



Fakultät für Medizin

Lehrstuhl für Anästhesiologie

Die Rolle des nikotinischen Acetylcholinrezeptors alpha7 bei Muskelschwäche auf
Intensivstation (ICUAW) am Rattenmodell

Fabian Schulz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Heidrun Lewald

2. Priv.-Doz. Dr. Frauke Neff

Die Dissertation wurde am 03.05.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch
die Fakultät für Medizin am 05.11.2019 angenommen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Einführung	9
1.2 Erworbene Muskelschwäche auf Intensivstation (ICUAW)	10
1.2.1 Terminologie	10
1.2.2 Epidemiologie und Symptomatik	10
1.2.3 Diagnostik	11
1.2.4 Pathophysiologie	12
1.2.4.1 Ätiologie	12
1.2.4.2 Pathogenetische Veränderungen	13
1.2.5 Therapie in der klinischen Praxis	16
1.2.6 ICUAW im Tiermodell	17
1.3 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor alpha7 (nAChR α 7)	18
1.3.1 Struktur	18
1.3.2 Expression im Skelettmuskel	20
1.3.3 Funktion	21
1.3.4 Pharmakologische Eigenschaften	22
2 Hypothesen	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Tiermodell und Studiendesign	27
3.2 Expressionsnachweis von nAChR α 7 mittels Westernblot	29
3.3 Datengewinnung und statistische Analyse	31
3.4 Ergänzende Experimente	32
3.4.1 Bestimmung der Methämoglobinfraktion und des Körpergewichts	32

3.4.2	Messung der neuromuskulären Funktion	33
3.4.3	Immunhistochemie	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Tiermodell und Studiendesign	35
4.2	Expression von nAChR α 7	35
4.3	Auswertung der begleitenden Experimente	38
4.3.1	Methämoglobinspiegel an Tag 12 der Versuchsreihe	38
4.3.2	Veränderungen des Körpergewichts	39
4.3.3	Veränderung der Muskelmasse und Ergebnisse der Mechanomyographie	39
4.3.4	Bestimmung des Muskelfaserquerschnitts mittels Immunhistochemie	41
5	Diskussion	43
6	Zusammenfassung	53
	Literaturverzeichnis	54

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Consort Diagramm	28
Abb. 2	Proteinaktivierung im TGX Stain-Free TM -Gel sowie Kontrolle des Proteintransfers	36
Abb. 3	Bestimmung der Expression von nAChR α 7 mittels Westernblot	37
Abb. 4	MetHb-Fraktion an Tag 12 der Versuchsreihe und Körpergewichtsdifferenz	38
Abb. 5	Masse des M. tibialis und maximale Muskelspannkraft bei tetanischer Stimulation	40
Abb. 6	Immunhistochemische Bestimmung der Muskelfaserdicke	42
Tab. 1	Studien zum Expressionsverhalten von nAChR α 7 am Skelettmuskel	44

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
α-BTX	α -Bungarotoxin
bzw.	beziehungsweise
C.p.	Corynebacterium parvum
CIM	Critical Illness Myopathy
CINMA	Critical Illness Neuromuscular Abnormalities
CIPNM	Critical Illness Polyneuromyopathy
CIP	Critical Illness Polyneuropathy
CLP	Coekale Ligatur und Punktion
CRIMYNE	Critical Illness Myopathy and/or Polyneuropathy
DAB	Diaminobenzidin
EMG	Elektromyographie
et al.	et alii = und andere
H.E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HCl	Chlorwasserstoff
HMB	β -Hydroxy- β -Methylbutyrat
i.p.	intraperitoneal
ICUAW	Intensive Care Unit Acquired Weakness
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
M.	Musculus
MetHb	Methämoglobin
MRC-Skala	Medical Research Council-Skala
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N.	Nervus

NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaCl	Natriumchlorid
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
nAChRα7	nikotinischer Acetylcholinrezeptor alpha7
nAChRγ	fetaler nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NO	Stickstoffmonoxid
PaO₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PaCO₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PBS/T	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS/T	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween20
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V.	Vena
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Einführung

„Iucundi acti labores - Arbeiten sind angenehm, wenn sie getan sind“. Dieser berühmte Ausspruch Ciceros mag auch manchem Wissenschaftler nach Fertigstellung einer wissenschaftlichen Arbeit durch den Kopf gehen. Denn zu diesem Zeitpunkt sind zwar die unvermeidlichen Mühen des Forschungsprojekts erledigt, doch ergänzt die zurückliegende Auseinandersetzung mit der wissenschaftlichen Fragestellung nicht nur das vorhandene Wissen, sondern bereichert nachhaltig den persönlichen Erfahrungsschatz. Häufig ist eine abgeschlossene Arbeit allerdings der Anfang weiterer Forschung. Denn aus den erzielten Ergebnissen können sich neue Fragestellungen, Konzepte und Entwicklungsmöglichkeiten ergeben, an die weitere Forschungsprojekte anknüpfen. Dies trifft insbesondere auf medizinische Grundlagenforschung zu, in deren Kontext die vorliegende Arbeit zu sehen ist. Durch die Untersuchung molekularer Pathomechanismen können mögliche Zielstrukturen für eine medizinische Intervention detektiert werden, ehe eine mögliche Beeinflussung der Zielstruktur erfolgen kann. Aus praktischen und ethischen Gründen ist dafür die Entwicklung geeigneter Modelle notwendig. Beobachtungen am Modell ermöglichen dann unter Umständen analoge klinisch Schlussfolgerungen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Rolle des nikotinischen Acetylcholinrezeptors $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$) bei erworbener Muskelschwäche auf Intensivstation (ICUAW). Im Rattenmodell wurden dabei unter kontrollierten Bedingungen Risikofaktoren für die Entwicklung einer erworbenen Muskelschwäche induziert und die Auswirkungen auf die Expression des nAChR $\alpha 7$ untersucht. Darüber hinaus wurden mittels GTS-21 (3-[(2,4-Dimethoxy)Benzyliden]-Anabasein), eines spezifischen Agonisten des nAChR $\alpha 7$, die Effekte einer pharmakologischen Stimulierung auf die Expression des Rezeptors bestimmt.

1.2 Erworbene Muskelschwäche auf Intensivstation (ICUAW)

1.2.1 Terminologie

Die erworbene Muskelschwäche des kritisch Kranken (Intensive Care Unit Acquired Weakness) stellt während der Behandlung von Patienten auf Intensivstation eine ernstzunehmende Komplikation dar (Friedrich et al., 2015; Judemann et al., 2011; Stevens et al., 2007). Trotz ihrer beachtlichen medizinischen und volkswirtschaftlichen Bedeutung existierte lange Zeit keine einheitliche Terminologie der Erkrankung. In den 1980er und 1990er Jahren wurden Fallberichte und erste Studien über das Auftreten von polyneuropathischen und myopathischen Symptomen bei Patienten auf Intensivstation veröffentlicht (Bolton et al., 1984; Helliwell et al., 1991). Diese Erkrankungen wurden zunächst rein deskriptiv als Critical Illness Myopathy (CIM) bzw. Critical Illness Polyneuropathy (CIP) bezeichnet (Lacomis et al., 2000; Latronico et al., 1996). Da beide Entitäten oftmals simultan auftreten (De Jonghe et al., 2002; Khan et al., 2006) und nur mit aufwendiger apparativer Diagnostik zu unterscheiden sind (Kerbaul et al., 2004), verwendeten Wissenschaftler auch alternative Begriffe wie z.B. Critical Illness Polyneuromyopathy (CIPNM) (Routsis et al., 2010), Critical Illness Myopathy and/or Polyneuropathy (CRIMYNE) (Latronico et al., 2007) oder Critical Illness Neuromuscular Abnormalities (CINMA) (Lorin & Nierman, 2002), die dem polykausalen Konzept der erworbenen Muskelschwäche gerecht werden. Um eine präzise Terminologie festzulegen und damit eine einheitliche wissenschaftliche Kommunikation zu ermöglichen, wurde im Jahr 2009 eine Konferenz mit internationalen Experten einberufen. Hier wurde der Begriff Intensive Care Unit Acquired Weakness (ICUAW) für die Symptomatik der erworbenen Muskelschwäche festgelegt und darauf aufbauend Diagnosekriterien definiert (Griffiths & Hall, 2010; Judemann et al., 2011). Der Begriff ICUAW umfasst demzufolge die drei pathophysiologischen Entitäten CIP, CIM und CIPNM (Griffiths & Hall, 2010; Judemann et al., 2011). Aus klinischer Sicht ist diese Nomenklatur sinnvoll, da Symptomatik und Therapie der ICUAW ungeachtet der zu Grunde liegenden kausalen Pathologie kaum differieren. Um geeignete kausale Therapiekonzepte zu erforschen, sollten verschiedene Pathomechanismen dennoch getrennt voneinander beleuchtet werden (Friedrich et al., 2015).

