurden dazu in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 20 Stunden inkubiert.

Blockade unspezifischer Bindung der Antikörper: Um eine unspezifische Bindung der Anti-Ratten α_1 -AGP Antikörper an den Plastikwänden der wells zu verhindern, wurden dieselbigen mit 250 μ l/well Blockierpuffer (2%igem Kälberserumalbumin in Phosphat-gepuffertem Kochsalz) auf einer Rotationsplattform bei 37 °C für 60 min inkubiert.

Inkubation mit Kaninchen Anti-Ratten α_1 -AGP Antikörper: Die wells wurden mit je 200 μ l einer 20,000fachen Verdünnung der Anti-Ratten α_1 -AGP Antikörper in 0,5%igem Kälberserumalbumin (gelöst in Phosphat-gepuffertem Kochsalz) bei 37 °C für 60 min inkubiert.

Auftragung der Standardreihe und Proben: Je 100 μ l der 8 Verdünnungen der Standardreihe (0; 0,01; 0,5; 1; 5; 10; 100 500 mg/ml) sowie 1:50 und 1:500 Verdünnungen der Proben wurden in die, wie oben beschrieben, vorbehandelten wells gegeben. Verdünnungsmedium war jeweils 0,5%iges Kälberserumalbumin. Es folgte die Zugabe von 1 μ g konzentriertem Tracer. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37°C 60 min inkubiert. Die Platten wurden danach viermal mit einer Borat-Waschlösung

(Amerlite System, Ortho Clinical Diagnostics, Neckargmünd) gewaschen, um ungebundene Reagenzien zu entfernen.

Zugabe des Meerrettichperoxidase-Streptavidin: Als Signalgeber wurde Meerrettichperoxidase-Streptavidin in 0,5%igem Kälberserumalbumin in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml jedem well hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten wurden erneut für 10 min bei 37°C inkubiert. Es folgten 4 Waschgänge mit der o. g. Borat-Waschlösung.

Zugabe des Signalreagenz, Messung und Datenverarbeitung: Die Chemilumineszenz (Signalgebung) einer jeden Probe wurde 250 µl Luminol/Enhancer Signalreagenz (Amerlite Systems) pro well ausgelöst und 2 min nach der Zugabe mittels Luminometer gemessen. Die Datenverarbeitung und die Kurvenanpassung mit Spline Funktion wurden mit Hilfe des Packard Securia II Programms durchgeführt.

3.7.3. Atracurium Gesamtplasmaspiegel

Atracurium Plasmaspiegel wurden mittels HPLC bestimmt. 20 µg Verapamil wurde als interner Standard den angesäuerten Plasmaproben (200 µl Serum + 800 µl 15 mM H₂SO₄) zugefügt. Die Proben wurden mit 1 ml Acetonitril deproteinisiert und bei 5000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurde in eine HPLC Säule injiziert (RP18, LiChrospher, 5 µm, 100 mm, 4.6 ID; Merck, Darmstadt). Atracurium wurde mittels eines linearen Gradientenelutionssystems separiert: von A nach 100 % B in 8 min. A (Acetonitril 23,5 ml, 5 ml Methanol und 0,03 M K₂HPO₄, 57,5 ml, äquilibriert auf einen pH von 5), B (Acetonitril 35,5 ml, Methanol 15 ml und 0,1 M K₂HPO₄, 47,5 ml, äquilibriert auf einen pH von 5), Flussrate 1,7 ml/min, Fluoreszenznachweis bei 240 nm Exzitation und 320 nm Emission. Eine Kalibrierungslösung wurde aus den gleichen Substanzen mit 5,0, 15,0 and 24,0 µg/ml

Atracurium und 1,0, 2,0 und 3,0 $\mu\text{g/ml}$ Laudanosin in 0,005 M H_2SO_4 , pH 2.5 hergestellt. Die Atracurium Plasmaclearance berechneten wir während steady state Bedingungen mit der Gleichung: Clearance = Infusionsrate / Plasmaspiegel.

3.7.4. Freie Atracurium Plasmaspiegel

Der Einfluss veränderter α_1 -AGP Konzentrationen auf die Plasmaproteinbindung (oder die freie Fraktion) von Atracurium wurde post-hoc in den, durch die Entblutung der Tiere gewonnenen Plasmaproben bestimmt. Es wird erwartet, dass die Atracurium Gesamtspiegel in diesen (nicht angesäuerten) Proben niedriger sind als die Plasmaspiegel zum Zeitpunkt der konstanten 50% neuromuskulären Blockade. Die niedrigere Konzentration lässt sich erklären durch den Zeiteffekt der späteren Probengewinnung (während des Entblutens) und dem spontanen Zerfall von Atracurium bei dem physiologischen pH von 7,4 bei Raumtemperatur aber auch während der Lagerung bei -70°C . Die Bindungsmöglichkeiten an Plasmaproteine blieben jedoch erhalten. Es wurde deshalb jede Plasmaprobe in 2 Portionen geteilt: In einem Teil wurden die Atracuriumspiegel nativ, d.h. in der Konzentration, in der sie zu dem Zeitpunkt waren gemessen. Der andere Teil wurde auf 37°C erwärmt und mit einer beliebigen Menge Atracurium versetzt. In beiden Proben (nativ und Atracurium angereichert) wurde sowohl der Gesamtplasmaspiegel als auch der Plasmaspiegel des gebundenen Atracuriums gemessen. Für die Bestimmung des proteingebundenen Anteils wurde das Atracurium von der ungebundenen Fraktion mittels Mikrodialyse (Pierce, Rockford, IL, USA) mit einer entsprechenden Membran (maximales Molekulargewicht 8 kDa) getrennt. Eine 0,08 M Phosphatpufferlösung, pH 7,2, diente als Dialyselösung. Alle Plasmaproben wurden bei Zimmertemperatur für 40 min dialysiert. Die Plasmaspiegel des gebundenen und gesamten Atracuriumanteils wurden

mit der gleichen HPLC Methode bestimmt wie die oben beschriebenen Atracuriumgesamtspiegel. Die freie Atracuriumfraktion wurde mit der Gleichung: Freie Atracuriumfraktion = $1 - (\text{gebundene Plasmaspiegel} / \text{Gesamtplasmaspiegel})$ berechnet und der Mittelwert der beiden Probenteile bestimmt. Die Plasmaspiegel der freien Atracuriumfraktion für die steady-state Bedingungen bei einer 50%igen neuromuskulären Blockade wurden sodann aus den unter diesen Bedingungen bestimmten Gesamtplasmaspiegeln, multipliziert mit der freien Atracuriumfraktion, berechnet.

