

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

**Eine chronische E. coli Infektion verursacht eine
reduzierte Muskelkontraktionskraft ohne Auswirkung auf
die Expression der Azetylcholinrezeptoren**

Maria Lucia Gordan

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 15.04.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2004 angenommen.

Per aspera ad astra.

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1 Sepsis.....	6
1.1.1 Definition der Sepsis	6
1.1.2 Diagnose der Sepsis	7
1.1.3 Pathogenese der Sepsis.....	9
1.1.4 Therapieansätze	10
1.1.5 Neuromuskuläre Beteiligung.....	11
1.1.5.1 Septische Enzephalopathie	11
1.1.5.2 Septische Polyneuropathie	12
1.1.5.3 Septische Myopathie	13
1.2 Neuromuskuläre Übertragung	15
1.2.1 Die neuromuskuläre Endplatte	15
1.2.2 Der Azetylcholinrezeptor	16
1.3 Neuromuskuläres Monitoring	17
1.3.1 Grundlagen zur Nervenstimulation	17
1.3.2 Stimulationsmuster und Parameter.....	18
2. Zielsetzungen der Arbeit	21
3. Material und Methodik.....	22
3.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimatisation	22
3.2 Tiermodell	22
3.3 Anästhesie zum Versuch	23
3.3.1 Narkose.....	23
3.3.2 Beatmung	24
3.3.3 Monitoring.....	24
3.4 Instrumentierung	25
3.4.1 Bakterieninjektion	25
3.4.2 Neuromuskuläre Messung.....	26
3.5 Messungen.....	27
3.6 Entnahme von Material für weitere Untersuchungen	28

3.7 Bestimmung der Azetylcholinrezeptorexpression	29
3.8 Statistik.....	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Infektionsparameter.....	32
4.2 Neuromuskuläre Messung.....	35
4.3. Muskelgewicht und Azetylcholinrezeptoren.....	37
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung.....	44
7. Literaturverzeichnis.....	46
8. Danksagung.....	51
Lebenslauf.....	52

Abkürzungsverzeichnis

α_1 -AGP:	α_1 -saures Glykoprotein
α -BTX:	α -Bungarotoxin
AChR:	Azetylcholinrezeptor
BE:	Basenüberschuss (base excess)
CIM:	Critical Illness Myopathy
cpm:	count per minute
CIP:	Critical Illness Polyneuropathy
$d_i, i \in \{3,7,14\}$:	Messgruppe Tag i
$F_i O_2$:	inspiratorischer Sauerstoffanteil
IL:	Interleukin
MAP:	mittlerer arterieller Blutdruck
N:	Newton
P_0 :	maximale tetanische Kontraktionskraft
P_t :	maximale Einzelkontraktionskraft
$p_a O_2$:	arterieller Sauerstoffpartialdruck
$p_a CO_2$:	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
SAP:	systolischer arterieller Blutdruck
SIRS:	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF- α :	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TOF:	Train-of-Four
T_4/T_1 :	TOF-Quotient

1. Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition der Sepsis

Sepsis ist trotz moderner Intensivmedizin ein häufig beobachtetes Krankheitsbild. In den USA versterben jährlich nach Angaben des Center of Disease Control ca. 200.000 Menschen an den Folgen einer Sepsis, was vergleichbar mit der Sterblichkeit beim akutem Herzinfarkt ist. Die Prävalenz der Sepsis in den USA wird auf ca. 600.000 pro Jahr geschätzt, bei einer Inzidenz von ca. 300 auf 100.000 Einwohner. Die geschätzten Krankenhauskosten betragen ca. 17 Milliarden Dollar (Center for Disease Control 1990, S. 937). Da trotz der großen gesundheitsökonomischen Bedeutung in Deutschland valide epidemiologische Daten zur Inzidenz, Prävalenz, Letalität und Verlauf der Sepsis fehlen, müssen sich entsprechende Aussagen auf Daten aus dem restlichen Europa und den USA stützen. Prospektive Studien aus den USA und den Niederlanden ergaben eine Krankenhausinzidenz der nach klinischen Kriterien diagnostizierten Sepsis von 1-2%. Auf Intensivstationen liegt die Inzidenz etwa 10fach höher, wobei die Angaben zwischen 9-22% schwanken (Kieft 1993, S. 2245; Sands 1997, S. 236).

Der Sepsisbegriff hat im Laufe der Zeit einen erheblichen Bedeutungswandel erfahren. Eine moderne Definition der Sepsis wurde 1989 vom amerikanischen Intensivmediziner Roger C. Bone veröffentlicht: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihre Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (Bone 1989, S. 390). Diese Definition wurde 1992 von einer Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* weitergeführt (Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee 1992, S. 866), dabei wurden einige Begriffe neu eingeführt bzw. neu definiert:

Infektion: Entzündliche Antwort des sterilen Gewebes auf das Eindringen oder die Anwesenheit von Mikroorganismen.

Bakteriämie: Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut.

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): Generalisierte hyperinflammatorische Reaktion auf eine Vielzahl unterschiedlicher Noxen (Verbrennungen, Polytraumata, Massenblutungen, ausgedehnte Weichteilverletzungen, Ischämie und Reperfusionvorgänge, Pankreatitis).

Sepsis: SIRS hervorgerufen durch eine Infektion.

Schwere Sepsis: Sepsis mit Organdysfunktionen.

Septischer Schock: Sepsis mit Schock.

1.1.2 Diagnose der Sepsis

Für die Diagnose der Sepsis wurde von der Konsensuskonferenz ein Kriterienkatalog erstellt.

Eine *Sepsis* liegt vor, wenn folgende beide Voraussetzungen erfüllt sind:

Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation (mindestens eines der folgenden Kriterien):

- mikrobiologisch gesicherte Infektion
- klinisch gesicherte Infektion
- vermutete Infektion

Nachweis einer systemischen inflammatorischen Wirtsreaktion (SIRS) (mindestens zwei der folgenden Kriterien):

- Hypo- ($< 36^{\circ}\text{C}$) oder Hyperthermie ($> 38^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie ($> 90 \text{ min}^{-1}$)

- Tachypnoe ($> 20 \text{ min}^{-1}$) und/oder arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($p_a\text{CO}_2$) $> 33 \text{ mmHg}$
- Leukozytose $> 12.000 \mu\text{l}^{-1}$ oder Leukopenie $< 4.000 \mu\text{l}^{-1}$ und/oder Linksverschiebung im Differentialblutbild

Eine *schwere Sepsis* liegt vor, wenn zusätzlich folgende Voraussetzung erfüllt ist:

Infektionsbezogene Organdysfunktionen als Zeichen der unkontrollierten Inflammation (mindestens eines der folgenden Kriterien):

- akute Enzephalopathie (reduzierte Vigilanz, Unruhe, Desorientiertheit, Delir ohne Beeinflussung durch Psychopharmaka)
- Thrombozytopenie ($< 100.000 \mu\text{l}^{-1}$ oder Abfall $> 30\%$ ohne Blutverlust als Ursache)
- arterielle Hypoxämie (arterieller Sauerstoffpartialdruck ($p_a\text{O}_2$) $< 75 \text{ mmHg}$ unter Raumluft, ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache)
- arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck (SAP) $< 90 \text{ mmHg}$ oder mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) $< 70 \text{ mmHg}$ über mindestens eine Stunde trotz ausreichender Volumenzufuhr in Abwesenheit anderer Schockursachen)
- renale Dysfunktion (Urinausscheidung $< 0,5 \text{ ml h}^{-1}$ für mindestens zwei Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatininwertes)
- metabolische Azidose (Basendefizit (BE) $> 5,0 \text{ mEq l}^{-1}$ oder eine Plasma-Laktat-Konzentration $> 1,5 \times$ oberhalb des Referenzbereichs)

Ein *septischer Schock* liegt vor, wenn folgende Voraussetzungen gleichzeitig erfüllt sind:

- Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation

- Nachweis einer systemischen inflammatorischen Wirtsreaktion (SIRS)
- Nachweis einer arteriellen Hypotonie für mindestens zwei Stunden trotz adäquater Volumentherapie (SAP < 90 mmHg oder MAP < 70 mmHg)

Die Prognose ist, neben Alter und Vorerkrankungen, stadienabhängig. Prospektive Studien haben gezeigt, dass die Letalität ausgesprochen hoch ist, 7-8% im Fall eines SIRS und über 50% bei einem septischen Schock (Pittet 1995, S. 306). Die höchste Letalitätsrate von 72% beobachteten McLauchlan et al bei Patienten mit einer abdominellen Sepsis (McLauchlan 1995, S. 527). Trotz modernster Intensivmedizin liegt die Mortalität einer schweren Sepsis zwischen 15-35%.

1.1.3 Pathogenese der Sepsis

Die Pathophysiologie ist ausgesprochen komplex. Auslöser sind toxische Bakterienprodukte: Endotoxine, als Lipopolysaccharide bei gramnegativen, und Exotoxine bei grampositiven Bakterien. Sie führen zur Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehrmechanismen (Bolton 1996, S. 841). Die wichtigsten humoralen Faktoren sind die Zytokine, dazu zählen die Interleukine (IL) -1, -2 und -6, der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Lipidmediatoren (Metabolite der Arachidonsäure wie Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene). Außerdem beteiligen sich Gerinnungsfaktoren, das Komplementsystem, das Kininsystem, Proteasen, freie Sauerstoffradikale und vasoaktive Substanzen wie z. B. Stickstoffmonoxid. Diese Mediatoren aktivieren metabolische Kaskaden, die über Aktivierung von Muskelproteasen mit Bereitstellung von Aminosäuren für die hepatische Glukoneogenese und Synthese der Akut-Phase-Proteine, z. B. das α_1 -saure Glykoprotein (α_1 -AGP), in einer katabolen Situation münden. An der zellulären Antwort beteiligen sich Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen. Die Interaktion der zellulären Antwort mit den humoralen Faktoren führt zu Mikrozirkulationsstörungen und Funktionseinschränkung einzelner Organsysteme. Histologisch erkennbar sind Veränderungen des Vasotonus, Permeabili-

tätssteigerung mit Ausbildung eines interstitiellen Ödems, Obstruktion der Endstrombahn durch Leukozytenadhärenz, Thrombozytenaggregation und direkte Endothelschädigung. Die Abwehrsysteme werden selbst zum Angreifer und verstärken sich im Sinne eines positiven Feedbacks. Gelingt es nicht diese überschießende Reaktion unter Kontrolle zu bringen, kommt es zu Schock, Multiorganversagen und Tod.

1.1.4 Therapieansätze

Die Vielzahl der therapeutischen Ansätze bei einer Sepsis lassen sich in kausale und supportive, sowie neue adjuvante Maßnahmen zusammenfassen.

Die kausalen Therapieansätze umfassen die Bekämpfung der Infektion mit antimikrobiellen Substanzen und, falls zugänglich, die chirurgische Sanierung des Sepsisherdes.

Behandlungsgrundsatz der supportiven Therapie ist die symptomatische Stabilisierung gestörter Organfunktionen. Dazu gehören die Optimierung des Sauerstoffangebots entsprechend des Sauerstoffbedarfs, die Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens und des Blutdrucks mittels Volumensubstitution, Inotropika und Vasopressoren, die Überwachung der Diurese und der gastrointestinalen Funktion.