1.2.2 Epidemiologie und Symptomatik

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Diagnosestellung, von diagnostischen Kriterien der ICUAW und dem verwendeten Patientenkollektiv variieren Studienergebnisse zur Inzidenz der ICUAW zwischen 25% und 100% (Friedrich et al., 2015; Judemann et al., 2011). In einer systematischen Review, die 24

Patientenkollektive aus 29 verschiedenen Studien umfasst, beziffern Stevens et al. (2007) die Prävalenz von neuromuskulären Veränderungen auf 46% aller eingeschlossenen Patienten, die entweder anhaltender mechanischer Beatmung, schwerer Sepsis oder Multiorganversagen ausgesetzt waren.

In der Akutphase äußert sich die ICUAW in einer generalisierten, proximal betonten Muskelschwäche, die häufig die mimische Muskulatur ausspart, das Zwerchfell hingegen mit einbezieht. Außerdem zeigt sich eine Abschwächung bzw. ein Verlust tiefer Sehnenreflexe (Berek et al., 1996; Lacomis et al., 1996; Zochodne et al., 1987). Daraus resultierende Komplikationen erhöhen die Morbidität und Mortalität der erkrankten Patienten (Ali et al., 2008; Garnacho-Montero et al., 2005; Griffiths & Hall, 2010; Hund, 2001). Insbesondere bedingt die erworbene Muskelschwäche eine verzögerte Entwöhnung von der mechanischen Beatmung, einen verlängerten Aufenthalt auf der Intensivstation sowie eine prolongierte Rehabilitation (De Jonghe et al., 2004; Garnacho-Montero et al., 2005; Lacomis et al., 1996; Zink et al., 2009), wodurch das Risiko für beatmungsassoziierte Pneumonien, tiefe Beinvenenthrombosen und Dekubitalulcera steigt (Hund, 2001). Zwar nimmt man an, dass die ICUAW eine prinzipiell reversible Erkrankung ist (Judemann et al., 2011), jedoch wurden in langfristigen Beobachtungsstudien von Patienten nach akutem Lungenversagen anhaltende funktionelle Defizite nachgewiesen: Trotz eines unauffälligen klinischen Untersuchungsbefundes zeigte sich noch fünf Jahre nach Aufnahme auf eine Intensivstation eine im Vergleich zum erwarteten alters- und geschlechtsspezifischen Wert auf 76% reduzierte Gehstrecke im sechsminütigen Zeitintervall (Herridge et al., 2003, 2011). In ihrer Arbeit belegen die Autoren auch die sozioökonomische Bedeutung der Erkrankung, indem sie die zusätzlich entstandenen Behandlungskosten innerhalb der ersten 5 Jahre nach initialem Krankenhausaufenthalt auf mehr als 40.000 kanadische Dollar pro Patient beziffern.

1.2.3 Diagnostik

Grundsätzlich lässt sich eine ICUAW beim wachen Patienten anhand der Medical Research Council-Skala (MRC-Skala) oder mittels Handdynamometrie frühzeitig diagnostizieren (Friedrich et al., 2015; Schefold et al., 2010). Die MRC-Skala ist ein klinischer Test mit guter Urteilerübereinstimmung, der fünf verschiedene Kraftgrade von jeweils sechs Bewegungen einer Körperhälfte misst. Das Ergebnis des Tests ergibt sich als Summenwert aus der Addition der einzelnen Werte (Kleyweg et al., 1991). In vielen Studien wird ein Ergebnis von weniger als 48 von 60 möglichen Punkten in der MRC-Skala mit der Diagnose einer ICUAW gleichgesetzt, sofern keine andere Erkrankung als Ursache der Paresen diagnostiziert werden kann (Ali et al., 2008; De Jonghe et al., 2002; Latronico & Rasulo, 2010). Darüber hinaus ist ein Cut-off-Wert von weniger als 11 kg bei Männern bzw. 8 kg bei Frauen in

der Handdynamometrie der dominanten Körperhälfte festgelegt (Ali et al., 2008; Latronico & Rasulo, 2010). Es konnte für beide Tests gezeigt werden, dass pathologische Ergebnisse mit einer erhöhten Mortalität während des Krankenhausaufenthalts assoziiert sind (Ali et al., 2008). Außerdem geht ein MRC-Summenwert von weniger als 48 Punkten mit einer erhöhten 1-Jahres-Mortalität einher (Hermans et al., 2014).

Diese klinischen Untersuchungsmethoden sind allerdings durch zwei Faktoren limitiert: Erstens setzen diese Tests die Möglichkeit zur Kooperation voraus, die z.B. wegen einer Vigilanzminderung im Rahmen der Grunderkrankungen nicht immer gewährleistet ist (Schefold et al., 2010). Zweitens ermöglichen reine Kraftmessungen keine Differenzierung zwischen den verschiedenen pathologischen Entitäten der ICUAW (Friedrich et al., 2015). Um eine zu Grunde liegende CIP, eine CIM oder eine Kombination beider Entitäten (CIPNM) zu diagnostizieren, bedarf es weiterer teilweise aufwendiger apparativer Untersuchungen wie der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und der Elektromyographie (EMG) (Crone, 2017; Khan et al., 2006; Tennila et al., 2000). Eine Methode zum Nachweis der ICUAW, die auch bei vigilanzgeminderten Patienten angewendet werden kann, ist die direkte Muskelstimulation, bei der das Muskelaktionssummenpotential nach direkter Stimulation des Muskels oder des motorischen Nerven gemessen wird (Crone, 2017; Seghelini, 2008). Zur definitiven Sicherung der Diagnose und zum genauen Verständnis mikroskopischer und molekularer Mechanismen können Nerven- und Muskelbiopsien notwendig sein (Judemann et al., 2011; Weber-Carstens et al., 2013).

1.2.4 Pathophysiologie

1.2.4.1 Ätiologie

Um der Entwicklung einer ICUAW präventiv entgegen zu wirken ist es wichtig, Risikofaktoren zu identifizieren, die mit einem erhöhten Auftreten der Erkrankung assoziiert sind. Dabei werden in der Literatur zahlreiche mögliche Einflussfaktoren diskutiert:

Eine zentrale Rolle in der Entstehung von neuromuskulären Veränderungen bei Patienten auf Intensivstation spielt das Vorliegen einer Sepsis oder einer systemischen Inflammationsreaktion anderer Genese (Druschky et al., 2001; Griffiths & Hall, 2010; de Letter et al., 2001; Zochodne et al., 1987). Auch die Schwere der Grunderkrankung konnte als eigenständiger Risikofaktor identifiziert werden (De Jonghe et al., 2002; Druschky et al., 2001; Friedrich et al., 2015; Nanas et al., 2008). Darüber hinaus erhöht die Inaktivität von Muskeln die Wahrscheinlichkeit eine längerfristige Muskelschwäche zu entwickeln (Hermans & Van den Berghe, 2015; Llano-Diez et al., 2012; Stevens et al., 2007). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine langfristige mechanische Beatmung zu Atrophie