3.8. Azetylcholinrezeptorassay

Die Oberflächenexpression der Azetylcholinrezeptoren wurde mittels ^{125}I - α -Bungarotoxin (^{125}I - α BTX) Bindung quantifiziert (Ibebunjo 1999, S. 275-285). α BTX (Molekulargewicht [MW] = 8000), ein Extrakt aus dem Kobragift, ist ein spezifischer Ligand des Azetylcholinrezeptors, der irreversibel an den Rezeptor bindet. Durch Konjugation des α BTX mit einem geeigneten Marker, wie z.B. ^{125}I , lässt sich die Menge der Azetylcholinrezeptoren indirekt über die Messung der γ -Emission quantifizieren.

Die gefrorenen Gastrocnemius 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 DC-Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bestimmt. Die ^{125}I - α BTX Bindung an die gelösten Azetylcholinrezeptoren wurde in einem dreifach Ansatz aus dem Extrakt analysiert. In drei Reagenzgläsern wurden je 100 μl Muskelextrakt mit 2.5 nM ^{125}I - α BTX (spezifische Aktivität $\sim 16,8 \mu\text{Ci } \mu\text{g}^{-1}$, NEN, Boston MA) bei Zimmertemperatur für 90 min inkubiert. Überschüssiges, nicht gebundenes ^{125}I - α BTX wurde von ^{125}I - α BTX-Azetylcholinrezeptorkomplexen mittels Vakuumfiltration durch Whatman GF/B Glasfaserfilter, getränkt in 10%iger Polyethylenimin Lösung, getrennt. Um Bindung von ^{125}I - α BTX an Proteinen ausserhalb des Azetylcholinrezeptors zu bestimmen, musste die sogenannte „unspezifische Bindung“ zusätzlich bestimmt werden. Dies wurde ebenfalls in einem 3-fach Ansatz durchgeführt. Vor der Inkubation mit ^{125}I - α BTX wurden je 100 μl Muskelextrakt mit nicht-radioaktivem α BTX versetzt. Das nicht radioaktiv markierte BTX bindet an Azetylcholinrezeptor ohne dabei später ein radioaktives Signal abzugeben. Die erst nachträglich hinzugefügte radioaktive ^{125}I - α 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}I - αBTX und den cpm anhand folgender Schritte berechnet:

1. Molare Konzentration von ^{125}I - αBTX :

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

2. Korrektur für radioaktiven Zerfall:

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

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

$$\text{DPM Äquivalent} = \frac{\text{Konzentration } ^{125}\text{I-}\alpha\text{BTX [M]}}{(\text{Gesamtaktivität}_{\text{Zerfall}} [\mu\text{Ci}] \times 2,22 \times 10^6) \times 10^{-15}}$$

Anmerkungen: 1 $\mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6$ (Konstante)
Division mit 10^{-15} konvertiert das Ergebnis von mol zu fmol

4. Konzentration der Azetylcholinrezeptoren in 100 μl Muskelextrakt:

$$\text{cpm (spezifisch – unspezifisch)} \times \text{DPM Äquivalent} = \frac{\text{Azetylcholinrezeptoren}}{[\text{fmol} / 100\mu\text{l Extrakt}]}$$

5. Expression des Azetylcholinrezeptors:

$$\text{Azetylcholinrezeptorexpression} \frac{[\text{fmol}/\text{mg Protein}]}{=} \frac{\text{Azetylcholinrezeptoren } [\text{fmol} / 100\mu\text{l Extrakt}]}{\text{Proteinkonzentration } [\text{mg}/100\mu\text{l}]} \times 10$$

3.9. Statistik

Die individuellen Atracuriumeffektivitätsdosen um eine 50%, respektive 95% neuromuskuläre Blockade zu erzielen (ED_{50} und ED_{95}) wurden anhand der jeweiligen kumulativen Dosis-Wirkungsbeziehung berechnet. Dies geschah durch Interpolation der linearen Regression der prozentualen Blockade in logit und dem Logarithmus der jeweiligen kumulativen Atracuriumdosis.

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung präsentiert. Die statistische Auswertung wurde mit faktoriellen ANOVA durchgeführt. Um den Effekt der Inflammation zu untersuchen, verglichen wir post-hoc mit dem Dunnett-T Test die Werte der Gruppen Tag 2, 4, ... , und 16 mit den Werten der Kontrollgruppe. Um Unterschiede des Körpergewichts nach der Inflammation unabhängig von den verschiedenen Ausgangsgewichten untersuchen zu können, beinhaltete dessen Analyse das Körpergewicht am Tag der Inflammation als Co-variable.

Statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Inflammationsparameter

Nach Induktion einer systemischen Inflammation durch Injektion von *Corynebacteria parva* verloren die Ratten der Gruppen Tag 4 und 6 signifikant an Gewicht. Tiere der Gruppen Tag 8, 10 und 12 unterschieden sich im Körpergewicht nicht mehr signifikant von den Werten der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 1). NO₂/NO₃ Plasmaspiegel waren in der Gruppe Tag 4 signifikant erhöht, mit den höchsten Werten in der Gruppe Tag 6 (im Verhältnis zu den Kontrollratten). In den nachfolgenden Tagesgruppen waren die NO₂/NO₃ Plasmaspiegel weiterhin erhöht, erreichten jedoch gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikant erhöhten Werte. Tendenziell verringerten sie sich jedoch weiterhin im Zeitverlauf (siehe Tabelle 1). α₁-AGP Spiegel waren bereits in der Tag 2 Gruppe signifikant erhöht, mit einem Gipfel in der Tag 4 Gruppe. Danach reduzierten sich die Werte im Zeitverlauf der Gruppen und erreichten die Werte der Kontrollgruppe bei den Gruppen Tag 12 bis Tag 16 (siehe Abbildung 2).