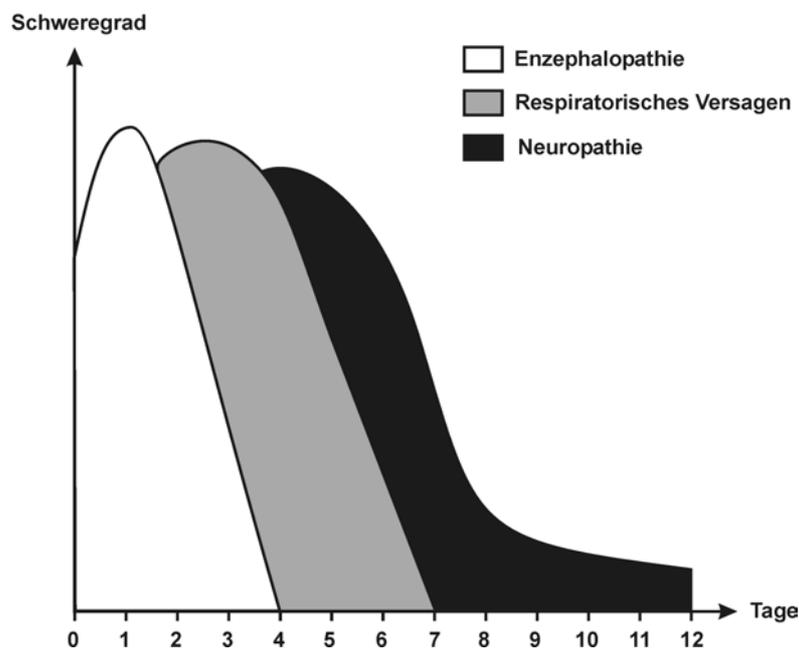
Im Fall von Organversagen kommen intensivmedizinische Behandlungsmaßnahmen zum Einsatz, dazu gehören maschinelle Beatmung, organersetzen Verfahren wie Dialyse und Hämofiltration, vasoaktive Pharmaka als auch die enterale und die parenterale Ernährung.

Als adjuvante Therapie gelten Ansätze, die eine Modulation der wirtseigenen inflammatorischen Antwort als Ziel haben, mit Wirkstoffen wie monoklonale Antikörper gegen Bakterientoxine, TNF- α , Kachektin und Adhärenzmolekülen, sowie IL-1 Rezeptor Antagonisten.

1.1.5 Neuromuskuläre Beteiligung

In Anbetracht der schwerwiegenden Veränderungen während des SIRS, ist es nicht erstaunlich, dass mit einer Häufigkeit von bis zu 70% (Witt 1991, S. 182) auch das Nervensystem betroffen ist, sowohl das zentrale als auch das periphere, in einer typischen Reihenfolge der Krankheitsbilder.

Abbildung 1: Neurologische Komplikationen der Sepsis



(nach Bolton 1993, S.58)

1.1.5.1 Septische Enzephalopathie

In der Frühphase einer Sepsis kann das zentrale Nervensystem im Sinne einer septischen Enzephalopathie beteiligt sein. Darunter versteht man eine multifokale oder diffuse, reversible zerebrale Funktionsstörung, deren Symptomatik von einer leichten Bewusstseinstörung bis hin zum Koma variieren kann (Bogdanski 1999, S. 123).

1.1.5.2 Septische Polyneuropathie

Während sich unter Therapie die Enzephalopathie langsam zurückbildet, wird die Beteiligung des peripheren Nervensystems manifest. 1984 berichteten zeitgleich amerikanische, kanadische und französische Forscher über das Auftreten einer Polyneuropathie bei intensivmedizinisch versorgten Patienten. Seitdem wurde ihr Vorkommen immer wieder dokumentiert. Das als Intensivpolyneuropathie (Critical Illness Polyneuropathy, CIP) bezeichnete Krankheitsbild wurde systematisch von der Arbeitsgruppe um Ch. Bolton untersucht (Bolton 2001, S. 2389; Bolton 1999, S. 419; Bolton 1996, S.1411; Bolton 1993, S. 59; Witt 1991, S. 182).

Bei der CIP handelt es sich um eine reversible, symmetrische, vorwiegend axonale Polyneuropathie, mit akutem Beginn im Rahmen eines SIRS oder einer Sepsis, deren Pathogenese bis heute nicht geklärt ist. Die meisten Autoren gehen davon aus, dass die gleichen Mediatoren, die die systemischen Effekte der Sepsis vermitteln, auch für die Entstehung der CIP verantwortlich sind, und betrachten die CIP als Bestandteil des SIRS.

Klinische Studien bei septischen Patienten lieferten Beweise, dass sowohl die motorischen als auch die sensorischen Fasern betroffen sind (Hund 1997, S. 276). Bei der neurologischen Untersuchung findet man symmetrisch angeordnete, distal betonte Paresen bis hin zur Tetraplegie und zum Teil erhebliche Atrophien (Hinder 1997, S. 211). Die Muskeleigenreflexe bleiben meistens, wenn auch abgeschwächt, erhalten. Als Ausdruck des Befalls der Atemmuskulatur fällt klinisch bei beatmeten Patienten eine erschwerte Entwöhnung vom Beatmungsgerät auf. Hinsichtlich sensorischer Ausfälle findet man distale Störungen des Vibrationsempfindens bis hin zu Hypästhesien und teilweise quälenden Parästhesien von handschuh- oder strumpfförmiger Ausbreitung.

Die elektrophysiologische Untersuchung ist die entscheidende Methode bei der Diagnose von Läsionen peripherer Nerven. Frühestes Zeichen einer CIP als Ausdruck einer axonalen Schädigung ist eine Amplitudenminderung der Nervenaktionspotentiale. Nervenleitgeschwindig-

keit und distale Latenzen sind als Zeichen intakter Nervenscheiden meistens normal oder nur gering vermindert (Latronico 2003, S. 1411).

Bei Patienten, die einen milden Verlauf der CIP zeigen, kommt es zu relativ rascher Rückbildung der Symptome, im Fall einer schweren CIP ist die Prognose allerdings schlecht (Witt 1991, S. 182; Zifko 2000, S. 51). In einer prospektiven follow-up Studie fanden Fletcher et al in über 90% der Fälle neurophysiologische Hinweise auf eine chronische Denervierung in Zusammenhang mit einer vorausgegangenen CIP, die bis zu fünf Jahre zurücklag (Fletcher 2003, S. 1014).

1.1.5.3 Septische Myopathie

Inzwischen haben auch zunächst wenig beachtete myopathische Veränderungen als Ursache der prolongierten Muskelschwäche und der daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Entwöhnung von der Beatmungsmaschine großes Interesse gefunden. Die Ergebnisse elektrophysiologischer und histologischer Untersuchungen bei diesen Patienten weisen häufig auf eine kombinierte Schädigung mit Neuropathie und Myopathie hin (Bednarik 2003, S. 1511). Zwar führt auch die CIP sekundär zu muskulären Veränderungen, es wurde bei Intensivpatienten mit prolongierter Muskelschwäche jedoch auch isoliert eine Myopathie nachgewiesen, ohne dass gleichzeitig Zeichen einer Neuropathie bestanden (Trojaborg 2001, S. 1591). Bei diesen Patienten könnte die Myopathie daher auch eine Entität, im Sinne einer Critical Illness Myopathie (CIM), darstellen.

Methode der Wahl zur Erfassung der myopathischen Veränderungen ist die Muskelbiopsie. Im Unterschied zur CIP sind bei der CIM verschiedene histopathologische Formen bekannt, die eine Assoziation zu externen Faktoren, insbesondere die Gabe von Steroiden und nichtdepolarisierenden Muskelrelaxantien, aufweisen. Nach Hund, gibt es drei Typen myopathischer Veränderungen (Hund 1999, S. 2544):

- Critical Illness Myopathy
- Thick Filament Myopathy
- nekrotisierende Myopathie

Die Critical Illness Myopathy, die häufig eine CIP begleitet, charakterisiert sich histologisch durch abnorme Variabilität der Faserquerschnitte mit Atrophie und Angulierung der Faser als Zeichen einer Denervation, internalisierte Zellkerne, fettige Degeneration der Muskelfaser und Fibrose (Stibler 2003, S. 1524). Die Kreatinkinase im Serum ist, da Nekrosen fehlen, meist normal und, ähnlich der CIP, gibt es typischerweise keine entzündlichen Veränderungen.

Eine zweite Form ist die Thick Filament Myopathy mit elektronenmikroskopisch nachgewiesenem selektivem Verlust der Myosinfilamente (Deconinck 1998, S. 188). Histologisch imponiert eine zentral im Faserquerschnitt gelegene Nichtanfärbbarkeit für die Myosin-ATPase.

Eine dritte Form der muskulären Beteiligung stellt die nekrotisierende Myopathie mit Vakuolisierung und Phagozytose der Muskelfasern sowie Zeichen der Regeneration dar. Bei den letzten beiden Formen ist die Kreatinkinase mäßig bis stark erhöht. Es handelt sich häufig, wenn auch nicht ausschließlich, um Patienten, die hohe Dosen Steroide, entweder isoliert oder in Kombination mit hohen kumulativen Dosen von nichtdepolarisierenden Muskelrelaxantien, erhalten haben.

Die Pathogenese der Intensiv-Myopathien ist nicht eindeutig geklärt. In Analogie zur CIP geht man davon aus, dass auch die Muskulatur durch die SIRS/Sepsis Mediatoren geschädigt wird. Die freigesetzten Zytokine führen zu einer hyperkatabolen Myopathie. Es gibt Hinweise darauf, dass auch geringgradige immunologische Reaktionen im Muskel stattfinden (De Letter 2000, S. 209) und dass ein Verlust der elektrischen Membranleitfähigkeit vorliegt, was die Muskelproteolyse verstärkt (Rich 1998, S. 175).

Die Nadelelektromyographie kann schwer zwischen einer Polyneuropathie und einer Myopathie unterscheiden. Rich et al haben gezeigt, dass der Muskel während einer akuten quadriplegischen Myopathie elektrisch nicht reizbar ist, während ein denervierter Muskel trotz Atrophie seine Reizbarkeit beibehält (Rich 1996, S. 735). Davon ausgehend haben sie bewiesen, dass direkte Muskelstimulation und Bestimmung des Verhältnisses zwischen den Summenaktionspotentialen durch Stimulation von Nerv und Muskel behilflich sein können (Rich 1997, S. 672).

Unabhängig vom Auftreten einer CIP kann eine chronische Gabe von nichtdepolarisierenden Muskelrelaxantien (Dodson 1995, S. 818) oder Kortikosteroiden (Lacomis 1996, S. 652) eine Rolle in der Entstehung einer prolongierter Muskelschwäche spielen. Die verantwortlichen Mechanismen sind noch unklar, zu den morphologischen und biochemischen Veränderungen zählt in erster Linie eine Zunahme und Dysregulation der Azetylcholinrezeptoren (AChR) (Dodson 1995, S. 819).