und muskulärer Dysfunktion des Zwerchfells führt (Hussain et al., 2016; Levine et al., 2008). Ferner belegen tierexperimentelle Studien den Zusammenhang zwischen Immobilisation und pathologischen Veränderungen am Muskel wie z.B. Muskelatrophie und einer über das Verhältnis zur Muskelmasse hinausgehenden verminderten Muskelkraft (Fink et al., 2008; Khan et al., 2014). Zusätzlich zeigten van den Berghe et al. (2005) sowie Hermans et al. (2007) in randomisierten klinischen Studien den präventiven Effekt einer konsequenten Blutzuckereinstellung. Ein hoher Blutzuckerspiegel könnte demzufolge die Entwicklung einer ICUAW begünstigen (Nanas et al., 2008). Während man lange Zeit davon ausging, dass eine Malnutrition die Entstehung einer ICUAW begünstigen könnte (Bolton et al., 1984), zeigen neuere Studien keine oder sogar kontraproduktive Effekte eines frühzeitigen parenteralen Ausgleichs einer mangelnden Nahrungsaufnahme (Casaer, 2015; Hermans et al., 2013; Needham et al., 2013). Über die Rolle von Glukokortikoiden in der Pathogenese der ICUAW existieren widersprüchliche Angaben: Einerseits nähren tierexperimentelle und klinische Studien den Verdacht, dass der Gebrauch von Glukokortikoiden mit einer erhöhten Inzidenz von ICUAW assoziiert ist (De Jonghe et al., 2002; Massa et al., 1992; Rouleau et al., 1987), andererseits konnten Glukokortikoide in anderen Studien nicht als eigenständige Risikofaktoren identifiziert werden (de Letter et al., 2001; Nanas et al., 2008; Weber-Carstens et al., 2010). Durch Modifikation mehrerer Risikofaktoren wie beispielsweise der systemischen Inflammation und des Blutzuckerhaushalts scheinen Glukokortikoide die Entstehung der erworbenen Muskelschwäche eher indirekt zu beeinflussen. Ihre Wirkung ist womöglich auch von Zeitpunkt und Dosierung der Medikation abhängig (Friedrich et al., 2015). Zuletzt wird der Einsatz von nicht-depolarisierenden Muskelrelaxantien in einigen Fallberichten und Studien mit der Entwicklung einer ICUAW in Verbindung gebracht (Garnacho-Montero et al., 2001; Segredo et al., 1992), neuere Studien konnten allerdings keine Korrelation zwischen dem Einsatz nicht-depolarisierender Muskelrelaxantien und der Entwicklung einer klinisch relevanten neuromuskulären Dysfunktion nachweisen (Nanas et al., 2008; Papazian et al., 2010; Weber-Carstens et al., 2010).

1.2.4.2 Pathogenetische Veränderungen

Der erworbenen Muskelschwäche auf Intensivstation kann eine CIP, eine CIM oder auch eine CIPNM zu Grunde liegen (Griffiths & Hall, 2010; Judemann et al., 2011). Obwohl multiple molekulare Veränderungen am Nerv wie am Muskel beobachtet werden können, ergibt sich derzeit kein stringentes Konzept der komplexen Pathogenese (Friedrich et al., 2015; Zink et al., 2009). Viele pathologische neuro- und myopathische Veränderungen spielen sich gleichzeitig ab und beeinflussen sich womöglich gegenseitig (Friedrich et al., 2015; Judemann et al., 2011). Im Folgenden sollen mehrere Mechanismen, die an der

Entstehung einer ICUAW beteiligt sein können, aufgeführt werden. Aus pathogenetischer Sicht macht es dabei Sinn, CIP und CIM getrennt voneinander zu beleuchten, obwohl beide Entitäten mehrheitlich simultan auftreten (De Jonghe et al., 2002; Zink et al., 2009).

Die CIP äußert sich charakteristisch als eine distale sensorisch-motorische axonale Polyneuropathie (Latronico et al., 1996; Z'Graggen et al., 2006). Folglich zeigt sich in elektrophysiologischen Untersuchungen eine Reduktion des Aktionspotentials motorischer sowie sensorischer Nerven bei gleichzeitig in Relation allenfalls leicht verzögerter NLG (Bednarik et al., 2003; Z'Graggen et al., 2006; Zifko et al., 1998). Für die axonale Schädigung der peripheren Nervenendigungen ist unter anderem eine Mikrozirkulationsstörung verantwortlich, die folgende pathogenetische Schädigungsmechanismen verursacht: Erstens bedingt eine erhöhte Kapillarpermeabilität, wie sie beispielsweise bei einer Sepsis auftritt, die Entwicklung eines endoneurialen Ödems und ermöglicht einen verstärkten Übertritt neurotoxischer Faktoren ins Gewebe (Bolton, 2005; Fenzi et al., 2003). Zweitens entwickelt sich durch die verminderte Perfusion im Rahmen der Mikrozirkulationsstörung eine progrediente Einschränkung der Energieversorgung. Aus dem entstandenen Energiemangel resultiert zunächst ein funktionelles elektrophysiologisch messbares Versagen des Neurons. Im Verlauf kommt es zu histologisch nachweisbaren Zellschädigungen bis hin zum Untergang der Nervenfasern (Judemann et al., 2011; Latronico et al., 1996; Tennila et al., 2000).

Mit der Entwicklung einer CIM werden zahlreiche molekulare Veränderungen in Verbindung gebracht, die alleine oder in Kombination für die Pathogenese ursächlich sein können (Griffiths & Hall, 2010; Stevens et al., 2007): Die erworbene Muskelschwäche auf Intensivstation geht mit einem Verlust der Muskelmasse einher (Klaude et al., 2007; Powers et al., 2007; Schefold et al., 2010). Diese Muskelatrophie beruht auf einer Dysbalance zwischen katabolen und anabolen Faktoren. So beobachtet man eine verringerte Synthese von Muskelproteinen (Gordon et al., 2013; Phillips et al., 2009) bei gleichzeitig vermehrter Proteolyse (Klaude et al., 2007; Powers et al., 2007). Muskelbiopsien septischer Patienten deuten auf eine verstärkte Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Signalwegs (Klaude et al., 2007; Tiao et al., 1997) hin. Darüber hinaus spielen auch calciumabhängige nicht-lysosomale Signalwege wie z.B. die Aktivierung von Caspasen in der Degradation von Muskelproteinen eine Rolle (Friedrich et al., 2015; Schefold et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass daraus überwiegend ein Verlust von schweren Myosinketten resultiert, während andere Proteine des kontraktilen Apparats deutlich schwächer betroffen sind (Wollersheim et al., 2014; Zink et al., 2009). In ihrer 2004 veröffentlichten Studie wiesen Di Giovanni et al. eine verstärkte Induktion proapoptotischer Signalwege an Muskeln von Patienten mit CIM nach. Die Autoren führen den Muskelverlust bei Patienten mit erworbener Muskelschwäche auf Intensivstation daher auch auf eine erhöhte Apoptoserate quergestreifter Muskulatur zurück (Di Gio-

vanni et al., 2004).

Im Gegensatz zu Syndromen mit reinem Muskelschwund beruht die CIM nicht allein auf einer Muskelatrophie, sondern auch auf einer Verringerung der Kontraktionskraft pro Fläche, der sogenannten spezifischen Muskelkraft (Judemann et al., 2011; Schefold et al., 2010). Passend dazu fällt in elektrophysiologischen Untersuchungen eine verminderte Erregbarkeit des Muskels bereits im frühen Krankheitsverlauf auf (Friedrich et al., 2005; Weber-Carstens et al., 2009). Tierexperimentelle Studien zeigten, dass sowohl passive Membraneigenschaften wie die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials als auch aktive Membraneigenschaften wie die Generierung und Weiterleitung des Muskelaktionspotentials beeinträchtigt sind (Friedrich et al., 2005; Rich et al., 1998; Teener & Rich, 2006). Man nimmt an, dass eine Dysfunktion sowie eine Dysregulation von schnellen Natriumkanälen die verminderte bzw. aufgehobene Erregbarkeit der Muskelfasern verursachen (Filatov & Rich, 2004; Rich et al., 1998; Teener & Rich, 2006).

Darüber hinaus vermindern Störungen des intrazellulären Calcium-Haushalts die Kontraktionsfähigkeit der Muskelfasern: Auch hier konnte man anhand tierexperimenteller Studien eine verminderte Freisetzung an Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Reticulum nachweisen (Friedrich et al., 2004; Zink et al., 2008). Obwohl es gleichzeitig zu einer vermehrten Expression des Ryanodin1-Rezeptors und einer erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates kommt, resultieren aus der verminderten Ca^{2+} -Freisetzung eine gestörte elektromechanische Kopplung und damit eine reduzierte Kontraktionskraft (Friedrich et al., 2004; Judemann et al., 2011; Rossignol et al., 2008; Zink et al., 2008).

Charakteristisch für schwere Inflammationsreaktionen ist sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell eine Erhöhung von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$), Interferonen und Interleukinen, auch wenn sich die zeitlichen Verläufe der Zytokinexpression zwischen den Spezies unterscheiden (Chensue et al., 1991; Friedrich et al., 2015; Petersen & Pedersen, 2005). Einige dieser Zytokine scheinen an der Entwicklung einer CIM beteiligt zu sein: So fördert $\text{TNF}\alpha$ in vitro über eine Beeinflussung auf transkriptioneller Ebene die Entwicklung einer Muskelatrophie und eines selektiven Proteinverlusts (Li et al., 1998; Li & Reid, 2000). Ferner konnte in tierexperimentellen Studien eine durch $\text{TNF}\alpha$ vermittelte Abnahme der spezifischen Muskelkraft gezeigt werden (Li & Reid, 2000; Reid et al., 2002). Diese kann dadurch erklärt werden, dass die Exposition gegenüber $\text{TNF}\alpha$ zu einem raschen Anstieg intrazellulärer hochreaktiver Sauerstoffspezies führt (Li & Reid, 2000; Macdonald et al., 2003). Oxidativer Stress wiederum bedingt neben vielen weiteren Schädigungsmechanismen der Zelle eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette, sodass es zu einer unzureichenden Energieversorgung der Zelle kommen kann (Judemann et al., 2011; Macdonald et al., 2003).