Tabelle 1: Systemische Entzündungszeichen der verschiedenen Gruppen

Gruppe	Kontrolle	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14	Tag 16	p	power
Körpergewicht [g]	373 ± 18	365 ± 21	354 ± 9*	338 ± 9*	364 ± 7	380 ± 14	369 ± 11	388 ± 11*	444 ± 13*	0,0001	1,00
NO ₂ / NO ₃ [μmol/l]	33 ± 2	147 ± 63	1052 ± 244*	1632 ± 359*	389 ± 90	153 ± 35	119 ± 46	152 ± 71	77 ± 16	0,0001	1,00

* p < 0,05 versus Kontrolle

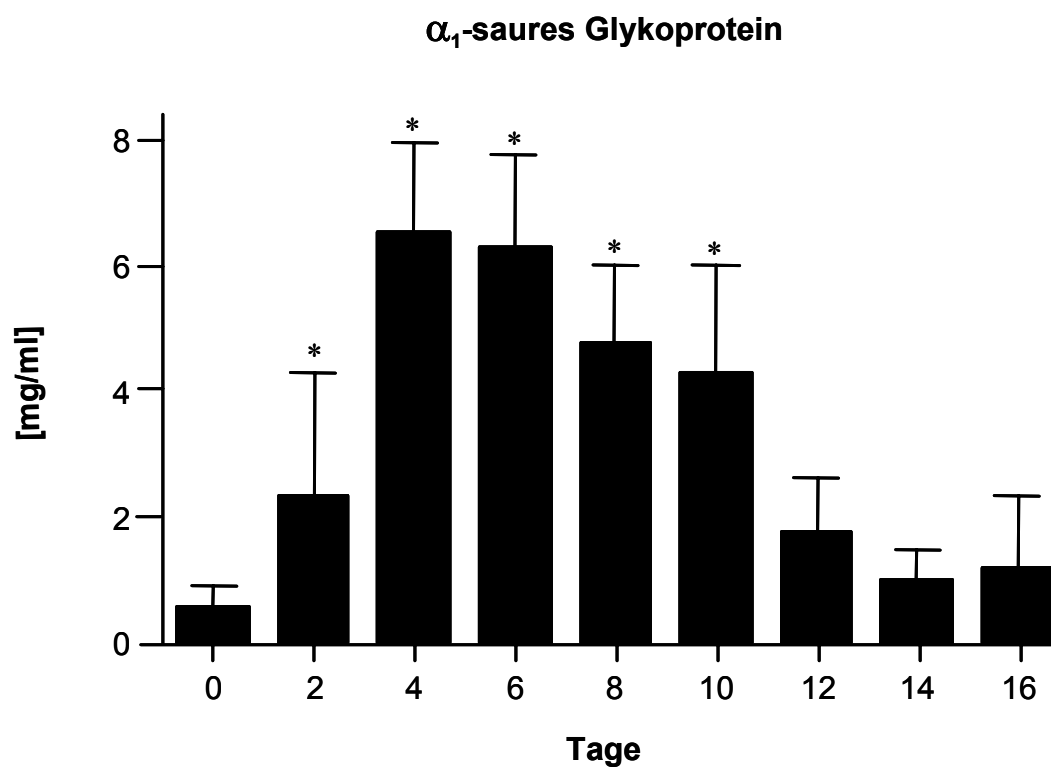


Abbildung 2: Plasmaspiegel des α_1 -AGP im Zeitverlauf der systemischen Inflammation (*p < 0,05).

4.2. Modellstabilität

Die hämodynamischen Parameter wurden während des gesamten Versuchs in jeder Ratte stabil gehalten. Abweichungen von den gesetzten Ober- und Unterwerten führte zu einem Ausschluss der Ratte aus dem Versuch. Die Werte der Ratten innerhalb der Gruppen und zwischen den Gruppen können sich daher nicht unterscheiden; demnach sind die Mittelwerte aller Tiere aufgeführt. Zu Beginn der Versuche, nach der Stabilisierungsperiode, war der mittlere arterielle Druck 108 ± 14 mmHg, die Herzfrequenz war $344 \pm 35 \text{ min}^{-1}$, der arterielle pH Wert befand sich zwischen 7,352 and 7,440, der Basenüberschuss war $-2,6 \pm 1,2$ mM und die Körpertemperatur betrug $37,1 \pm 0,2$ °C. Während der konstanten 50%igen neuromuskulären Blockade war der mittlere arterielle Druck 98 ± 13 mmHg, die Herzfrequenz war $355 \pm 32 \text{ min}^{-1}$, der arterielle pH Wert befand sich zwischen 7,344 und 7,432, der Basenüberschuss war $-2,4 \pm 1,2$ mM und die Körpertemperatur betrug $37,1 \pm 0,2$ °C.

4.3. Pharmakokinetik von Atracurium

Die ED₅₀- und ED₉₅- Werte für Atracurium waren in den *Corynebacteria parva* Ratten ab der Gruppe Tag 4 signifikant gegenüber den Kontrollratten erhöht. Die Erhöhung der ED-Werte blieb bis Tag 8 bestehen. Danach kehrten die Werte zu denen der Kontrollgruppe zurück. Der RI unterschied sich zwischen den Gruppen nicht (siehe Tabelle 2).