1.2 Neuromuskuläre Übertragung

1.2.1 Die neuromuskuläre Endplatte

Basis für das Verständnis pathophysiologischer Reaktionen der neuromuskulären Übertragung ist das Wissen grundlegender Zusammenhänge sowie die Kenntnis über den strukturellen Aufbau der neuromuskulären Endplatte: Ein ankommendes Aktionspotential, initiiert durch einen Nervenimpuls, bewirkt durch Exozytose die Freisetzung von Azetylcholin aus den präsynaptischen Vesikeln des Motoneurons. Azetylcholin diffundiert über den synaptischen Spalt und bindet an den postsynaptischen AChR, ein pentamerisches Glykoprotein, dessen Untereinheiten ringförmig um einen zentralen Ionenkanal angeordnet sind. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und zur Öffnung der Rezeptorpore. Dies bewirkt einen Natrium-Einstrom und einen Kalium-Ausstrom, was zur Bildung eines Endplattenpotentials führt. Nach Depolarisation der Muskelmembran kommt es letztendlich zur Kontrakti-

on der Muskelfaser. Die Spaltung des Azetylcholins durch die Azetylcholinesterase führt zur „Freigabe“ des AChR. Die Spaltprodukte Cholin und Azetat werden von den Nervenendigungen wieder aufgenommen und zur Neusynthese von Azetylcholin rückgeführt. So wird die erneute Bindung von Azetylcholin mit nachfolgender Muskelkontraktion ermöglicht (Fink 2000, S. 29; Naguib 2002, S. 202).

1.2.2 Der Azetylcholinrezeptor

Die Familie der AChR umfasst muskarinische und nikotinische Subtypen.

Muskarinische AChR gehören der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an. Im zentralen Nervensystem sind muskarinische Rezeptoren an einer Vielzahl vegetativer, sensorischer und motorischer Prozesse beteiligt.

Nikotinische AChR spielen eine Hauptrolle bei der schnellen synaptischen Transmission sowohl in den neuro-neuronalen als auch in den neuromuskulären Synapsen. Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit der Expression des nikotinischen AChR der Skelettmuskulatur, der im Folgenden etwas näher beschrieben wird.

Im gesundem Muskel sind AChR streng auf die neuromuskuläre Endplatte beschränkt, und werden als adult oder reif bezeichnet. Die AChR sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 300 kDa. Sie bestehen aus 4 Untereinheiten, α , β , ϵ und δ , die im Verhältnis 2:1:1:1 präsent sind. Die Bindungsstelle für Azetylcholin ist an der α Untereinheit lokalisiert. Die zwei α Bindungsstellen sind nicht identisch und können durch ihre unterschiedliche Affinität für kompetitive Antagonisten unterschieden werden. Sobald ein Mangel an Aktivität oder neuralen Einflüssen vorhanden ist, wie beim Fötus oder während einer Denervation, beginnt der Muskel eine unreife, auch juvenil genannte Form des Rezeptors zu synthetisieren. Dieser juvenile Rezeptor, bei dem eine γ Untereinheit die ϵ Untereinheit ersetzt, wird sowohl im junktionalen als auch im extrajunktionalen Bereich exprimiert. Die Präsenz der γ Untereinheit führt zu bedeutenden physiologischen, pharmakologischen und metabolischen Unterschieden

zwischen den zwei Rezeptortypen. Der adulte Rezeptor ist metabolisch stabil mit einer Halbwertszeit von ungefähr zwei Wochen, während juvenile Rezeptoren eine Halbwertszeit von 24 Stunden haben. Die Einzelkanalleitfähigkeit des adulten Rezeptors ist zehn mal höher als die des juvenilen, der aber eine zwei- bis zehnfach erhöhte Einzelkanalöffnungszeit hat. Eine Depolarisierung kann beim juvenilen Rezeptor mit zehnfach bis hundertfach geringeren Dosen an Agonisten wie Azetylcholin oder Succinylcholin hervorgerufen werden, es resultiert also eine erhöhte Sensitivität gegenüber Rezeptoragonisten oder Partialagonisten (Martyn 1992, S. 825).

Der Begriff „Up-Regulation“ bezieht sich auf eine erhöhte Rezeptoranzahl, die als Folge einer chronischen Aussetzung an Antagonisten oder einer verminderten Transmittermenge beobachtet wird. Zu einer Hochregulation der Rezeptoren kommt es nach Denervierung, nach Läsion des ersten oder zweiten Motoneurons, nach einem thermischen oder nach einem direkten Muskeltrauma, als Folge einer Immobilisation als auch nach einer chronischen Behandlung mit nichtdepolarisierenden Muskelrelaxantien oder Antikonvulsiva. Es werden vermehrt unreife Rezeptoren exprimiert, mit den genannten Folgen für die neuromuskuläre Übertragung.

Zu einer „Down-Regulation“, also verminderter Rezeptorexpression, kommt es bei einer Myasthenia gravis, wenn Antikörper gegen den AChR vorliegen, oder bei chronischer Hemmung der Cholinesterase (z.B. Vergiftung mit Organophosphaten) (Martyn 1992, S. 826).

1.3 Neuromuskuläres Monitoring

1.3.1 Grundlagen zur Nervenstimulation

Prinzip des neuromuskulären Monitorings ist die elektrische Stimulation eines motorischen Nerven, nach der die Kontraktionskraft des innervierten Muskels einen Rückschluss auf die neuromuskuläre Übertragung zulässt. Erste Versuche zur Klärung des Mechanismus führte der französische Physiologe Claude Bernard mit Nerv-Muskel-Präparaten kurarisiert und

nichtkurarisierter Frösche durch (Bernard 1864, S. 170). Mit Hilfe dieser Technik konnten später die Charakteristika der Muskelrelaxantien untersucht werden.

Die Nervenstimulation erfolgt mit Gleichstrom, möglichst in Rechteckimpulsen. Biphasische Ströme oder einfache Entladungen können zu repetitiver Auslösung von Aktionspotentialen und damit zu einer tetaniformen Muskelantwort führen. Die Dauer eines Stromimpulses muss einerseits lang genug sein, um die Depolarisation aller Axone eines Nerven zu bewirken, andererseits kürzer als die Refraktärperiode der Nervenmembran sein, die etwa 2 ms beträgt. Ein Axon und die von diesem Axon innervierten Muskelfasern bilden eine motorische Einheit. Nach der Depolarisation eines Axons kontrahieren sich alle zugehörigen Muskelfasern nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz. Die Kontraktionskraft eines Muskels wird daher von der Anzahl der sich kontrahierenden Muskelfaser bestimmt und nicht von der Kraft, mit der sich die einzelne Faser kontrahiert.

Der Strom, der alle Axone eines motorischen Nerven depolarisiert und damit zur maximalen Kontraktionskraft führt, wird als maximal bezeichnet. Die Stromstärke wird, als Sicherheitsreserve, um 10 bis 20% erhöht (=supramaximale Stimulation), damit auch nach einer Zunahme des Widerstands die maximale Stimulation gewährleistet wird.

Die Ruhe- bzw. Vordehnung (preload) des Muskels nimmt einen wesentlichen Einfluss auf die Kraftentwicklung. Für die praktische Anwendung ist jedoch weniger der Absolutwert der Vorspannung, als vielmehr die konstante Einhaltung der zu Beginn einer Registrierung eingestellten Vorspannung entscheidend.

1.3.2 Stimulationsmuster und Parameter

Die einfachste Form der Nervenstimulation ist die niederfrequente Applikation supramaximaler Einzelreize (single twitches). Jede der Reizantworten wird bei dieser niedrigen Frequenz als nicht konditioniert bezeichnet, da sie nicht von der vorhergehenden beeinflusst wird. Die von Ali, Utting und Gray entwickelte Train-of-Four-Stimulation (TOF, Vierfachreiz) ist seit

über zwei Jahrzehnten das Standardreizmuster zur intraoperativen Überwachung einer nicht-depolarisierenden neuromuskulären Blockade (Ali 1998, S. 535; Ali 1971, S. 474; Ali 1971, S. 480). Die TOF besteht aus einer Serie von vier Einzelreizen, die mit einer Frequenz von 2 Hz aufeinanderfolgen. Diese Frequenz ist einerseits hoch genug, um eine Ermüdung nachweisen zu können, andererseits hat sie keinen tetanischen Charakter, so dass die einzelnen Muskelantworten auflösbar bleiben. Als Mindestabstand zwischen zwei TOF-Stimulationen werden 12 Sekunden empfohlen. Bei dieser Frequenz gilt die erste Reizantwort (T_1) als nicht konditioniert und entspricht der Muskelantwort auf einen Einzelreiz. Wichtig ist die Ausprägung der neuromuskulären Ermüdung, die sich aus dem Verhältnis der vierten Reizantwort zur ersten Reizantwort ergibt und als TOF-Quotient (T_4/T_1) bezeichnet wird.

Mit zunehmender Reizfrequenz wird die Ermüdung der Muskelantwort stärker, bis sie ein Maximum bei 2 Hz erreicht. Bei einer Erhöhung der Stimulationsfrequenz über 5 Hz verschmelzen die Einzelantworten miteinander, da der Muskel während der Nervenstimulation nicht in die Ruhelage zurückkehrt. Es liegt eine tetanische Reizung vor, bei der eine Superposition der Einzelzuckungen auftritt. Mit steigender Frequenz der tetanischen Reizung nimmt die Ausprägung der Ermüdung zu. Als Parameter der neuromuskulären Übertragung werden folgende Werte bestimmt bzw. berechnet:

- die maximale Einzelkontraktionskraft (peak twitch tension, P_t): definiert als die maximale Kraft, in Newton [N], des ersten Reizes aus der TOF-Serie
- der TOF-Quotient: das Verhältnis T_4/T_1 , wichtig für die Beurteilung der Ausprägung der neuromuskulären Ermüdung
- die spezifische Einzelkontraktionskraft (specific twitch tension): P_t/g Muskel [N/g Muskel]

- die maximale tetanische Kontraktionskraft (tetanic twitch tension, P_0): definiert als die maximale Kraft während des Tetanus [N]
- die tetanische Ermüdung: $(\text{maximale Anfangskraft} - \text{maximale Kraft nach fünf Sekunden}) \times 100 / (\text{maximale Anfangskraft})$ [%]
- die spezifische tetanische Kraft (specific tetanic tension): $P_0/\text{g Muskel}$ [N/g Muskel].

2. Zielsetzungen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Auswirkung einer chronischen Sepsis auf die neuromuskuläre Funktion zu untersuchen. Anhand eines Tiermodells, bei dem eine chronische Sepsis mit intravenöser Injektion einer E. coli Bakteriensuspension induziert wurde, untersuchten wir die Kontraktionskraft der Muskeln und die Expression der AChR.

3. Material und Methodik

3.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimation

Im Versuch wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten der Firma Charles River (Deutschland, Niederlassung Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 280 – 350g verwendet. Im Alter von ca. vier Wochen wurden die ca. 200g schweren Tiere angeliefert und nach einer Woche zur Adaptation in Reinhaltung einzeln gesetzt und in den Versuch eingeschleust.