Die klinische und experimentelle Beobachtung, dass Sepsis und Verbrennungsverletzungen ein ver-

mindertes Ansprechen von nicht-depolarisierenden Muskelrelaxantien zu Folge haben (Marathe et al., 1989; Martyn et al., 1980; Narimatsu et al., 2005; Niiya et al., 2006), lässt vermuten, dass bei ICUAW pathogenetische Veränderungen nicht nur am Nerv und am Muskel, sondern auch an der neuromuskulären Synapse erfolgen (Friedrich et al., 2015). Mit dem Ziel solche pathogenetischen Veränderungen an der neuromuskulären Endplatte zu spezifizieren, führten Niiya et al. (2006) 18 Stunden nach Induktion einer Sepsis elektrophysiologische Untersuchungen am Zwerchfell von Ratten durch. Hierbei zeigte sich präsynaptisch eine erhöhte Freisetzung von Acetylcholin, während es postsynaptisch zu einer verringerten Sensitivität gegenüber Acetylcholin kam. Diesen Effekt erklären sich die Autoren durch eine möglicherweise verstärkte Aktivität der Acetylcholinesterase oder durch eine verringerte Dichte an postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren, die in einer älteren Studie nachgewiesen werden konnten (Tsukagoshi et al., 1999). Im Gegensatz dazu beobachteten andere Arbeitsgruppen in tierexperimentellen Studien zur ICUAW aber keine Veränderung (Frick et al., 2008) oder vielmehr eine Hochregulierung der Expression postsynaptischer Acetylcholinrezeptoren (Fink et al., 2008; Frick et al., 2010) sowie eine Ausbreitung der Rezeptoren über die junctionale Zone hinaus (Martyn & Richtsfeld, 2006). Zudem wiesen einige Arbeiten eine verstärkte Expression fetaler Isoformen der Acetylcholinrezeptoren nach (Khan et al., 2014; Liu et al., 2014), worauf neben möglichen funktionellen Konsequenzen an anderer Stelle im Detail eingegangen werden soll.

1.2.5 Therapie in der klinischen Praxis

Da wegen der Diversität und der Komplexität der pathogenetischen Vorgänge derzeit keine kausale Therapie der Erkrankung existiert (Friedrich et al., 2015; Judemann et al., 2011), rückt die Entwicklung geeigneter Strategien zur Prävention der ICUAW ins Blickfeld des wissenschaftlichen Interesses (Griffiths & Hall, 2010; Hermans & Van den Berghe, 2015). Eine therapeutische Beeinflussung der im vorherigen Kapitel aufgezählten Risikofaktoren liegt dabei natürlich nahe.

So konnte in randomisierten klinischen Studien gezeigt werden, dass eine frühzeitige Mobilisierung der Patienten ein verbessertes funktionelles Outcome bewirkt (Schaller et al., 2016; Schweickert et al., 2009). Ebenso nimmt man an, dass eine frühzeitige Aktivierung des Zwerchfells erworbene Schwächen der Atemmuskeln reduziert (Eikermann & Latronico, 2013; Grosu et al., 2012; Hermans & Van den Berghe, 2015). Einige Studien wiesen einen präventiven Effekt elektrischer Muskelstimulation nach (Meesen et al., 2010; Weber-Carstens et al., 2013). Durch eine Regulierung des Blutzuckers mittels Insulin kann das Auftreten von CIPNM reduziert werden (Van den Berghe et al., 2005; Hermans et al., 2007), allerdings erhöht eine intensivierete Blutzuckereinstellung kritisch kranker Patienten die Inzi-

denz von Hypoglykämien (Finfer et al., 2015), sodass die Entwicklung eines optimalen Therapieregimes weiterer Forschung bedarf. Eine konsequente Therapie der Sepsis als einer der Hauptfaktoren in der Entwicklung von ICUAW ist von entscheidender Bedeutung (Hermans & Van den Berghe, 2015; Judemann et al., 2011), jedoch verliefen Studien mit dem Versuch antiinflammatorischer Therapien oder spezifischer Immunmodulation zusätzlich zur Basistherapie der Sepsis bisher enttäuschend (Friedrich et al., 2015; Hermans & Van den Berghe, 2015). Ein frühzeitiger parenteraler Ausgleich verringerter Nahrungsaufnahme mit dem Ziel, der katabolen Stoffwechsellage und dem damit verbundenen Verlust an Muskelgewebe entgegenzuwirken, erscheint keinen positiven Effekt zu bewirken (Casaer, 2015; Needham et al., 2013) oder sogar kontraproduktiv zu sein (Hermans et al., 2013). Der Nutzen von Glukokortikoiden wird kontrovers diskutiert: Zwar begünstigte die Verwendung von Glukokortikoiden in Tierexperimenten die Entwicklung einer ICUAW (Massa et al., 1992; Rouleau et al., 1987), auf der anderen Seite könnte die antiinflammatorische Wirkung von Steroiden vorteilhaft sein (Hermans et al., 2007). Da die Balance zwischen anabolen und katabolen Stoffwechselfvorgängen im Muskelgewebe hormonellen Kontrollmechanismen unterliegt, erscheint auch der Versuch einer hormonellen Therapie pathogenetisch plausibel. Eine hochdosierte Therapie mit Wachstumshormon bewirkte allerdings eine erhöhte Morbidität und Mortalität (Takala et al., 1999). Dagegen konnte bei Patienten mit Verbrennungsverletzungen durch den Einsatz von Testosteronderivaten eine Verkürzung des Aufenthalts auf Intensivstation sowie eine Reduktion des Verlusts an Körpergewicht erreicht werden (Jeschke et al., 2007; Wolf et al., 2006). Insbesondere bei älteren Patienten konnte durch den Einsatz von β -Hydroxy- β -Methylbutyrat (HMB) der Verlust an Muskelmasse reduziert werden. Die Autoren postulieren ein relevantes therapeutisches Potential dieses Wirkstoffes in der Behandlung von ICUAW (Rahman et al., 2014).

Die Weiterentwicklung erfolgreicher therapeutischer Strategien stellt eine wichtige Aufgabe zukünftiger Forschung dar. Ein verbessertes Verständnis pathogenetischer Vorgänge der ICUAW ist essentiell, um geeignete Zielstrukturen für die Therapie zu identifizieren (Griffiths & Hall, 2010; Hermans & Van den Berghe, 2015).

1.2.6 ICUAW im Tiermodell

Wie in den vorangehenden Kapiteln erwähnt tragen tierexperimentelle Studien dazu bei, die komplexe multifaktorielle Pathogenese der ICUAW zu verstehen. Aus praktischen, organisatorischen und finanziellen Gründen ist es allerdings unmöglich, die Situation von Patienten auf Intensivstation mit allen möglichen Auslösern der erworbenen Muskelschwäche originalgetreu auf das Tiermodell zu übertragen.

Die Strategien tierexperimenteller Studien zur Grundlagenforschung zielen daher darauf ab, durch kontrollierten Einsatz einzelner Risikofaktoren der ICUAW Veränderungen zu bewirken, die einer ICUAW nahekommen (Friedrich et al., 2015). Beispielsweise induzierten Wissenschaftler eine systemische Inflammationsreaktion durch Infektion (Liu et al., 2014; Xie et al., 2016) oder Applikation von Lipopolysacchariden (Chai et al., 2003; Holecek, 2012), führten eine längerfristige mechanische Beatmung durch (Corpeno et al., 2014; Ochala et al., 2011; Renaud et al., 2013), immobilisierten Extremitäten der Versuchstiere (Khan et al., 2014; Lee et al., 2014) oder verabreichten Medikamente, die die neuromuskuläre Übertragung blockierten (Ochala et al., 2011; Renaud et al., 2013). Pathologische Veränderungen wie z.B. elektrische Hypoexzitabilität (Liu et al., 2014; Khan et al., 2014; Staeuble et al., 2016), Muskelatrophie (Khan et al., 2014; Staeuble et al., 2016) oder bevorzugte Degradation von Myosin (Massa et al., 1992; Mozaffar et al., 2007) indizieren das Vorhandensein einer kritischen Muskelschwäche. Dabei stellt man fest, dass diese pathologischen Veränderungen insbesondere bei Nagetieren wie Mäusen oder Ratten den Mechanismen humaner CIPNM ähneln, weshalb sich diese Tiere als Modelle eignen (Friedrich et al., 2015; Ochala et al., 2011).