Die Infusionsrate für eine konstante 50%ige neuromuskuläre Blockade war in den Gruppen Tag 4, 6, 8 und 10 im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Tabelle 2). Die Atracuriumgesamtspiegel während einer 50%igen neuromuskulären Blockade waren in den Gruppen Tag 4, 6 und 8 im Vergleich zur

Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Abbildung 3). Die Plasmaspiegel der ungebundenen (freien) Fraktion während der 50%igen neuromuskulären Blockade war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 4). Der zeitliche Verlauf des erhöhten Atracuriumbedarfs, um die gleiche (50%ige) neuromuskuläre Blockade zu erzielen, verlief parallel mit den erhöhten α_1 -AGP Spiegeln. Die Atracuriumplasmaclearance zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Pharmakodynamische und pharmakokinetische Parameter von Atracurium

Gruppe	Kontrolle	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14	Tag 16	p	power	
Atracuriumeffektivitätsdosen und Recovery interval												
ED ₅₀	[mg/kg]	0,85 ± 0,13	1,04 ± 0,24	1,18 ± 0,22*	1,71 ± 0,39*	1,20 ± 0,19*	0,95 ± 0,20	0,79 ± 0,19	1,03 ± 0,26	0,92 ± 0,26	0,0001	1,00
ED ₉₅	[mg/kg]	1,45 ± 0,09	1,82 ± 0,24	2,04 ± 0,16*	3,43 ± 0,31*	2,19 ± 0,14*	1,80 ± 0,17	1,27 ± 0,11	1,85 ± 0,20	1,88 ± 0,34	0,0001	1,00
Recovery interval	[s]	97 ± 9	102 ± 6	89 ± 5	81 ± 9	77 ± 7	79 ± 6	90 ± 8	93 ± 5	118 ± 10	0,014	1,00
Parameter während einer konstanten 50%igen neuromuskulären Blockade												
Infusionsrate	[µg kg ⁻¹ min ⁻¹]	147 ± 12	155 ± 9	211 ± 18*	265 ± 25*	206 ± 15*	214 ± 8*	171 ± 15	163 ± 11	122 ± 12	0,0001	1,00
Plasma-clearance	[ml/min]	37 ± 5	29 ± 2	28 ± 2	32 ± 4	27 ± 8	39 ± 3	37 ± 3	31 ± 2	25 ± 2	n.s.	0,79

*p < 0.05 versus Kontrolle, n.s.: nicht signifikant

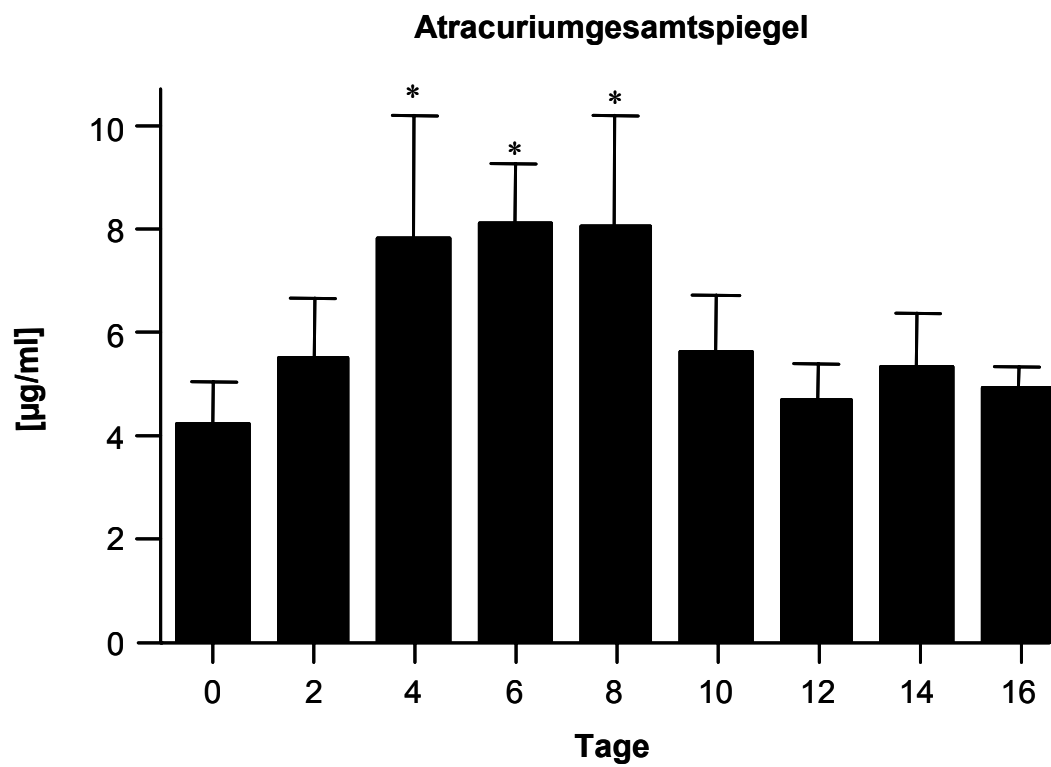


Abbildung 3: Atracuriumgesamtspiegel im Plasma während einer 50%igen neuromuskulären Blockade (*p < 0,05).