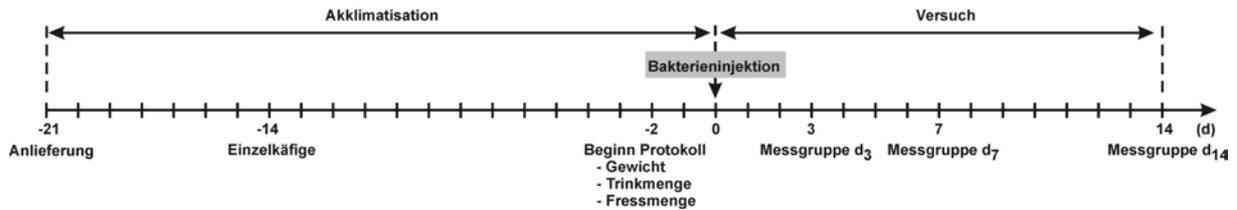
Die Haltung erfolgte in einem klimatisierten Raum bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden. Raumtemperatur, Lichtintensität, Luftwechsel und Luftfeuchtigkeit wurden überwacht und konstant gehalten. Futter (Altromin-Haltung 1324, Altromin GmbH, Lage) und Wasser in Trinkflaschen wurden ad libitum angeboten.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 209.1/211-2531-40/2000).

3.2 Tiermodell

Zwei Tage vor Versuchbeginn bis zum Versuchende wurden die Tiere täglich gewogen und die Fress- und Trinkmengen sowie das Allgemeinbefinden in einem Verlaufsprotokoll dokumentiert. Die Tiere wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt: E. coli und NaCl. Die Tiere der Gruppe E. coli (n=33) erhielten 500µl einer Bakteriensuspension, die $3,2 \times 10^8$ CFU (koloniebildende Einheiten) vom Serotyp 0153:K^H enthielt. Den Tieren der Gruppe NaCl (n=26) wurden 500µl einer 0,9% NaCl-Lösung injiziert. Die Messung der maximalen und spezifischen Kraft der Einzelreize und der tetanischen Reizung sowie der Ermüdung und des TOF-Quotienten erfolgte an den Tagen 3, 7 und 14 nach der Infektion (Messgruppe d₃, d₇ und d₁₄).

Abbildung 2: Versuchsplan



Während der Narkoseeinleitung und der chirurgischen Präparation verstarben vier Tiere. Ebenfalls konnten fünf Tiere, die respiratorische, metabolische oder hämodynamische Probleme hatten, nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Das gilt auch für drei Tiere, bei denen Probleme während der neuromuskulären Messung auftraten. Dadurch verringerten sich die Gruppen und die Versuchsauswertung erfolgte damit bei 26 Tiere der NaCl-Gruppe (davon 9 aus der Messgruppe d₃, 7 aus der Messgruppe d₇ und 10 aus der Messgruppe d₁₄) und 33 Tiere der E. coli-Gruppe (davon 10 aus der Messgruppe d₃, 13 aus der Messgruppe d₇ und 10 aus der Messgruppe d₁₄).

3.3 Anästhesie zum Versuch

3.3.1 Narkose

Die Narkose wurde durch Inhalation von Sevofluran (SEVOrane® Sevofluran, Abbott GmbH, 65205 Wiesbaden) in einem Glaszylinder eingeleitet. Sobald die Tiere das Toleranzstadium erreichten, wurden sie unter Sichtkontrolle mit einer angespitzten Venenverweilkanüle (Cavafix Certo 1,5×2,0 mm/16G, 5cm, Fa. Braun AG, Melsungen) endotracheal intubiert.

Zur Venenpräparation wurde die Anästhesie mit Sauerstoff und Lachgas im Verhältnis 1:2 und 4-6% Sevofluran aufrechterhalten. Um direkte Effekte von Sevofluran auf die neuromuskuläre Übertragung auszuschließen, wurde am eigentlichen Versuchstag die Narkose ohne Sevofluran und ohne Lachgas (inspiratorischer Sauerstoffanteil, Fi O₂=0,4) intravenös mit Propofol (20 - 40 mg kg⁻¹ h⁻¹) und Fentanyl (4 µg kg⁻¹ h⁻¹) fortgesetzt.

3.3.2 Beatmung

Die Tiere wurden maschinell volumengesteuert beatmet (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Apparatus Inc., South Natick, MA 01760, USA). Es handelte sich dabei um ein halboffenes System ohne Rückatmung mit einer Frischgaszufuhr von etwa 2 l min^{-1} und einer Gasabsaugung. Mit Hilfe eines Atemgasmonitors (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finland) wurden die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO_2 , O_2 , N_2O und Sevofluran sowie die Atemfrequenz und der Beatmungsdruck überwacht.

3.3.3 Monitoring

Während der ganzen Anästhesiezeit wurden die Tiere intensiv überwacht. Folgende Grenzen für die Parameter wurden festgelegt:

- Herzfrequenz: $280 - 380 \text{ min}^{-1}$
- MAP: $70 - 110 \text{ mmHg}$
- pH: $7,36 - 7,44$
- BE: $-2 - +2$
- p_aCO_2 : $34 - 40 \text{ mmHg}$
- Temperatur: $36,8 - 37,2^\circ\text{C}$

Das Elektrokardiogramm wurde über zwei subkutane Nadelelektroden am ventralen Brustkorb abgeleitet. Der arterielle Blutdruck wurde kontinuierlich über einen Katheter in der rechten A. carotis communis gemessen, der auch als Entnahmestelle für arterielles Blut für die Blutgasanalysen diente. Dabei wurden p_aCO_2 , p_aO_2 , BE, pH und HCO_3^- kontrolliert, sowie Elektrolyte, Hämoglobin, Met-Hämoglobin, Laktat und Glukose gemessen. Falls nötig, wurde der BE durch Anpassung des Atemminutenvolumens oder mit 1 mM Natriumbikarbonat korrigiert. Ein MAP $< 70 \text{ mmHg}$ wurde als Volumenmangel interpretiert, der gegebenenfalls mit Hydroxyäthylstärke ausgeglichen wurde. Ein MAP $> 110 \text{ mmHg}$ und Herzfrequenzen > 380

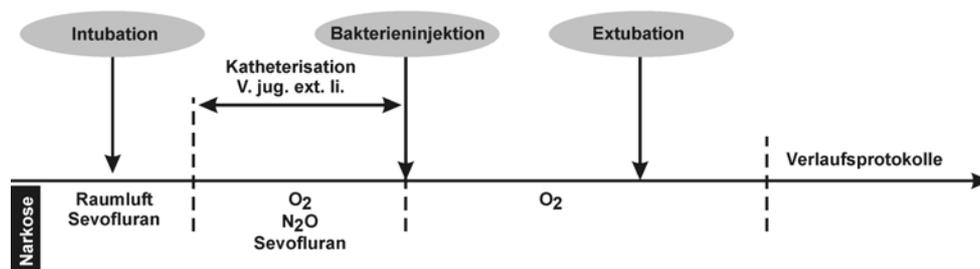
min⁻¹ wurden als Stress interpretiert und die Narkose wurde vertieft. Die Temperatur wurde rektal gemessen und mit einem Heizkissen und einer Hängelampe konstant gehalten.

3.4 Instrumentierung

3.4.1 Bakterieninjektion

Nach der endotrachealen Intubation wurde in Inhalationsnarkose die linke V. jugularis externa in Rückenlage kanüliert (Intramedic Non Radioopaque Polyethylene Tubing, Clay Adams, Division of Beckton & Dickinson, Parsipanny, NJ 07054, USA). Es wurden 200µl Blut für ein Blutbild entnommen, bei dem das Hämoglobin sowie die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenanzahl bestimmt wurden. Nach randomisierter Injektion der E. coli Suspension bzw. der 0,9% NaCl-Lösung wurde der Katheter mittels Ligatur in der Vene befestigt, subcutan versenkt und die Haut über der Inzision wurde verschlossen. Nach Ausleiten der Inhalationsnarkose und gesicherter suffizienter Spontanatmung wurden die Ratten extubiert, in die gewohnte Umgebung gebracht und drei Stunden lang beobachtet.

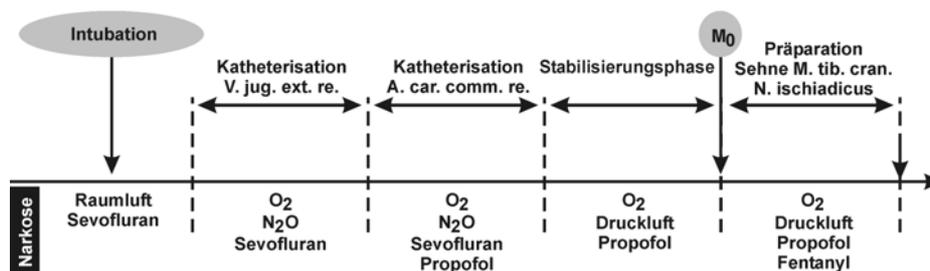
Abbildung 3: Bakterieninjektion



3.4.2 Neuromuskuläre Messung

Nach endotrachealer Intubation und Kanülierung der V. jugularis externa rechts wurden unter streng sterilen Bedingungen 200µl Blut für ein Blutbild und 100µl Blut für ein Blutaustrich auf Agar entnommen. Nach Anschließen eines Propofolperfusors wurde die A. carotis communis rechts kanüliert (PE-Katheter, 33,5cm, ID: 0,58mm/AD: 0,97mm). Die Narkose wurde mit einem Sauerstoff-Luft Gemisch ($F_i O_2=0,4$) fortgesetzt und nach Abfluten des Sevoflurans und Stabilisierung wurden die Parameter des Messzeitpunkts M_0 dokumentiert. Der N. ischiadicus wurde an seiner Austrittsstelle aus dem Plexus lumbosacralis freipräpariert und über Stimulationselektroden (Modell FT03E, Grass Instruments, West Warwick, RI 02893, USA) mit dem Mechanomyographen (Dual Channel Square Pulse Stimulator, Model S88K, Grass Instruments, West Warwick, RI 02893, USA) verbunden. Das distale Ende der Sehne des M. tibialis cranialis wurde mit Hilfe von Vicrylfäden mit dem Kraftabnehmer des Myographen verbunden. Durch Einbringen eines Zirkels in Höhe der Femurkondylen wurden die Beine so fixiert, dass Knie, Sehne und Kraftabnehmer in einer Ebene lagen.

Abbildung 4: Präparation zur neuromuskulären Messung



3.5 Messungen

Die neuromuskuläre Funktion wurde durch die Messung der Kontraktion des M. tibialis cranialis auf einen supramaximalen Stimulus des N. ischiadicus mittels Mechanomyographie untersucht. Die Kontraktionskraft wurde an den Kraft-Bewegungsüberträger (Force Displacement Transducers, Model FT03, Grass Instruments, West Warwick, RI 02893, USA) weitergeleitet und dabei die Stärke der Kontraktion in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieses Signal wurde verstärkt (RPS 107 Regulated Power Supply, Grass Instruments, West Warwick, RI 02893, USA) und graphisch von einem Nadelschreiber (Schwarzer Uniscript DU 210) auf skaliertem Papier aufgezeichnet.