Fink et al. etablierten 2008 eine Methode zur Simulation der ICUAW an Ratten, auf der auch die vorliegende Arbeit basiert: In einem sogenannten Double-Hit Modell untersuchten die Autoren die Effekte von Immobilisation und systemischer Infektion bzw. der Kombination beider Faktoren. Im Gegensatz zu älteren Studien, in denen Immobilisation durch Denervierung hervorgerufen wurde (Massa et al., 1992; Rouleau et al., 1987), bedienten sich die Autoren der mechanischen Fixation einer hinteren Extremität über einen Versuchszeitraum von 12 Tagen unter Erhalt der neuromuskulären Endplatte (Fink et al., 2008). Diese Methode kommt der klinischen Praxis humaner Patienten näher und ermöglicht eine Beeinflussung des Muskels durch trophische Faktoren (Friedrich et al., 2015). Durch die Applikation von *Corynebacterium parvum* an den Versuchstagen 0, 4 und 8 wurde eine systemische Inflammation induziert. Die Analyse laborchemischer Parameter wie zum Beispiel α -acid Glykoprotein und Methämoglobin belegte dabei den Erfolg der Intervention (Fink et al., 2008).

1.3 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor alpha7 (nAChR α 7)

1.3.1 Struktur

Die entscheidende Struktur für die neuromuskuläre Signalübertragung ist die neuromuskuläre Synapse. Kommt es zu einer Depolarisation der peripheren Nervenendigung, wird präsynaptisch per Exozytose Acetylcholin freigesetzt. Dieser Neurotransmitter bindet postsynaptisch an nikotinische Acetylcholinre-

zeptoren an der Muskelmembran. Nach Bindung des Transmitters erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die einen Einstrom von Ionen in die Muskelzelle erlaubt. Dadurch entsteht ein Endplattenpotential, das über mehrere Schritte der elektromechanischen Kopplung eine Kontraktion der Muskelfaser bewirkt (Cohen-Cory, 2002; Martyn et al., 2009).

Es ist zu beachten, dass postsynaptisch verschiedene Isoformen von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) detektiert werden können, die sich hinsichtlich Struktur, Expressionsverhalten, Kanaleigenschaften, Funktion und pharmakologischer Beeinflussung unterscheiden. Im Wesentlichen sind an dieser Stelle drei relevante Isoformen zu nennen: Der adulte nAChR, der fetale nAChR (nAChR γ) und der nAChR $\alpha 7$ (Lindstrom, 2003; Martyn et al., 2009). Adulter sowie fetaler nAChR gehören zur Gruppe der muskulären nAChR und bestehen aus fünf Untereinheiten. Während sich der adulte nAChR, der bei gesunden und erwachsenen Säugetieren ausschließlich exprimiert wird, aus zwei $\alpha 1$ -, einer $\beta 1$ -, einer δ - und einer ϵ -Untereinheit zusammensetzt, formiert sich der nAChR γ , den man vor und kurz nach der Geburt sowie unter bestimmten pathologischen Gegebenheiten nachweisen kann, aus zwei $\alpha 1$ -, einer $\beta 1$ -, einer δ - und einer γ - Untereinheit. Es kommt also in der Entwicklung zu einem Austausch der γ -Untereinheit hin zu einer ϵ -Untereinheit (Lindstrom, 2003; Lloyd & Williams, 2000; Martyn et al., 2009). Dieser Entwicklungsschritt wird durch Neuroreguline wie beispielsweise Acetylcholine Receptor Inducing Activity gesteuert (Missias et al., 1996).

Im Gegensatz zu diesen beiden heteromeren Proteinen setzt sich der zur Gruppe der neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptoren gehörende nAChR $\alpha 7$ aus fünf identischen $\alpha 7$ -Untereinheiten zusammen (Lindstrom, 2003; Lukas et al., 1999). Diese bestehen jeweils aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, über die die Bindung eines Liganden vermittelt wird, vier Transmembrandomänen (TM) und einer intrazellulären Domäne zwischen TM3 und TM4. Die fünf $\alpha 7$ -Untereinheiten bilden einen zentralen Porus (De Jonghe & Ulloa, 2007). Ein Zusammenspiel der extrazellulären Proteindomänen bewirkt nach Ligandenbindung eine Konformationsänderung des Rezeptors, die den Ioneneinstrom durch den Porus ermöglicht (Bouzat et al., 2004; De Jonghe & Ulloa, 2007). Charakteristisch für die nAChR $\alpha 7$ ist dabei eine im Vergleich zu anderen nAChRs bemerkenswert hohe Calcium-Permeabilität (Berg & Conroy, 2002). Welche Konsequenzen die unterschiedlichen Leitfähigkeiten der Rezeptoren und die dadurch womöglich veränderte intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase in der Muskelzelle bewirken, bedarf weiterer Forschung. An dieser Stelle seien aber tierexperimentelle und in vitro Studien mit anderen Geweben wie zum Beispiel Makrophagen oder Endothelzellen erwähnt, die eine Regulierung von intrazellulären Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren via allosterischer Effekte des nAChR $\alpha 7$ zeigten (De Jonghe & Ulloa, 2007; Saeed et al., 2005; Wang et al., 2004).

1.3.2 Expression im Skelettmuskel

Der nAChR α 7 wird in vielen verschiedenen Zelltypen und Geweben exprimiert. Man trifft zum Beispiel in Cortex und Hippocampus auf Neurone, die nAChR α 7 exprimieren (Guan et al., 2000). Dort sind die Rezeptoren an zentralen kognitiven Prozessen beteiligt und deshalb Gegenstand der Demenzforschung (Guan et al., 2000; Kem, 2000). Außerdem findet eine Expression des Rezeptors an oralen Keratinozyten (Osta et al., 2010), Makrophagen (Khan et al., 2012; Matsunaga et al., 2001; Wang et al., 2003) und an Endothelzellen (Saeed et al., 2005) statt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass das Vorliegen einer kritischen Erkrankung die Expression von nAChR α 7 in einigen Geweben beeinflusst: So konnte mittels Real Time Polymerasekettenreaktion (PCR) gezeigt werden, dass orale Keratinozyten bei Patienten auf Intensivstation verstärkt nAChR α 7 und nAChR γ exprimieren, wobei dieser Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe besonders bei Patienten mit Verbrennungsverletzungen zu beobachten war (Osta et al., 2010). Daneben wiesen Khan et al. (2012) *in vitro* nach, dass eine Exposition gegenüber Lipopolysaccharid (LPS) eine verstärkte Expression von nAChR α 7 in Makrophagen von Ratten zur Folge hat.

Im Gegensatz zu den genannten Zelltypen zeigt sich im gesunden adulten Skelettmuskel keine Expression von nAChR α 7 (Fischer et al., 1999; Martyn et al., 2009). In ihrer tierexperimentellen Studie an Ratten demonstrierten Fischer et al., dass der Rezeptor während der Fetalperiode und nach ein- bis sechswöchiger Denervierung auch am Skelettmuskel nachgewiesen werden kann. Dabei zeigte sich die höchste Expression in der ersten postnatalen Woche bzw. sechs Wochen nach Denervierung. Die Autoren vermuten, dass über den Rezeptor auch metabotrope Effekte ausgelöst werden, die zur Synaptogenese sowie zur Stabilisierung der neuromuskulären Endplatte beitragen (Fischer et al., 1999). Seit dieser Beobachtung stellt sich die Frage, ob neben einer Denervierung auch andere Faktoren, die mit der Entstehung einer CIPNM assoziiert sind, eine veränderte Expression von nAChR α 7 bewirken können und welche funktionellen Konsequenzen sich daraus ergeben. Um den Einfluss bestimmter Faktoren auf die Expression des Rezeptors am Skelettmuskel zu untersuchen, wurden in der Folge mehrere tierexperimentelle Studien initiiert, deren Ergebnisse an anderer Stelle im Detail präsentiert und diskutiert werden sollen. Zusammenfassend ergeben sich in diesen Studien Hinweise darauf, dass pathologische Zustände des Skelettmuskels in Folge einer Immobilisation (Khan et al., 2014; Lee et al., 2014) oder systemischen Inflammation (Liu et al., 2014; Xie et al., 2016) zu einer Expression von nAChR α 7 am Skelettmuskel führen können. Aktuell gibt es allerdings noch keine Studie, die sich mit dem Einfluss einer Kombination von Immobilisation und Inflammation auf die Expression von nAChR α 7 befasst. Die Auswirkungen einer pharmakologischen Aktivierung des nAChR α 7 auf seine Expression wurden bis dato ebenfalls noch nicht untersucht.