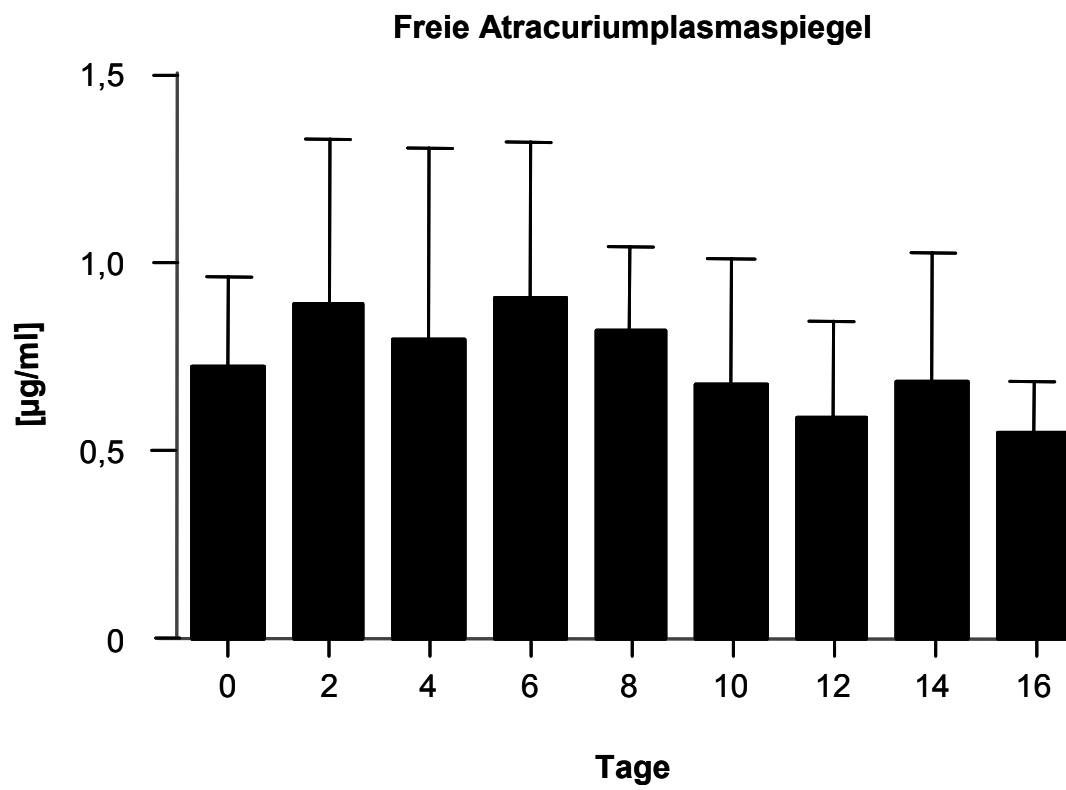


Abbildung 4: Freie Atracuriumplasmaspiegel während einer 50%igen neuromuskulären Blockade.

4.4. Expression des Azetylcholinrezeptors

Die Expression des Azetylcholinrezeptors auf der Muskeloberfläche unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 5).