Durch Vorspannung des Muskels (preload) wurde eine isometrische Kontraktion erreicht. Da man davon ausging, dass in der E. coli-Gruppe die Kontraktionskraft vermindert sei, wurde sie bei dieser mit 10g, und bei den Tieren der NaCl-Gruppe mit 50g eingestellt. Vor jeder Messung wurde eine Eichzacke durch einen Gewichtzug von 1000g aufgezeichnet und die supramaximale Stimulationsspannung bestimmt.

Zur Stabilisierung der mechanomyographischen Messung erfolgte eine 20-minütige Einzelreizung (single twitches). Im Anschluss erfolgte die Erhebung der Parameter für den Messzeitpunkt M_1 . Die weitere Stimulation erfolgte nach dem TOF-Muster. Gemessen wurde

- die maximale Einzelkontraktionskraft (P_t) [N].

Berechnet wurde

- der TOF-Quotient
- die spezifische Einzelkontraktionskraft (P_t/g Muskel) [N/g Muskel].

Im Anschluss wurde jedem Bein ein tetanischer Reiz von 100Hz für fünf Sekunden appliziert.

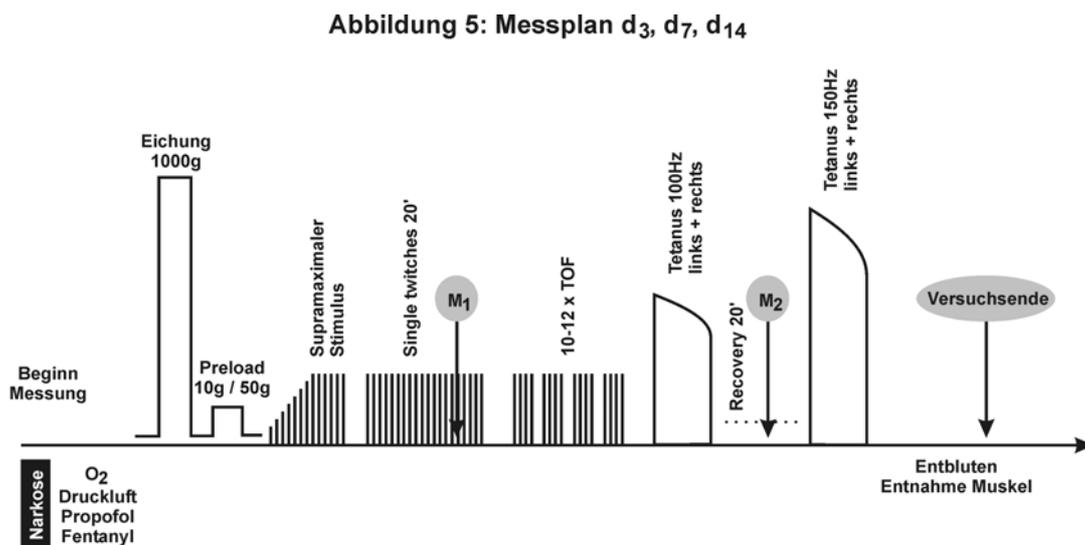
Gemessen wurde

- die maximale tetanische Kontraktionskraft (P_0) [N].

Berechnet wurde

- die Ermüdung (fading) [%]
- die spezifische tetanische Kontraktionskraft (P_0/g Muskel) [N/g Muskel].

Danach erfolgte eine Erholungszeit von 15 Minuten. Vor Ablauf dieser Zeitspanne wurden alle Parameter für den Messzeitpunkt M_2 dokumentiert. Es folgte beidseits ein tetanischer Reiz von 150Hz über fünf Sekunden, bei dem dieselben Werte wie beim 100Hz Tetanus bestimmt wurden.



3.6 Entnahme von Material für weitere Untersuchungen

Nach Abbau der mechanomyographischen Versuchsvorrichtung wurde die Ratte in tiefer Narkose über Punktion der Aorta abdominalis entblutet. Zur Bestätigung der Bakteriämie wurde eine Blutkultur (Bio AER Kid, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, 92430, Frankreich) angelegt. Das restliche Blut wurde bei 4°C mit 4000 Umdrehungen pro Minute

zehn Minuten lang zentrifugiert (Varifuge 3.OR, Heraeus Sepatech), das Serum abpipettiert und für die spätere Bestimmung von Sepsismediatoren (Stickstoffmonoxid, Zytokine, α_1 -AGP) bei -70°C aufbewahrt. Die Mm. tibiales craniales, gastrocnemii und solei wurden entnommen, gewogen, in Isopentan und Trockeneis gefroren und anschließend bei -70°C für weitere Untersuchungen (AChR, Histologie) tiefgefroren. Der implantierte Katheter wurde entfernt und die Spitze auf McConkey-Agar ausgestrichen.

Zur Bestimmung des α_1 -AGP Spiegels wurde eine in Zusammenarbeit mit Prof. P. Lippa vom Institut für Klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München entwickelte Methode verwendet. Dabei handelte es sich um ein Chemilumineszenz Immunoassay, das auf einen Antigen Capture Assay mit biotinyliertem Ratten α_1 -AGP als Tracer basiert (Metzger 2001, S. 515).

3.7 Bestimmung der Azetylcholinrezeptorexpression

Die Expression der AChR an der Muskelfibrille wurde mit Hilfe von ^{125}I - α -Bungarotoxin (^{125}I - α -BTX) bestimmt (Ibebunjo 1999, S. 277). α -BTX, ein Neurotoxin aus dem Cobragift, bindet irreversibel an die α Untereinheit des AChR, ohne jedoch zwischen adulten und juvenilen Rezeptoren unterscheiden zu können. Durch Konjugation mit einem radioaktiven Marker, in diesem Fall ^{125}I , kann man indirekt, über die Messung der emittierten γ -Strahlen, die Menge der AChR bestimmen.

Die Rezeptoren wurden im M. gastrocnemius bestimmt, der für diese Bestimmung auf Eis aufgetaut und in einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH=7,4) homogenisiert wurde. Das Homogenat wurde bei 4°C und 20.000g für 30 Minuten zentrifugiert, der resultierende Überstand dekantiert und verworfen. Das entstandene Pellet wurde in dem Kaliumphosphatpuffer resuspendiert, welcher nun zusätzlich 2% (v/v) Triton X-100 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), ein Detergenzium, das die Membranproteine aus der Zellmembran herauslösen kann, enthielt. Das Suspensat wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend bei 4°C

und 20.000g für 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abpipettiert und die so erhaltene Proteinlösung mit 2,5 nM ^{125}I - α -BTX (spezifische Aktivität 16,2 kBq μg^{-1} , NEN, Boston, MA) bei Zimmertemperatur (23°C) über 90 Minuten inkubiert. Durch Filtration mittels eines Whatman DE-81 Zellulose Filters (Whatman International Ltd., Maidstone, United Kingdom) wurde der gebundene Radioligand abgetrennt. Außer dem AChR binden auch andere Proteine an ^{125}I - α -BTX. Diese unspezifische Bindung musste ebenfalls quantifiziert werden. Dazu wurde eine Probe mit nicht radioaktiv markiertem α -BTX versetzt, welches, ohne ein radioaktives Signal zu erzeugen, an die AChR bindet. Durch nachfolgende Zugabe von radioaktiven ^{125}I - α -BTX konnte die unspezifische Bindung bestimmt werden. Die spezifische Bindung des ^{125}I - α -BTX wurde als Differenz zwischen der Bindung in Abwesenheit und der Bindung in Anwesenheit von nicht radioaktiv markiertem α -BTX berechnet. Die Radioaktivität wurde in einem γ -Zähler in counts pro minute (cpm) bestimmt. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Bio-Rad Detergent Compatible (DC) Protein Assay Kit (BioRad Hercules, CA, USA) bestimmt. Die Anzahl der Rezeptoren wurde in femtomol/mg Protein ausgedrückt.

Die Menge der AChR wurde aus dem Molekulargewicht, der spezifischen Aktivität des ^{125}I - α -BTX und den cpm anhand folgender Schritte berechnet:

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

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

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 AChR in 100 μl Muskelextrakt:

cpm (spezifisch – unspezifisch) \times DPM Äquivalent = AChR [fmol/100 μl Extrakt]

5. Expression der AChR:

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

3.8 Statistik

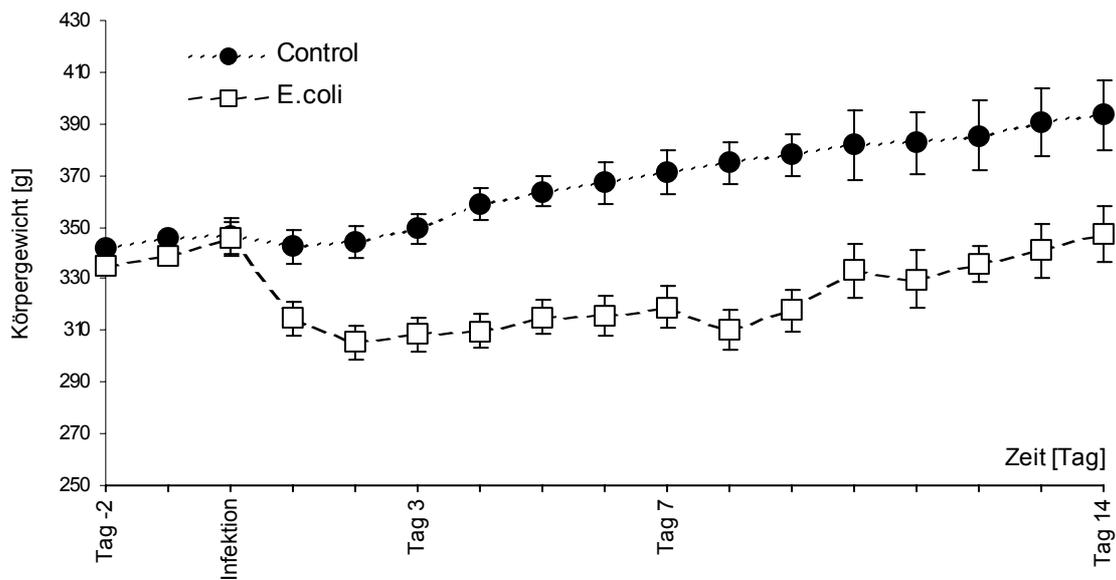
Die Variablen wurden mit einer faktoriellen ANOVA geprüft. Als Faktoren gingen die Zeit nach der Infektion der Tiere, mit den Ausprägungen 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage, sowie der Faktor Infektion, mit den Ausprägungen NaCl und E. coli, ein. Post-hoc wurden an jedem Zeitpunkt die Werte zwischen E. coli und NaCl mit dem t-Test geprüft. Dargestellt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der einzelnen Variablen. Die statistische Analyse führten wir mit SPSS 11.5.1. für Windows (SPSS 11.5.1., SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durch. Statistische Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Infektionsparameter

Die Infektion mit *E. coli* führte, wie in Abbildung 6 dargestellt, nach einem initial ausgeprägteren Gewichtsverlust zu einer verminderten Körpergewichtszunahme im Vergleich zur NaCl-Gruppe.