1.3.3 Funktion

Obwohl die Expression von nAChR α 7 am Skelettmuskel bereits vor vielen Jahren nachgewiesen werden konnte (Fischer et al., 1999), bleibt die Funktion des Rezeptors weitestgehend ungeklärt (Khan et al., 2014). Zunächst ist festzuhalten, dass der nAChR α 7 an der neuromuskulären Übertragung beteiligt ist: Tsuneki et al. (2003) zeigten in ihrer Studie, dass bei Mäusen auch nach pharmakologischer Blockade der muskulären nAChR eine Depolarisation der Zelle mittels Cholin ausgelöst werden kann. Dieser Effekt ist bei Mäusen ohne das für nAChR α 7 codierende Gen nicht zu beobachten. Man kann also davon ausgehen, dass eine Depolarisation der Zelle durch eine Aktivierung der nAChR α 7 erfolgen kann. In ihrer Studie bestimmten Lee et al. (2014) im Mausmodell die Beteiligung der einzelnen Isoformen des nAChR an der neuromuskulären Übertragung nach zweiwöchiger Immobilisation. In der Mechanomyographie blieben nach pharmakologischer Blockade der nAChR und nAChR γ 20% der singulären Muskelspannkraft erhalten. Nachdem die Autoren durch die zusätzliche Gabe von Methyllycaconitin die nAChR α 7 spezifisch antagonisierten, reduzierte sich die motorische Reaktion um insgesamt mehr als 96% vom Ausgangswert. Dies zeigte, dass vor der spezifischen pharmakologischen Blockade nAChR α 7 an der neuromuskulären Übertragung beteiligt waren (Lee et al., 2014). Folglich kann eine Stimulation der nAChR α 7 ein relevantes Endplattenpotential hervorrufen und die neuromuskuläre Übertragung ermöglichen. Da die nAChR α 7 im Skelettmuskel ausschließlich während der Fetalperiode oder unter pathologischen Bedingungen exprimiert werden (Liu et al., 2014; Martyn et al., 2009), liegt die Vermutung nahe, dass der Rezeptor nicht nur an der neuromuskulären Übertragung beteiligt ist, sondern darüber hinaus weitere Funktionen übernimmt (Fischer et al., 1999). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann über diese Funktionen im Skelettmuskel allerdings nur spekuliert werden. Prinzipiell ist es aber möglich, dass eine Aktivierung von nAChR α 7 an der neuromuskulären Endplatte auch metabotrope Effekte bewirken kann (Fischer et al., 1999). So könnten intrazelluläre Signalwege beeinflusst werden, die unter anderem einen Einfluss auf die Genexpression bestimmter Proteine nehmen. Dazu passend weisen nAChR α 7 eine hohe Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen auf, die bekanntlich als second messenger fungieren können (Castro & Albuquerque, 1995; Seguela et al., 1993). In nichtmuskulären Geweben konnten solche nAChR α 7-vermittelte metabotrope Effekte nachgewiesen werden (De Jonghe & Ulloa, 2007). So zeigte sich, dass nAChR α 7 den Jak-2/STAT-3-Signalweg aktivieren (Arredondo et al., 2006; Maldifassi et al., 2014) und den Transkriptionsfaktor NF- κ B inhibieren können (Saeed et al., 2005).

Fischer et al. vermuten, dass nAChR α 7 im Skelettmuskel eine entscheidende Rolle bei der Synaptogenese spielen. Aufgrund ihrer Beobachtung im Rattenmodell, dass während der Wundheilung vermehrt nAChR α 7 in Satellitenzellen exprimiert werden, gehen Tian et al. (2015) davon aus, dass der Rezeptor

an muskulären Regenerationsvorgängen beteiligt ist. In Anbetracht der Tatsache, dass in systemisch zirkulierenden Blutzellen antiinflammatorische Effekte via nAChR α 7 vermittelt werden, wäre auch eine lokale antiinflammatorische Funktion des Rezeptors am Skelettmuskel denkbar.

Man geht davon aus, dass der parasympathische Nervus (N.) vagus systemische antiinflammatorische Effekte vermittelt (Borovikova et al., 2000; De Jonghe & Ulloa, 2007; Wang et al., 2004). Bei der Regulierung dieses cholinergen antiinflammatorischen Signalwegs spielen nAChR α 7 zirkulierender Immunzellen eine entscheidende Rolle, was man sich therapeutisch zu Nutze machen könnte (De Jonghe & Ulloa, 2007). So fanden Wang et al. (2003) in ihrer Studie am Mausmodell heraus, dass die elektrische Stimulation des N. vagus zu einer verminderten Produktion von TNF α führt. Bei nAChR α 7-defizienten Mäusen blieb die Inhibition der Zytokinproduktion hingegen aus. Ebenso führte in der Studie von Khan et al. (2012) die systemische Gabe von GTS-21, einem spezifischen Agonisten des nAChR α 7, zu einer verringerten LPS-induzierten Produktion von TNF α . Darüber hinaus zeigten die Autoren, dass die Gabe von GTS-21 bei Mäusen mit Verbrennungsverletzungen die Mortalität signifikant reduziert.

1.3.4 Pharmakologische Eigenschaften

Der nAChR α 7 unterscheidet sich nicht nur in Struktur, Expressionsverhalten und Funktion, sondern auch in pharmakologischen Eigenschaften von muskulären nAChR. Bemerkenswert ist dabei, dass neben dem Neurotransmitter Acetylcholin auch das Spaltprodukt Cholin, das nach der Spaltung von Acetylcholin durch die Cholinesterase entsteht, den Rezeptor aktivieren kann (Alkondon et al., 1997; Fischer et al., 1999). Zwar blockieren unspezifische Antagonisten der nAChR wie das in experimentellen Studien häufig verwendete α -Bungarotoxin (α -BTX) auch den nAChR α 7 (Albuquerque et al., 1997; Lee et al., 2014), doch können einige Pharmaka wie zum Beispiel Methyllycaconitin auch als spezifische Agonisten bzw. Antagonisten des nAChR α 7 fungieren (Lee et al., 2014). Eine selektive Aktivierung des nAChR α 7 kann unter anderem mittels GTS-21 (3-[(2,4-Dimethoxy)Benzyliden]-Anabasein) oder CAP55 erzielt werden (De Jonghe & Ulloa, 2007; Saeed et al., 2005).

Der in dieser Arbeit verwendete Wirkstoff GTS-21 ist ein hochselektiver partieller Agonist des nAChR α 7 (De Jonghe & Ulloa, 2007), der in den letzten Jahren im Rahmen von klinischen Studien zur Behandlung neurodegenerativer und psychiatrischer Erkrankungen eingesetzt wurde (Kem, 2000; Kitagawa et al., 2003; Olincy et al., 2006). In klinischen Phase II-Studien an gesunden, nicht rauchenden Freiwilligen zeigten sich keine nennenswerten Nebenwirkungen von GTS-21 (Kitagawa et al., 2003; Kox et al., 2011). Darüber hinaus wurde GTS-21 in tierexperimentellen Studien verwendet, um den Einfluss einer

medikamentösen Stimulation der nAChR α 7 im Rahmen systemischer Inflammation zu untersuchen: Im Mausmodell konnte durch die Applikation des Medikaments die Schwere einer experimentell induzierten Pankreatitis reduziert werden (Van Westerloo et al., 2006). In der bereits zitierten Studie von Khan et al. (2012) führte die Gabe von GTS-21 bei Mäusen zu einer verringerten LPS-induzierten Synthese von TNF α und zu einer reduzierten Mortalität nach Induktion einer Verbrennungsverletzung.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass GTS-21 auch bei Menschen eine systemische Inflammationsreaktion beeinflussen kann. Um diesen Effekt zu untersuchen, führten Kox et al. (2011) eine Studie an gesunden, nicht rauchenden Testpersonen durch. Drei Tage vor Induktion einer systemischen Inflammation mittels Endotoxingabe verabreichten die Autoren den Probanden der Interventionsgruppe GTS-21 in einer Dosierung von 150 mg drei mal täglich oral. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Zytokinlevel im Blutplasma sowie der klinischen Parameter zwischen Interventions- und Kontrollgruppe, auch wenn innerhalb der Interventionsgruppe eine Korrelation zwischen den Medikamentenspiegeln im Blutplasma und den Zytokinspiegeln bestand. Aus diesem Grund vermuten die Autoren, dass pharmakokinetische Gründe den fehlenden Nachweis der klinischen Wirksamkeit von GTS-21 erklären.