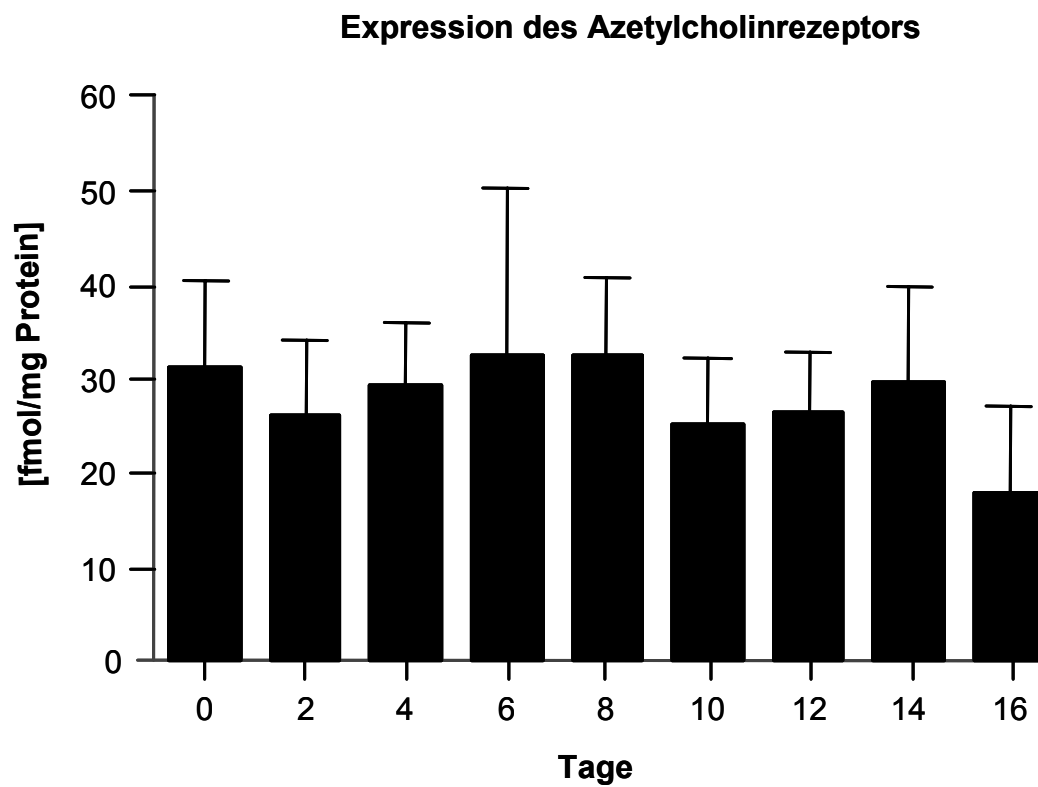


Abbildung 5: Die Expression des Azetylcholinrezeptors im Verlauf der systemischen Inflammation.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine systemische Inflammation, ausgelöst durch die Injektion von hitzeinaktivierten *Corynebacteria parva* Bakterien, die neuromuskuläre Überleitung gegen das nicht-depolarisierende Muskelrelaxans Atracurium unempfindlich macht. Die Resistenz prägte sich bereits 4 Tage nach Bakterieninjektion aus, blieb bestehen bis Tag 8 und war mit Tag 10 vollständig zurückgebildet. Die klinische Manifestation der Resistenz zeigte sich in erhöhten individuellen Atracurium Effektivitätsdosen, erhöhten Infusionsraten für eine konstante 50%ige neuromuskuläre Blockade und erhöhten Atracurium Gesamtplasmaspiegeln für diese Blockade. Die erhöhten Werte dieser Parameter verliefen über die Zeitdauer der Inflammation parallel zu der Erhöhung der α_1 -AGP Plasmaspiegel. Die Spiegel der freien, ungebundenen und damit effektiven Fraktion an Atracurium im Plasma war in allen Gruppen gleich. Eine veränderte Sensitivität des Zielorgans von Muskelrelaxanzien, dem Azetylcholinrezeptor, kommt somit als Erklärung für die beobachtete Resistenz nicht in Frage. Dies wird bestätigt durch die Tatsache, dass es zu keiner Veränderung in der Expression der Azetylcholinrezeptoren im Verlauf der Inflammation kam. Zusammengenommen sprechen diese beiden Ergebnisse für die Tatsache, dass eine erhöhte Bindung von Atracurium an α_1 -AGP der Grund für die beobachtete Resistenz ist.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die durch *Corynebacterium parvum* hervorgerufene Inflammation selbst-limitierend ist (Blobner 1999, S. 1001). Die vorliegende Arbeit bestätigt dies. Zum einen normalisieren sich die von uns bestimmten Spiegel der laborchemischen Inflammationsparameter, wie α_1 -AGP als Akut-Phase Protein und NO_2/NO_3 als stabile Endprodukte des Sepsisradikals

Stickstoffmonoxid. Zum anderen klingt auch die klinisch fassbare Resistenz gegenüber dem nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans Atracurium ab.

In einer früheren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnten wir ebenfalls im *Corynebacterium parvum* Modell eine Resistenz gegenüber dem Muskelrelaxans Vecuronium, im Sinne erhöhter Plasmakonzentrationen während einer konstanten neuromuskulären Blockade nachweisen. Zusätzlich konnte eine Verlängerung der Wirkungszeit von Vecuronium gezeigt werden. Ein verminderter Metabolismus auf Grund einer *Corynebacterium parvum* induzierten verminderten Cytochrom P₄₅₀ Aktivität war eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse. Ebenso lies sich die verlängerte Erholungszeit nach neuromuskulärer Blockade durch Vecuronium durch eine verringerte hepatische Vecuroniumclearance begründen. Die veränderte Pharmakodynamik lies sich somit zumindest zum Teil durch eine infektionsbedingte Veränderung der Pharmakokinetik erklären (Blobner 1999, S. 1003). Im Gegensatz zu Vecuronium wird Atracurium primär über die Hofmannsche Elimination und somit weitestgehend unabhängig von Leber und Nierenfunktion abgebaut (Merrett 1983, S. 65). Eine einheitliche Plasmaverteilung und stabile Abbauverhältnisse wurden in diesem Versuch so gut als möglich durch stabile hämodynamische Verhältnisse, gleichbleibende Körpertemperatur und konstante arterielle pH Werte in allen Ratten gewährleistet. Dementsprechend haben die Gruppen auch vergleichbare Atracurium Plasmaclearances. Eine veränderter Atracuriummetabolismus lässt sich als Erklärung für die Unterschiede in den Effektivitätsdosen und Plasmakonzentrationen im steady-state dieser Untersuchung somit ausschließen.

Eine überschüssige Zytokinproduktion ist ein Merkmal einer Inflammation und Sepsis. Zytokine wiederum aktivieren vor allem in Makrophagen die induzierbare NO

Synthese mit exzessiver Freisetzung von NO (Wong 1995, S. 160). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass endogenes NO die Kopplung von Exzitation und Kontraktion im Muskel inhibieren und darüber seine Kraftentwicklung vermindern (Reid 1998, S. 404). Somit unterstützt NO die Erschlaffung der quergestreiften Muskulatur über den intrazellulären cGMP Pfad (Kobzik 1994, S. 547). Zusätzlich beeinflusst NO die Expression der Azetylcholinesterase im neuromuskulären Spalt, sowie die Eigenschaften der Azetylcholinrezeptoren durch eine Aktivierung von cGMP (Ribera 1998, S. 96). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NO die evozierte Freisetzung von Azetylcholin unterdrückt, was in einer Reduktion der Endplattenpotentiale resultiert (Kusner 1996, S. 240). Vor diesem Hintergrund hatten wir eher erwartet, dass die erhöhten NO-Spiegel die Muskulatur von unseren infizierten Ratten für ein Muskelrelaxans wie Atracurium eher empfindlicher als resistent machen würde.

In anderen Modellen wie Immobilisation, Denervierung und Verbrennungen konnte ein Zusammenhang zwischen einer Erhöhung der Oberflächenexpression von Azetylcholinrezeptoren und einer Resistenz gegenüber nicht-depolarisierenden Muskelrelaxanzien nachgewiesen werden. Solche Resistenzen beruhen sowohl auf quantitativen Veränderungen der Rezeptorexpression als auch auf qualitativen Veränderungen im Sinne einer veränderten Zusammensetzung der Untereinheiten (Martyn 1992, S. 825). Aber auch für die Sepsis oder die systemische Inflammation wurde durch Berichte über Hyperkaliämien nach Succinylcholingabe in Intensivpatienten indirekt der Verdacht genährt, dass ebenfalls die Expression der Azetylcholinrezeptoren erhöht sei. In der vorliegenden Studie konnte die einmalige Injektion von *Corynebacterium parvum* diese Veränderung nicht hervorrufen. Andere