Abbildung 6: Gewichtsverlauf



In Tabelle 1 sind als Parameter der Sepsis das α_1 -AGP, die Leukozyten- und die Thrombozytenanzahl dargestellt. Das α_1 -AGP war in den Messgruppen d₃ und d₁₄ signifikant erhöht, auf 394% und 316% der Werte der jeweiligen NaCl-Gruppe. In der Messgruppe d₇ war die Zunahme auf 285% im t-Test nicht signifikant. Im Blutbild der *E. coli* Tiere zeigte sich in der Messgruppe d₃ eine Leukozytose und Thrombopenie, die mit 228% und 36% der Werte vom Tag der Bakterieninjektion im t-Test signifikant waren. In den Messgruppen d₇ und d₁₄ zeig-

ten die Leukozyten einen Anstieg auf 170% bzw. 149%, während die Thrombozyten ebenfalls einen Anstieg auf 139% bzw. 112% der Werte vom Tag der E. coli Injektion zeigten. Diese Veränderungen waren jedoch im t-Test nicht signifikant.

Tabelle 1: Infektionsparameter

Messgruppe	Gruppe	Anzahl Tiere (n)	α_1 -AGP [mg/ml]	Leukozyten vor E. coli/NaCl Injektion [G/l]	Leukozyten nach E. coli/NaCl Injektion [G/l]	Thrombozyten vor E. coli/NaCl Injektion [G/l]	Thrombozyten nach E. coli/NaCl Injektion [G/l]
d ₃	NaCl	9	0,53 ± 0,15	12,0 ± 5,5	12,3 ± 3,5	772 ± 206	769 ± 147
	E. coli	10	2,09 ± 0,74*	10,5 ± 2,2	23,9 ± 8,7*	939 ± 127	346 ± 128*
d ₇	NaCl	7	0,69 ± 0,36	14,2 ± 2,7	15,4 ± 3,7	729 ± 262	931 ± 330
	E. coli	13	1,97 ± 1,72	11,2 ± 3,9	19,0 ± 4,6	901 ± 347	1254 ± 443
d ₁₄	NaCl	10	0,51 ± 0,15	10,4 ± 2,3	12,4 ± 2,7	906 ± 108	924 ± 221
	E. coli	10	1,61 ± 1,18*	9,9 ± 3,2	14,8 ± 2,9	939 ± 198	1048 ± 202

* p < 0,05 NaCl versus E. coli

4.2 Neuromuskuläre Messung

Die Ergebnisse der neuromuskulären Messungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Bei den Einzelreizen zeigten die Tiere der E. coli-Gruppe eine geringfügige, im t-Test nicht signifikante Abnahme der Muskelkraft, die in den Messgruppen d₃, d₇ und d₁₄ 95%, 99% bzw. 87% der gemessenen Muskelkraft der NaCl-Tiere betrug. Bei dem TOF-Quotienten errechneten sich Werte die zwischen 0,96 und 1,01 lagen, ein signifikanter Unterschied zeigte sich in der Messgruppe d₃.

Bei der tetanischen Reizung war die Reduktion der Muskelkraft ausgeprägter. In den Messgruppen d₃, d₇ und d₁₄ zeigte sich ein Abfall auf 91,2%, 74,5% und 75% der gemessenen Werte der NaCl-Gruppe. Dabei waren die Veränderungen in den Messgruppen d₇ und d₁₄ im t-Test signifikant.

Die tetanische Ermüdung und die spezifische Muskelkraft bei beiden Stimulationsformen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen der jeweiligen E. coli bzw. NaCl Tiere.

Tabelle 2: Neuromuskuläre Messung

Messgruppe	Gruppe	Maximale Einzelreizkontraktionskraft (P_t) [N]	TOF-Quotient (T_4/T_1)	Maximale tetanische Kontraktionskraft (P_0) [N]	Tetanische Ermüdung [%]	Spezifische Einzelreizkontraktionskraft (P_t/g) [N/g]	Spezifische tetanische Kontraktionskraft (P_0/g) [N/g]
d ₃	NaCl	1,60 ± 0,36	1,01 ± 0,03	6,93 ± 1,97	32 ± 12	2,35 ± 0,49	10,40 ± 3,24
	E. coli	1,48 ± 0,36	0,97 ± 0,04*	6,32 ± 1,6	34 ± 11	2,55 ± 0,69	10,99 ± 3,04
d ₇	NaCl	1,50 ± 0,22	0,99 ± 0,02	8,05 ± 1,39	31 ± 7	2,26 ± 0,29	11,87 ± 1,47
	E. coli	1,50 ± 0,33	0,96 ± 0,06	6,04 ± 1,89*	34 ± 9	2,45 ± 0,69	10,20 ± 3,73
d ₁₄	NaCl	1,67 ± 0,57	0,99 ± 0,02	8,95 ± 0,8	32 ± 13	2,16 ± 0,78	11,57 ± 1,67
	E. coli	1,43 ± 0,35	0,97 ± 0,02	6,71 ± 1,91*	30 ± 8	2,16 ± 0,49	9,81 ± 2,55

* p < 0,05 NaCl versus E. coli

4.3. Muskelgewicht und Azetylcholinrezeptoren

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, nahm das Gewicht der Muskeln, die den E. coli Tieren entnommen wurden, kontinuierlich ab, in den Subgruppen d₃, d₇ und d₁₄ wogen die Muskel der E. coli-Gruppe 83%, 85% und 84% des Gewichtes der entsprechenden NaCl-Gruppe.

Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Expression der AChR zwischen den Subgruppen der jeweiligen E. coli bzw. NaCl Tiere.

Tabelle 3: Muskelgewicht und AChR

Messgruppe	Gruppe	Muskelgewicht [g]	AChR [fmol/mg Protein]
d ₃	NaCl	5,37 ± 0,48	24 ± 9
	E. coli	4,48 ± 0,34*	25 ± 7
d ₇	NaCl	5,66 ± 0,64	20 ± 8
	E. coli	4,83 ± 0,50*	31 ± 15
d ₁₄	NaCl	6,30 ± 1,14	22 ± 6
	E. coli	5,26 ± 0,80*	22 ± 9

* p < 0,05 NaCl versus E. coli

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine bakterielle Sepsis, ausgelöst durch die intravenöse Injektion einer *E. coli* Bakteriensuspension, zu einer Beeinträchtigung der Muskelfunktion führt ohne die Expression der AChR zu beeinflussen.

Als systemische Zeichen einer Sepsis kam es in unserem Modell im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer reduzierten Körpergewichtszunahme, verminderten Muskelgewichten, Leukozytose, Thrombopenie, sowie einer Erhöhung des Akut-Phase-Proteins α_1 -AGP. Im Verlauf der Infektion nahm die tetanische Kontraktionskraft ab. Bei der tetanischen Ermüdung und der Expression der AChR zeigte sich kein Unterschied zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe.

Die prolongierte Muskelschwäche ist eine gravierende Komplikation der Sepsis, mit weitreichenden akuten und chronischen Komplikationen und Konsequenzen für den weiteren Heilungsverlauf. Ursache dieser Muskelschwäche als Folge der Infektion kann neurogenen, myopathischen oder neuromuskulären (junktionalen) Ursprungs sein (Bolton 1996, S. 1409; Hund 2001, S. 929; Hund 1996, S. 1330). Es wird postuliert, dass die gleichen humoralen und zellulären Mechanismen, die zur Aktivierung der metabolischen Kaskade im Verlauf der systemischen Antwort auf die Infektion (SIRS) führen, auch für die Entstehung der Polyneuropathie und der Myopathie verantwortlich sind (Bolton 2001, S. 2388; Bolton 1996, S. 841). Der genaue Mechanismus, über den die freigesetzten Sepsismediatoren wirken, war lange unklar. Heute weiß man, dass Zytokine, darunter IL-1, -2 und -6, sowie TNF- α , den Proteinstoffwechsel des Muskels beeinflussen und zu einer negativen Proteinbilanz führen. Besonders empfindlich sind die Myofibrillen Myosin und Actin, die als Folge der Aktivierung der Ubiquitin Proteasen vermehrt intrazellulär abgebaut werden (Di Giovanni 2004, S. 202; Lacomis 2002, S. 405). Es kommt zu einem generalisierten Hypermetabolismus mit Bereitstellung von Aminosäuren für die hepatische Glukoneogenese und Synthese von Akut-Phase-Proteinen,

darunter das α_1 -AGP. Die freigesetzten Eicosanoide und Stickstoffmonoxid führen zu Vasodilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität. Verminderter peripherer Blutfluss und gestörte Sauerstoffextraktion führen letztendlich zum Organversagen, was sich auf muskulärer Ebene als Muskelschwäche äußert.

Zur Erforschung der CIM wurden verschiedene Critical Illness Tiermodelle verwendet, darunter Modelle der Denervierung, Immobilisation, Verbrennung und Endotoxämie. Als Ursachen dieser Muskelschwäche werden Immobilisationsatrophie, Myofibrillendegeneration und Apoptose vermutet, aber auch die Gabe von Medikamenten, darunter Steroide und Muskelrelaxantien, wird diskutiert. Ruff et al haben eine systemische Infektion bei der Ratte mit *Streptococcus pneumoniae* ausgelöst (Ruff 1984, S. 1484). Dabei beobachteten sie eine Muskelatrophie, verminderte Muskelkraft bei den Einzelreizen und der tetanischen Stimulation, Aktivierung von intrazellulären Proteasen und dadurch Proteolyse, sowie veränderte sarkoplasmatische Elektrolytzusammensetzung. Als pathogenetischen Hintergrund vermuteten sie ein Zusammenspiel der oben genannten Mechanismen.

Voisin et al haben ein Sepsismodell bei der Ratte mit einer einmaligen Injektion von *E. coli* Bakterien in die Schwanzvene entwickelt (Voisin 1996, S. 1612). Sie haben gezeigt, dass anhaltender Proteinabbau als Hauptursache der Atrophie angesehen werden kann. Der Krankheitsverlauf ließ sich in drei Phasen untergliedern: eine akute septische Phase über die ersten drei Tage, mit einer ausgeprägten Gewichtsabnahme und Muskelatrophie, eine chronische septische Phase bis zum sechsten Tag nach der Infektion, während der das Körpergewicht relativ konstant blieb und die Atrophie weiter fortschritt, und eine späte septische Phase ab dem siebten Tag, in der es zu einer Gewichtszunahme kam, während der aber die Muskelmasse niedriger blieb als die der Kontrolltiere. Letzteres ließ sich dadurch erklären, dass die Gewichtszunahme den vermehrten Inhalt des Verdauungstraktes durch vermehrte Nahrungsaufnahme widerspiegelte als auch die Zunahme von nicht-muskulären Gewebe. Untersuchungen

des Proteinturnovers haben gezeigt, dass es zu einem verstärkten ATP-Ubiquitin mediierten Proteinabbau während der akuten und der chronischen Phase kam, so dass trotz einer nachgewiesenen verstärkten Proteinsynthese ein Muskelabbau resultierte. Die Stabilisierung in der späten Phase wurde als Folge der supprimierten Proteolyse erklärt. Einen ähnlichen Verlauf mit ausgeprägter kataboler Situation haben auch Breuille et al in ihrem Sepsismodell beobachtet (Breuille 1999, S. 1080). Sie schrieben die beobachtete Muskelatrophie der verstärkten Proteolyse zu.