2 Hypothesen

Die klinische und volkswirtschaftliche Bedeutung der ICUAW, die im vorangegangenen Kapitel aufgezeigt wurde, unterstreicht die Notwendigkeit, die polykausale Pathogenese der Erkrankung umfänglich zu erforschen und mögliche therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren. Basierend auf dem aktuellen Stand der Forschung konzentriert sich die vorliegende Arbeit dabei auf die Rolle des nAChR α 7. Dazu sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Immobilisation führt zu einer erhöhten Expression von nAChR α 7 am Skelettmuskel.
2. Eine systemische Inflammation bewirkt eine Hochregulierung der Expression von nAChR α 7 am Skelettmuskel.
3. Die systemische Gabe von GTS-21 schwächt die Effekte von Immobilisation und Inflammation am Skelettmuskel ab und vermindert die Expression des nAChR α 7.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell und Studiendesign

Das bereits in Kapitel 1.2.6 erläuterte und von Fink et al. (2008) etablierte Double-Hit Modell bildet die Grundlage der tierexperimentellen Versuchsreihe. Es ermöglicht die Untersuchung der Auswirkungen einer 12 Tage andauernden kontinuierlichen systemischen Inflammation, einer Immobilisation unter Erhalt der neuromuskulären Übertragung sowie einer Kombination beider Interventionen.

Die Genehmigung zur Durchführung der tierexperimentellen Versuche wurde durch eine institutionelle Prüfungskommission erteilt (Subcommittee on Research Animal Care, Committee on Research, Massachusetts General Hospital, #2010N000168). In die Studie wurden 125 männliche Sprague-Dawley Ratten (Taconic Farms Inc, Germantown, NY, USA, 151 – 175g) eingeschlossen, die zunächst für ≥ 7 Tage an diealtungsbedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter akklimatisiert wurden.

In Anlehnung an das Double-Hit Modell wurde jedes Tier zufällig einer der vier Interventionsgruppen zugeordnet:

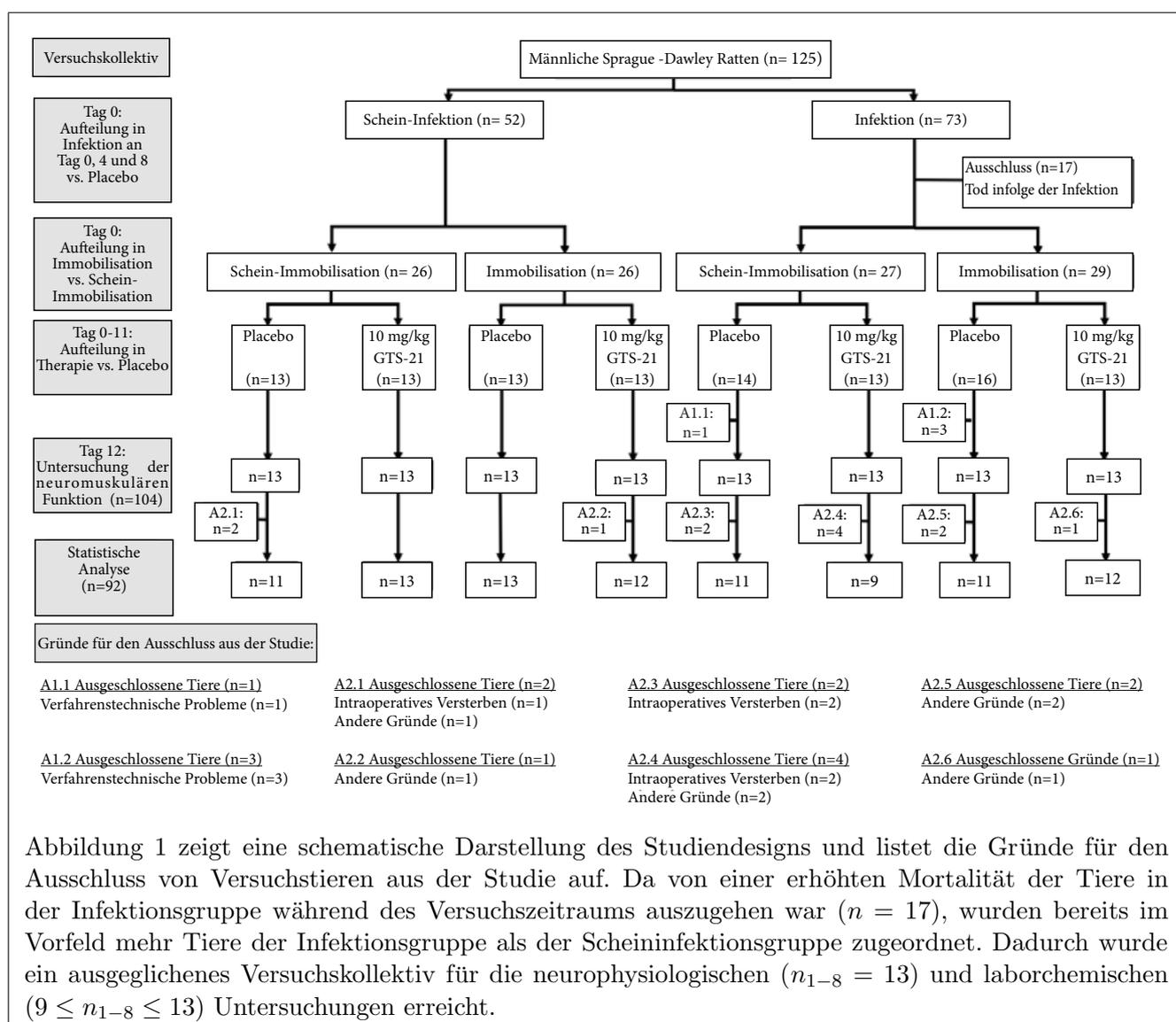
1. Schein-Immobilisation und Schein-Infektion
2. Immobilisation und Schein-Infektion
3. Schein-Immobilisation und Infektion
4. Immobilisation und Infektion

Eine Übersicht der Verteilung der Tiere in die einzelnen Interventionsgruppen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Immobilisation einer der beiden hinteren Extremitäten erfolgte mittels Kirschnerdrahtstiftung. Dabei wurden die Kirschnerdrähte so angebracht, dass eine mechanische Fixation des Kniegelenks in Flexionsstellung und des Sprunggelenks in Dorsalextensionsstellung erzielt wurde. Bei Tieren der Immobilisationsgruppe bewirkten die Drähte eine Immobilisation von Knie- und Sprunggelenk über einen Zeitraum von 12 Tagen, wohingegen sie bei Tieren der Scheinimmobilisationsgruppe direkt nach ihrem Einsatz wieder entfernt wurden. Diese operativen Interventionen wurden jeweils nur an einer Extremität der Tiere durchgeführt, um einen Vergleich mit der kontralateralen Seite zu

ermöglichen.

Die systemische Inflammation wurde durch intravenöse Applikation von 56mg/kg KG Ganzzellen-Präparation von *Corynebacterium parvum* (C.p.; Roche, Penzberg, Germany) in die V. dorsalis penis an Tag 0, 4 und 8 induziert. Im Gegensatz dazu erhielten die Tiere der Gruppe der Schein-Infektion eine intravenöse Injektion von 0,9%iger Natriumchloridlösung. Da bei korrekter Durchführung der Infektion eine höhere Mortalität der Tiere während des Versuchszeitraums zu erwarten war, wurden den Infektionsgruppen zusätzliche Tiere hinzugefügt.

Abbildung 1: Consort Diagramm



Zur Durchführung der Operationen sowie der Injektionen von C.p. bzw. Natriumchloridlösung an Tag 0, 4 und 8 wurde eine inhalative Anästhesie mittels Isofluran in einer Plexigaskammer eingelei-

tet. Um die Narkose während der Intervention aufrecht zu erhalten, behielt man den Kopf der spontan atmenden Ratte in der Kammer mit kontinuierlichem Fluss von Isofluran.