Faktoren, die eine erhöhte Expression der Azetylcholinrezeptoren zur Folge hätten, wie Immobilisation oder begleitende medikamentöse Therapien spielen in diesem Modell keine Rolle. Der alleinige Faktor Inflammation hat in unserem Modell somit keinen Einfluss auf die Azetylcholinrezeptorexpression. Die Frage bleibt jedoch offen, ob eine länger anhaltende Inflammation quantitative und / oder qualitative Veränderung des Azetylcholinrezeptors doch noch induzieren könnte. Eine alleinige Veränderungen der Untereinheiten des Azetylcholinrezeptors, könnte auf Grund unterschiedlicher Rezeptoraffinitäten ebenfalls die Resistenz gegenüber Atracurium in diesem Versuch erklären. Eine isolierte qualitative Veränderung ohne quantitative Zunahme ist jedoch noch nie beschrieben worden. Eine zahlenmäßige Zunahme der Rezeptoren, im Sinne einer erhöhten Neu-Synthese von Rezeptoren gilt immer als Grundvoraussetzung für Veränderungen in der Untereinheitenkomposition. Da unsere Ergebnisse unveränderte Azetylcholinrezeptorzahlen im Verlauf der Infektion zeigen, ist die These der Konformationsänderung nicht haltbar. Hinzu kommt, dass Atracurium keinen Affinitätsunterschied an den beiden Rezeptor-Subtypen hat (Yost 1997, S. 44-46). Einen Einfluss verschiedener Rezeptorsensitivitäten oder Bindungsaffinitäten kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

Bisher konnten zwei pharmakodynamisch wichtige Plasmaproteine identifiziert werden: Albumin und α_1 -AGP. Albumin bindet hauptsächlich Medikamente in Anionenform (z.B. Barbiturate, Benzodiazepine). α_1 -AGP ist ein sogenanntes Akut-Phase Protein und Bestandteil der γ -Globuline. Es bindet vorrangig Medikamente in Kationenform, so z.B. auch nicht-depolarisierende Muskelrelaxanzien (Paxton 1983, S. 640). Viele verschiedene pathologische Zustände wie Verbrennungen, Karzinome, chronische Inflammation und Sepsis, führen zu einer Erhöhung der Akut-Phase

Proteine und somit auch dem α_1 -AGP (Martyn 1984, S. 537; Paxton 1983, S. 646). In unserem Inflammationsmodell konnten wir zeigen, dass die α_1 -AGP Plasmaspiegel im Verlauf der Erkrankung erhöht waren. Beginnend mit Tag 2, erreichten die Spiegel die höchsten Werte an Tag 4 bis 8, um bei Tag 12 wieder auf die Werte der Kontrollgruppe abzufallen. Während der zielgerichteten Infusion von Atracurium, mit der eine konstante 50% neuromuskuläre Blockade erreicht wurde, verliefen die Atracurium Gesamtplasmaspiegel im Zeitverlauf der Infektion parallel zu den erhöhten α_1 -AGP Spiegeln. Betrachtet man jedoch die freie - und somit einzig effektive Fraktion an Atracurium - findet man keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Dies untermauert die Bedeutung der Plasmaproteinbindung für die Effektivität des Atracuriums in diesem Modell einer akutes SIRS.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in unserem Modell einer systemischen Inflammationsreaktion die Resistenz gegenüber Atracurium allein mit einer erhöhten Bindung an α_1 -AGP zu erklären ist. Die Resistenz ist selbst-limitierend und verschwindet mit Abklingen der Inflammation. Hinsichtlich auslösenden Mechanismen, Mediatoren oder nötige Infektionsdauer um auch Veränderungen auf Azetylcholinrezeptorebene zu bewirken, bedarf es weiterer Studien.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: In der vorliegenden Studie untersuchten wir in einem Inflammationsmodell in Ratten die Pharmakodynamik von Atracurium im Verhältnis zur Expression von Azetylcholinrezeptoren und dem Plasmaprotein α_1 -saures Glykoprotein (α_1 -AGP).

Methoden: Zur Induktion einer Inflammationsreaktion injizierten wir männlichen Sprague-Dawley Ratten 56 mg/kg *Corynebacterium parvum* intravenös. An den Tagen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, oder 16 nach Infektion wurde durch evozierte Mechanomyographie die individuelle Effektivitätsdosis (ED_{50}) von Atracurium, sowie die nötige Infusionsrate für eine 50%ige neuromuskuläre Blockade bestimmt. Atracurium Gesamtspiegel und die freie Fraktion wurden mit HPLC gemessen. Die Azetylcholinrezeptoren wurde mit ^{125}I - α -Bungarotoxinbindung quantifiziert. α_1 -AGP Spiegel wurden mit einem Chemilumineszenz Immunoassay bestimmt.

Ergebnisse: Die ED_{50} war an den Tagen 4, 6, and 8 erhöht. Atracurium Gesamtspiegel während 50%iger neuromuskulärer Blockade waren an den Tagen 4, 6, 8, und 10 (Maximum an Tag 8: $8,0 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($4,23 \pm 0.82 \mu\text{g/ml}$) erhöht. Die α_1 -AGP Spiegel waren im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,61 \pm 0.33 \text{ mg/ml}$) zwischen den Tagen 2 und 10 erhöht mit einem Gipfel an Tag 4 ($6,52 \pm 1.45 \text{ mg/ml}$). Weder die freie Atracuriumfraktion bei einer 50%igen Blockade noch die Expression des Azetylcholinrezeptors zeigten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Schlussfolgerung: Die Resistenz gegen Atracurium während einer systemischen Inflammation ist auf eine erhöhte Plasmaproteinbindung an α_1 -AGP zurückzuführen und ist unabhängig von Veränderungen am Azetylcholinrezeptor.