Als Folge einer Immobilisation wurden verschiedene Ergebnisse berichtet (Fischbach 1971, S. 565; Goldspink 1977, S. 87). Dazu zählen elektromyographische Veränderungen, eine Reduktion der Muskelmasse und Zu- oder Abnahme der Muskelkraft. Auch wurden eine verminderte oder unveränderte Ermüdung, sowie Veränderungen der Zusammensetzung und der oxidativen Eigenschaften der Muskel beobachtet. Auf mitochondrialer Ebene kommt es zu einer Verminderung der glykolytischen und oxidativen Kapazität. Ibebunjo et al haben vermutet, dass sich Veränderungen der Muskelkontraktilität im Elektromyogramm widerspiegeln, während sich die Ermüdung parallel zu den oxidativen Eigenschaften der Muskelfasern verhält. Als Ergebnis berichtete die Arbeitsgruppe über verminderte Muskelkraft und Ermüdung, deren Ursache sie in der reduzierten Muskelmasse und in der Faseratrophie sahen (Ibebunjo 1999, S. 279).

Rich et al haben die Muskelfunktion während einer akuten quadriplegischen Myopathie bei der Ratte untersucht. Sie fanden Hinweise auf ein Verlust der elektrischen Membranleitfähigkeit, der die Muskelproteolyse verstärkt. Ebenfalls kann eine Irritation von Kalium- und Chloridkanälen durch freie Radikale auftreten (Rich 2003, S. 563; Rich 1996, S. 735).

Die Ergebnisse unserer Untersuchung lassen uns ebenfalls vermuten, dass die induzierte Sepsis über eine katabole Muskelatrophie und die dadurch resultierende Reduktion der Muskelmasse zu der verminderten Kontraktionskraft der Muskeln führt. Der parallele Verlauf von

Muskelmasse und Muskelkraft lässt einen kausalen Zusammenhang vermuten. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die spezifische Einzel- und tetanische Kontraktionskraft (Kraft pro g Muskel) keinen Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden während einer Verbrennung, bei der die Abnahme der Muskelkontraktilität besonders als Folge einer verminderten spezifischen Muskelkraft erfolgt, was nahe legt, dass andere Faktoren als die Muskel- oder Faseratrophie für die beeinträchtigte Muskelfunktion verantwortlich sind (Ibebunjo 1997, S. 445).

Trotz reduzierter Muskelmasse und Muskelkraft haben wir keine Veränderungen der Ermüdung (fading) beobachtet, was auf den ersten Blick paradox erscheint. Die Ermüdung, d.h. die Unfähigkeit die entwickelte Kraft aufrechtzuerhalten, kann als Ursache Störungen an verschiedenen Stationen der neuromuskulären Übertragung haben: präsynaptisch, im Falle kleiner Endplatten oder verzweigter Axone, die die Übertragung blockieren, synaptisch, wenn die Empfindlichkeit der AChR herabgesetzt ist, oder postsynaptisch, wenn die oxidative Kapazität der Muskelfaser oder die sarkolemmale Empfindlichkeit reduziert ist. Ibebunjo et al haben in ihrem Immobilisationsmodell neben einer Muskelfaseratrophie eine Verminderung der Ermüdung beobachtet. Trotz qualitativer Veränderungen in der oxidativen Kapazität der Muskelfaser gab es keine signifikante Veränderung in der Fläche der motorischen Endplatten. Der Zusammenhang zwischen Ermüdung und Faserquerschnitt ist nicht ganz geklärt. Fischbach et al haben gezeigt, dass eine Atrophie zu einer Zunahme der oxidativen Kapazität und der Membranleitfähigkeit führt, was vermuten ließ, dass die so verbesserte neuromuskuläre Übertragung zu einer verminderten Ermüdung führte (Fischbach 1971, S. 566). Wie bereits in der Literatur beschrieben (Latronico 1996, S. 1580), wäre eine reduzierte Anzahl von Muskelfasern mit variablen Durchmessern und eine Faseratrophie, vor allem der Faser vom Typ II, die resistenter gegenüber der Ermüdung sind (Typ I = slow-twitch oxidativ, Typ II = fast twitch, a-oxidativ – glykolytisch, b-glykolytisch), sowie eine modifizierte Zusammensetzung der Muskeln, jedoch keine entzündlichen Veränderungen, zu erwarten. Die histologische Un-

tersuchung der entnommenen Muskeln ist Thema einer anderen Promotion aus unserer Arbeitsgruppe (Dübener A., in Vorb.).

Ebenso könnten Elektrolytentgleisungen wie Hypophosphatämie und Hypokaliämie sowie Hyperglykämie und Hypoalbuminämie eine Rolle bei der Entstehung der Muskelschwäche spielen (Witt 1991, S. 182). Neben physiologischen Parametern, Elektrolyten und Blutgasanalysen haben wir den α_1 -AGP Spiegel im Serum bestimmt, die Zusammenhänge sind Thema einer anderen Dissertation aus unserer Arbeitsgruppe (Frick C., in Vorb.).

Veränderungen in der Expression der AChR liefern ebenfalls eine Erklärung für die von uns festgestellte muskuläre Schwäche. Tsukagoshi et al beobachteten eine Verminderung der AChR in einem Rattenmodell der zökalen Ligatur (Tsukagoshi 1999, S. 454). Eine Verminderung der Rezeptoranzahl kommt einem myasthenischen Syndrom gleich und resultiert in einer verminderten Muskelkraft. Im Gegensatz dazu ist die Hochregulation des Rezeptors infolge einer Sepsis bereits von mehreren Arbeitsgruppen bei septischen Patienten spekulativ diskutiert worden (Blobner 1999, S. 1004; Martyn 1992, S. 826; Tomera 1996, S. 65). Indirekte Hinweise dafür bestanden in Fallberichten, in denen Hyperkaliämien nach Succinylcholingabe beschrieben worden sind (Gronert 1999, S. 320). Eine post mortem Analyse bei Intensivpatienten konnte eine Hochregulation der AChR nachweisen, jedoch lässt die multifaktorielle Krankheitsgeschichte mit zusätzlicher Langzeitimmobilisierung und Medikamentengabe einen ursächlichen Zusammenhang mit der Sepsis nicht eindeutig klären.

In unserer Studie, in der eine isolierte E. coli Infektion induziert wurde, konnten wir in keiner der Subgruppen eine Veränderung der Expression der AChR feststellen. Damit können wir eine immunologische Kreuzreaktivität zwischen E. coli und den AChR, welche bei Tsukagoshi et al als Ursache für die Myasthenie diskutiert wurde, ausschließen. Ebenso scheint der einzelne Faktor Sepsis bei erhaltener Beweglichkeit und ohne die zusätzliche Gabe von Medikamenten keine AChR Dysregulation zu induzieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine i.v. Injektion einer E. coli Bakteriensuspension zu einer reduzierten Kontraktionskraft der Muskeln führt. Gründe dafür liegen nicht in Veränderungen in der Expression der AChR, sondern sind am ehesten durch den allgemeinen Katabolismus im Rahmen der Sepsis zu erklären. Hinsichtlich histologischer Befunde der Muskulatur sowie der Rolle der Sepsismediatoren stehen weitere Untersuchungen aus. Inwiefern eine länger andauernde Sepsis, induziert z. B. durch repetitive Bakterieninjektion, neben den Veränderungen der Kontraktionskraft der Muskeln auch einen Einfluss auf die Expression der AChR haben könnte, bleibt zu klären.

6. Zusammenfassung

Zielsetzung: In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Auswirkungen einer chronischen Infektion mit *E. coli* auf die neuromuskuläre Übertragung und die Expression der Azetylcholinrezeptoren.

Methoden: Nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission wurde männlichen Sprague-Dawley-Ratten in Inhalationsnarkose ein PE-Katheter in die linke V. jugularis externa implantiert. Nach Randomisierung wurden über den Katheter entweder $3,2 \times 10^8$ CFU (koloniebildende Einheiten) einer *E. coli* Bakteriensuspension (n=33) oder das entsprechende Volumen einer 0,9% NaCl-Lösung (n=26) injiziert, der Katheter verschlossen und subcutan versenkt. Nach 3, 7 oder 14 Tagen wurde die neuromuskuläre Funktion unter Überwachung physiologischer Parameter in Narkose gemessen. Es wurde die Kontraktionskraft des M. tibialis cranialis nach direkter Reizung des N. ischiadicus mit Einzelreizen, Train-of-Four-Reizen und Tetani gemessen. Nach Euthanasie der Tiere durch Entbluten wurden die Mm. tibiales craniales, gastrocnemii und solei entnommen, gewogen und tiefgefroren. Im Serum wurde α_1 -saures Glykoprotein und in den Muskeln die Expression der Azetylcholinrezeptoren gemessen.

Ergebnisse: Nach *E. coli* Infektion nahmen die Tiere im Vergleich zu der NaCl-Gruppe nicht mehr an Körpergewicht zu. Das α_1 -saure Glykoprotein war an den Tagen 3 und 14 signifikant erhöht (394% bzw. 286%). Nach tetanischer Reizung war die Muskelkraft der *E. coli* Tiere an den Tagen 7 und 14 signifikant niedriger (75% der Werte der NaCl-Gruppe). Die entnommenen Muskeln der *E. coli* Tiere wogen an den Tagen 3, 7 und 14 ebenfalls weniger im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe (83%, 85% und 84%). Kein Tier zeigte ein Ermüdungsphänomen. Die Expression der Azetylcholinrezeptoren war nicht unterschiedlich in den verschiedenen Gruppen (24 ± 9 fmol/mg Protein).

Schlussfolgerung: In unserem Modell einer chronischen Sepsis war die absolute Muskelkraft vermindert. Da sich die Expression der Azetylcholinrezeptoren nicht änderte, keine Ermü-

dungsphänomene auftraten, aber das Muskelgewicht der infizierten Tiere abnahm, ist die verminderte Kontraktionskraft am wahrscheinlichsten durch den allgemeinen Katabolismus verursacht.