7. **Bibliographie**

1. **Archer, S.:** Measurement of nitric oxide in biological models. *Faseb J* 7 (1993): 349-360
2. **Bernard, C.:** Etudes Etudes physiologiques sur quelques poisons americains. *Rev. Deux Mondes* 53 (1864): 164-190
3. **Bernard, C.:** Lecon sur les effets de substances toxiques et medicamenteuses. *Ballieres et Fils* (1857): 311-324
4. **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
5. **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
6. **Cummins, C.S., Johnson, J.L.:** *Corynebacterium parvum*: a synonym for *Propionibacterium acnes*? *J Gen Microbiol* 80 (1974): 433-442
7. **D'Anghiera, P.:** *De Rebus Oceanis et Orbe Novo* In: *Nedergaard, O. (Hrsg) Curare: The Flying Death. (1516) S.154-155.*
8. **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
9. **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
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. **Garcia, E., Calvo, R., Rodriguez-Sasiain, J.M., Jimenez, R., Troconiz, I.F., Suarez, E.:** Resistance to atracurium in rats with experimental inflammation: role of protein binding. *Acta Anaesthesiol Scand* 39 (1995): 1019-1023
12. **Griffith, H.R., Johnson, G.E.:** The use of curare in general anesthesia. *Anesthesiology* 3 (1942): 418-420
13. **Gronert, G.A.:** Succinylcholine hyperkalemia after burns [letter]. *Anesthesiology* 91 (1999): 320-322
14. **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
15. **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

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. **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
18. **Kobzik, L., Reid, M.B., Breidt, D.S., Stamler, J.S.:** Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372 (1994): 546-548
19. **Kohlschütter, B., Baur, H., Roth, F.:** Suxamethonium-induced hyperkalaemia in patients with severe intra-abdominal infections. *Br J Anaesth* 48 (1976): 557-562
20. **Kremer, J.M., Wilting, J., Janssen, L.H.:** Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* 40 (1988): 1-47
21. **Kusner, L.L., Kaminski, H.J.:** Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res* 730 (1996): 238-242
22. **Läwen, A.:** Über die Verbindung der Lokalanästhesie mit der Narkose, über hohe Extraduralanästhesie und epidurale Injektionen anästhesierender Lösungen bei tabischen Magenkrise. *Bruns. Beitr. klin. Chir.* 80 (1912): 168-180
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., Abernethy, D.R., Greenblatt, D.J.:** Plasma protein binding of drugs after severe burn injury. *Clin Pharmacol Ther* 35 (1984): 535-539
25. **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
26. **Merrett, R.A., Thompson, C.W., Webb, F.W.:** In vitro degradation of atracurium in human plasma. *Br J Anaesth* 55 (1983): 61-66
27. **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
28. **Paxton, J.W.:** Alpha 1 -acid glycoprotein and binding of basic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 5 (1983): 635-648
29. **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
30. **Reid, M.B.:** Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* 162 (1998): 401-409
31. **Ribera, J., Marsal, J., Casanovas, A., Hukkanen, M., Tarabal, O., Esquerda, J.E.:** Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 51 (1998): 90-102

32. **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
33. **Tobey, R.E.:** Paraplegia, succinylcholine and cardiac arrest. *Anesthesiology* 32 (1970): 359-364
34. **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
35. **Utkin Yu, N., Tsetlin, V.I., Hucho, F.:** Structural organization of nicotinic acetylcholine receptors. *Membr Cell Biol* 13 (2000): 143-164
36. **Ward, J.M., Martyn, J.A.:** Burn injury-induced nicotinic acetylcholine receptor changes on muscle membrane. *Muscle Nerve* 16 (1993): 348-354
37. **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
38. **Wintersteiner, O., Dutcher, J.D.:** Curare alkaloids from *Chondodendron tomentosum*. *Science* 97 (1943): 467-470
39. **Wong, J.M., Billiar, T.R.:** Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol* 34 (1995): 155-170
40. **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

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Eberhard Kochs bedanken, dass er es mir ermöglicht, diese und weitere wissenschaftliche Arbeit an der Klinik für Anaesthesiologie durchzuführen.

Mein tiefster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner. Manfred, ich danke Dir für den Einstieg in den von mir nie geplanten Weg der anästhesiologischen Forschung und Deine Unterstützung zu allen Zeiten.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Professor Jeevendra A.J. Martyn, Harvard Medical School, Boston, MA bedanken. Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern im Labor von Prof. Martyn: Dr. Shingo Yasuhara, Dr. Chikwendu Ibejunjo, Chhaya Mani, Raman Khuroya und Yoko Yasuhara. Ebenso möchte ich mich bei Frau Martina Richtsfeld für die Zusammenarbeit und Fortführung der Arbeiten in Boston bedanken.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter Lippa, Institut für Klinische Chemie für die gute Zusammenarbeit und Etablierung neuer Methoden. Herrn Dr. Jochen Metzger danke ich für die Arbeiten zur Etablierung des Chemilumineszenz-Assays zum Nachweis von α_1 -AGP.

Hiermit bedanke ich mich auch beim Deutschen Akademischen Austauschdienst für das gewährte Stipendium in Boston. Gleicher Dank gilt der Firma Glaxo-Wellcome für die ebenfalls gewährte finanzielle Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich zu tiefst bei meinen Eltern bedanken, die es mir erst ermöglicht haben, die medizinische Laufbahn einzuschlagen und die mich bei allen meinen Aktivitäten, beruflich wie privat, im In- und Ausland immer unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Name: Heidrun Fink

Geburtsdatum / -ort: 19. August 1971 in Erlangen

1. Schulbildung:

1977 – 1982 Seignory Primary School, Montreal, Kanada
Grundschule Erlangen
Harbord Primary School, Sydney, Australien

1982 – 1990 Freshwater Highschool, Sydney, Australien
Emmy-Noether-Gymnasium, Erlangen
Carl-Orff-Gymnasium, Unterschleissheim

2. Universität:

1990 – 1993 Vorklinik: Technische Universität München

1993 – 1997 Klinik: Technische Universität München

Staatsexamina: Erstes medizinisches Staatsexamen: 1994
Zweites medizinisches Staatsexamen: 1996
Drittes medizinisches Staatsexamen: 1997

1997 – 1999 Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin

Klinik für Anaesthesiologie

Klinikum rechts der Isar der Technischen

Universität München

1999 – 2002 Forschungsaufenthalt am Shriners Burns Institute

Harvard Medical School, Boston, USA

(Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdiensts)

seit Juni 2002 Assistenzärztin

Klinik für Anaesthesiologie

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München