7. Literaturverzeichnis

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20 (1992): 864-874
2. Increase in national hospital discharge survey rates for septicemia - United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 39 (1990): 937-938
3. Ali, H.H., Utting, J.E., Gray, C.: Stimulus frequency in the detection of neuromuscular block in humans. *Br J Anaesth* 80 (1998): 530-541
4. Ali, H.H., Utting, J.E., Gray, T.C.: Quantitative assessment of residual antidepolarizing block. I. *Br J Anaesth* 43 (1971): 473-477
5. Ali, H.H., Utting, J.E., Gray, T.C.: Quantitative assessment of residual antidepolarizing block. II. *Br J Anaesth* 43 (1971): 478-485
6. Bednarik, J., Lukas, Z., Vondracek, P.: Critical illness polyneuromyopathy: the electrophysiological components of a complex entity. *Intensive Care Med* 29 (2003): 1505-1514
7. Bernard, C.: Etudes physiologiques sur quelques poisons americains. *Rev Deux Mondes* 53 (1864): 164-190
8. 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
9. Bogdanski, R., Blobner, M., Hanel, F., Kochs, E.: [Septic encephalopathy]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 34 (1999): 123-130
10. Bolton, C.F.: Critical illness polyneuropathy and myopathy. *Crit Care Med* 29 (2001): 2388-2390
11. Bolton, C.F.: Critical illness polyneuropathy. A useful concept. *Muscle Nerve* 22 (1999): 419-422
12. Bolton, C.F.: Neuromuscular conditions in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 22 (1996): 841-843

13. Bolton, C.F.: Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations. *Crit Care Med* 24 (1996): 1408-1416
14. Bolton, C.F.: Neuromuscular complications of sepsis. *Intensive Care Med* 19 (1993): 58-63
15. Bone, R.C., Fisher, C.J., Jr., Clemmer, T.P., Slotman, G.J., Metz, C.A., Balk, R.A.: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone severe sepsis study group. *Crit Care Med* 17 (1989): 389-393
16. Breuille, D., Voisin, L., Contrepois, M., Arnal, M., Rose, F., Obled, C.: A sustained rat model for studying the long lasting catabolic state of sepsis. *Infect Immun* 67 (1999): 1079-1085
17. De Letter, M.A., van Doorn, P.A., Savelkoul, H.F., Laman, J.D., Schmitz, P.I., Op de Coul, A.A., Visser, L.H., Kros, J.M., Teepen, J.L., van der Meche, F.G.: Critical illness polyneuropathy and myopathy (CIPNM): evidence for local immune activation by cytokine expression in the muscle tissue. *J Neuroimmunol* 106 (2000): 206-213
18. Deconinck, N., Van Parijs, V., Beckers-Bleukx, G., Van den Bergh, P.: Critical illness myopathy unrelated to corticosteroids or neuromuscular blocking agents. *Neuromuscul Disord* 8 (1998): 186-192
19. Di Giovanni, S., Molon, A., Broccolini, A., Melcon, G., Mirabella, M., Hoffman, E.P., Servidei, S.: Constitutive activation of MAPK cascade in acute quadriplegic myopathy. *Ann Neurol* 55 (2004): 195-206
20. 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
21. Fink, H., Blobner, M.: [Neuropathies: the effect on relaxography and neuromuscular function]. *Anaesthesist* 49 Suppl 1 (2000): 29-32
22. Fischbach, G.D., Robbins, N.: Effect of chronic disuse of rat soleus neuromuscular junctions on postsynaptic membrane. *J Neurophysiol* 34 (1971): 562-569
23. 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. *Crit Care Med* 31 (2003): 1012-1016

24. Goldspink, D.F.: The influence of denervation and stretch on the size and protein turnover of rat skeletal muscle [Proceedings]. *J Physiol* 269 (1977): 87-88
25. Gronert, G.A.: Succinylcholine hyperkalemia after burns [Letter]. *Anesthesiology* 91 (1999): 320-322
26. 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]. *Anaesthesist* 46 (1997): 211-219
27. Hund, E.: Myopathy in critically ill patients. *Crit Care Med* 27 (1999): 2544-2547
28. Hund, E.: Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Neurol* 248 (2001): 929-934
29. Hund, E., Genzwurker, H., Bohrer, H., Jakob, H., Thiele, R., Hacke, W.: Predominant involvement of motor fibres in patients with critical illness polyneuropathy. *Br J Anaesth* 78 (1997): 274-278
30. Hund, E.F., Fogel, W., Krieger, D., DeGeorgia, M., Hacke, W.: Critical illness polyneuropathy: clinical findings and outcomes of a frequent cause of neuromuscular weaning failure. *Crit Care Med* 24 (1996): 1328-1333
31. 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
32. 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
33. Kieft, H., Hoepelman, A.I., Zhou, W., Rozenberg-Arska, M., Struyvenberg, A., Verhoef, J.: The sepsis syndrome in a Dutch university hospital. clinical observations. *Arch Intern Med* 153 (1993): 2241-2247
34. Lacomis, D.: Critical illness myopathy. *Curr Rheumatol Rep* 4 (2002): 403-408
35. Lacomis, D., Giuliani, M.J., Van Cott, A., Kramer, D.J.: Acute myopathy of intensive care: clinical, electromyographic and pathological aspects. *Ann Neurol* 40 (1996): 645-654

36. Latronico, N.: Neuromuscular alterations in the critically ill patient: critical illness myopathy, critical illness neuropathy or both? *Intensive Care Med* 29 (2003): 1411-1413
37. Latronico, N., Fenzi, F., Recupero, D., Guarneri, B., Tomelleri, G., Tonin, P., De Maria, G., Antonini, L., Rizzuto, N., Candiani, A.: Critical illness myopathy and neuropathy. *Lancet* 347 (1996): 1579-1582
38. 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
39. McLauchlan, G.J., Anderson, I.D., Grant, I.S., Fearon, K.C.: Outcome of patients with abdominal sepsis treated in an intensive care unit. *Br J Surg* 82 (1995): 524-529
40. Metzger, J., Blobner, M., Lupp, P.B.: Sensitive chemiluminescence immunoassay for the determination of rat serum alpha1 acid glycoprotein. *Clin Chem Lab Med* 39 (2001): 514-518
41. Naguib, M., Flood, P., McArdle, J.J., Brenner, H.R.: Advances in neurobiology of the neuromuscular junction: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 96 (2002): 202-231
42. Pittet, D., Rangel-Frausto, S., Li, N., Tarara, D., Costigan, M., Rempe, L., Jebson, P., Wenzel, R.P.: Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med* 21 (1995): 302-309
43. Rich, M.M., Bird, S.J., Raps, E.C., McCluskey, L.F., Teener, J.W.: Direct muscle stimulation in acute quadriplegic myopathy. *Muscle Nerve* 20 (1997): 665-673
44. Rich, M.M., Pinter, M.J.: Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre inexcitability in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol* 547 (2003): 555-566
45. Rich, M.M., Pinter, M.J., Kraner, S.D., Barchi, R.L.: Loss of electrical excitability in an animal model of acute quadriplegic myopathy. *Ann Neurol* 43 (1998): 171-179
46. Rich, M.M., Teener, J.W., Raps, E.C., Schotland, D.L., Bird, S.J.: Muscle is electrically inexcitable in acute quadriplegic myopathy. *Neurology* 46 (1996): 731-736
47. Ruff, R.L., Secrist, D.: Inhibitors of prostaglandin synthesis or cathepsin B prevent muscle wasting due to sepsis in the rat. *J Clin Invest* 73 (1984): 1483-1486

48. Sands, K.E., Bates, D.W., Lancken, P.N., Graman, P.S., Hibberd, P.L., Kahn, K.L., Parsonnet, J., Panzer, R., Orav, E.J., Snyderman, D.R.: Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA* 278 (1997): 234-240
49. Stibler, H., Edstrom, L., Ahlbeck, K., Remahl, S., Ansved, T.: Electrophoretic determination of the myosin/actin ratio in the diagnosis of critical illness myopathy. *Intensive Care Med* 29 (2003): 1515-1527
50. Tomera, J.F.: Interaction of lipopolysaccharide endotoxin produced from *Escherichia coli* with d-tubocurarine at the nicotinic 2 receptor and adenosine 3':5' cyclic monophosphate during physiological contraction in skeletal muscle. *Food Chem Toxicol* 34 (1996): 63-72
51. Trojaborg, W., Weimer, L.H., Hays, A.P.: Electrophysiologic studies in critical illness associated weakness: myopathy or neuropathy - a reappraisal. *Clin Neurophysiol* 112 (2001): 1586-1593
52. Tsukagoshi, H., Morita, T., Takahashi, K., Kunimoto, F., Goto, F.: Cecal ligation and puncture peritonitis model shows decreased nicotinic acetylcholine receptor numbers in rat muscle: immunopathologic mechanisms? *Anesthesiology* 91 (1999): 448-460
53. Voisin, L., Breuille, D., Combaret, L., Pouyet, C., Taillandier, D., Arousseau, E., Obled, C., Attaix, D.: Muscle wasting in a rat model of long lasting sepsis results from the activation of lysosomal Ca²⁺ activated and ubiquitin proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* 97 (1996): 1610-1617
54. Witt, N.J., Zochodne, D.W., Bolton, C.F., Grand'Maison, F., Wells, G., Young, G.B., Sibbald, W.J.: Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest* 99 (1991): 176-184
55. Zifko, U.A.: Long term outcome of critical illness polyneuropathy. *Muscle Nerve Suppl* 9 23 (2000): 49-52

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eberhard Kochs für die Möglichkeit, diese und weitere wissenschaftliche Arbeit an der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München durchführen zu können, bedanken.

Mein tiefster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner für die Übernahme meiner Doktorarbeit, die intensive Betreuung und Unterstützung sowie die positive Motivierung zur rechten Zeit.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Gänsbacher und Prof. Dr. W. Erhard möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München bedanken. An dieser Stelle sei allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Unterstützung gedankt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Barbara Eckel für die geduldige Einarbeitung in die Methoden und die Betreuung zu Beginn der Experimente bedanken. Mein besonderer Dank gilt Heidrun Fink für die weitere Betreuung während des Versuchs und die Unterstützung während der Erstellung dieser Promotion.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit beim Durchführen der Experimente möchte ich mich bei Christiane Frick, Dr. Christiane Michaelis, Martina Richtsfeld und Katja Laval bedanken. Mein Dank gilt außerdem Dr. Eva Eberspächer und Doris Droese für die gute Kooperation während der Versuchszeit.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mein Studium ermöglicht haben und trotz der Entfernung immer für mich da waren.

Lebenslauf

Maria Lucia Gordan

Geburtsdatum: 10. Januar 1977
Geburtsort: Temeswar, Rumänien
Staatsangehörigkeit: rumänisch
Familienstand: ledig
Eltern: Tiberiu Gordan, Dipl.-Ingenieur
Dr. Magdolna Gordan, Fachärztin für Psychiatrie

Schulbildung

09/1983-06/1995 Grundsule und Gymnasium „Nikolaus Lenau“, Temeswar, Rumänien
deutsche Abteilung, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
06/1995 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

09/1995 Aufnahmeprüfung an die Universität für Medizin und Pharmazie Temeswar,
Rumänien
10/1995-10/1999 Studium der Humanmedizin an der Universität für Medizin und Pharmazie,
Temeswar, Rumänien
Anerkennung der Prüfungen Physikum und erstes medizinisches Staatsexamen
10/1999-05/2003 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
Stipendiatin der Friedrich-Ebert-Stiftung, Bonn
Zweites medizinisches Staatsexamen im Frühjahr 2002
Drittes medizinisches Staatsexamen im Frühjahr 2003

Beruflicher Werdegang

seit 07/2003 Ärztin im Praktikum an der Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum rechts der
Isar der Technischen Universität München