Um die Auswirkungen einer Behandlung mit GTS-21 zu untersuchen, wurden die vier Interventionsgruppen jeweils in zwei Therapiegruppen unterteilt:

- (a) Behandlung mittels Placebo (0,9%ige Natriumchloridlösung)
- (b) Behandlung mittels 10mg/kg KG GTS-21 i.p. zweimal täglich

Die Zubereitung von GTS-21 (William Kem, University of Florida, Gainesville, FL., chemische Reinheit 99%) mit 0,9%iger Natriumchloridlösung erfolgte auf Grund der hohen Lichtsensitivität des Pharmakons in einer Dunkelkammer, in der lediglich gelbes Licht verwendet wurde. Nach Anpassung des pH-Wertes auf 7,35 wurde das Präparat in Spritzen abgefüllt und in der Dunkelkammer gelagert. In einem lichtgeschützten Behälter wurde es dann in den Versuchsraum transportiert und lediglich unter Beleuchtung durch eine gelbe Lichtquelle injiziert.

3.2 Expressionsnachweis von nAChR α 7 mittels Westernblot

Im Anschluss an die Experimente zur Bestimmung der neuromuskulären Funktion (siehe Kapitel 3.4) wurden die Ratten unter tiefer Phenobarbitalnarkose (200mg/kg KG) mittels Exsanguination getötet. Daraufhin wurden die kranialen Anteile des M. tibialis anterior beider Seiten herauspräpariert, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um einen Proteinzerfall zu verhindern. Bis zur Durchführung der Westernblotanalysen wurden die Muskelpräparate luftdicht verschlossen bei -80°C gelagert.

Zur Aufbereitung der Muskelproteine wurde unter Beachtung der Kühlkette zunächst ein Aliquot des gefrorenen Muskels in jeweils 500 μl Homogenisierungspuffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gegeben und zur Vermeidung von Proteinkatabolismus zusätzlich mit Proteaseinhibitoren versehen (SIGMAFASTTM Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland). Mit Hilfe eines Tissue Lysers (TissueLyser LT, Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte im Anschluss bei 50 Oszillationen pro Sekunde für jeweils 12 Minuten eine mechanische Auflösung der Muskelproben. Nachdem das Lysat bei 4°C für 30 Minuten mit einer Frequenz von 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurde, konnte der Überstand der Proben abpipetiert werden. Mittels Bradford Assay wurde nun die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Dieses Verfahren basiert auf der Tatsache, dass ein Färbemittel nach Bindung an Proteine seine Absorptionseigenschaften ändert, weshalb durch die Messung der Extinktion des Protein-Farbstoff-Gemisches

die Konzentration der Proteinmenge im Gemisch bestimmt werden kann (Bradford, 1976). So wurden Aliquots der Proteinlysate sowie eine Standardreihe mit definierter Proteinkonzentration (Thermo Fisher Scientific Messtechnik GmbH, München, Deutschland) für 10 Minuten in den Färbemitteln für den Bradford Assay inkubiert ($25\mu\text{l}$ Bio-Rad DCTM Protein Assay Reagent A, $500\mu\text{l}$ Bio-Rad DCTM Protein Assay Reagent B). Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen (Tecan SunriseTM, Tecan Trading AG, Schweiz). Durch die Bestimmung und anschließende Anpassung der Proteinkonzentration der Proben auf $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konnte gewährleistet werden, dass die Westernblotanalyse mit äquivalenten Proteinmengen aller Proben durchgeführt wurde. Die Einstellung der Proben wurde mittels NuPAGE[®] LDS Sample Buffer und NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific Messtechnik GmbH, München, Deutschland) vorgenommen.

Für die Westernblotanalyse wurden die Proben aufgetaut und zur Denaturierung der Proteine für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Im Anschluss wurden jeweils $20\mu\text{l}$ der Proben in die Taschen der TGX Stain-FreeTM-Gele (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aufgetragen. Dies entspricht nach Angleichung der Proteinkonzentration der Proben im Anschluss an den Bradford Assay einer Proteinmenge von $40\mu\text{g}$ je Probe. Um zu einem späteren Zeitpunkt die Ergebnisse der einzelnen Westernblots verrechnen zu können, wurde in jedem Experiment zusätzlich eine Standardprobe aufgetragen. Als Standard wurde ein Lysat aus Rattenmuskel nach vierwöchiger Denervierung verwendet (Klinik für Anästhesiologie, Technische Universität München, Deutschland). Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Elektrophorese unter einer Spannung von zunächst 100V und anschließend 200V unter Verwendung eines Running Buffers, der sich aus 3g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), $14,4\text{g}$ Glycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und 1g SDS (Natriumdodecylsulfat; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) auf einen Liter destilliertes Wasser zusammensetzte. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im TGX Stain-FreeTM-Gel unter Verwendung des Bio-Rad Molecular Imager[®] ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aktiviert, um eine spätere Detektion der auf die Membran übertragenen Proteine zu ermöglichen. Der Proteintransfer vom Gel auf eine Immun-Blot[®] PVDF-Membran (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) erfolgte mithilfe des CriterionTM Blotters (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) unter einer Spannung von 80V für 60 Minuten. Der verwendete Transfer Buffer wurde aus 30g Tris und 69g Glycin auf einen Liter destilliertes Wasser hergestellt. Unter Verwendung der Stain Free Technologie wurde nun mittels Bio-Rad Molecular Imager[®] ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) die Gesamtmenge der auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine bestimmt. Dies ermöglichte zu einem späteren Zeitpunkt eine Normalisierung des spezifischen Ban-

densignals im Verhältnis zur gesamten übertragenen Proteinmenge der Probe. Um eine unspezifische Proteinbindung zu vermeiden, wurde die Membran für eine Stunde in Roti[®]-Block (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) inkubiert. Es folgten dreimalige Spülungen für jeweils fünf Minuten in Tris-gepufferter Natriumchloridlösung mit Tween20 (TBS/T), der 3g Tris, 11,1g NaCl und 1ml Tween20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) auf einen Liter destilliertes Wasser enthielt und mittels HCl-Lösung (Chlorwasserstoffsäure; Salzsäure) auf einen pH-Wert von 7,7 eingestellt wurde. Als primärer Antikörper diente Anti-nAChR α 7 (ab24644, Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1 : 2500 in TBS/T. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4°C. Nachdem die Membran dreimalig für jeweils fünf Minuten mit TBS/T gespült wurde, wurde sie für 60 Minuten in einem sekundären Antikörper (Horseradish Peroxidase–Conjugated Goat Anti-Rat Secondary Antibody, NA935V, GE Healthcare, Amersham, UK) in einer Verdünnung von 1 : 10.000 inkubiert. Um unspezifische Signale zu vermeiden, folgten weitere Spülungen in TBS/T, ehe die Membran mit ClarityTM Western ECL Substrat (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bedeckt wurde, um ein spezifisches Chemilumineszenzsignal am Ort der Antikörperbindung zu erzeugen. Die Intensität dieser spezifischen Proteinbanden wurde mittels Bio-Rad Molecular Imager[®] ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bestimmt.

3.3 Datengewinnung und statistische Analyse

Das Chemilumineszenzsignal der spezifischen Proteinbande für nAChR α 7 wurde mittels Bio-Rad Molecular Imager[®] ChemiDocTM XRS+ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemessen und mittels ImageLab (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) analysiert. Unter Verwendung der Stain-Free Technologie wurde das Signal der spezifischen Bande zunächst anhand der übertragenen Gesamtproteinmenge der Probe normalisiert (Guertler et al., 2013; Rivero-Gutierrez et al., 2014). Dadurch konnten Ungenauigkeiten beim Auftragen der Proteine oder asymmetrisches Transferverhalten der Proteine verrechnet werden. Wie bereits beschrieben, diente ein Lysat aus Rattenmuskel nach vierwöchiger Denervierung, das in jedem Westernblot aufgetragen wurde, als Standard. Dieser fungierte einerseits als Positivkontrolle, da eine Denervierung des Muskels eine verstärkte Expression von nAChR α 7 zu Folge hat (Fischer et al., 1999; Tsuneki et al., 2003), andererseits ermöglichte er eine Normalisierung der Rohdaten anhand des Verhältnisses der Standardproben zwischen den einzelnen Westernblots.

Alle Muskelproben wurden in jeweils vier verschiedenen Westernblots aufgetragen. Nach den beschriebenen Normalisierungsschritten wurde ein Mittelwert der vier normalisierten Ergebnisse jeder Probe

gebildet, der anschließend in die statistischen Berechnungen einging. Aufgrund der rechtsschief verteilten Werte des Datensatzes wurden die Mittelwerte in logarithmische Berechnungseinheiten überführt. Zunächst wurden für die unabhängigen Variablen Therapie (Placebobehandlung vs. GTS-21), Inflammation (Natriumchloridlösung vs. C.p.) und Mobilität (Schein-Immobilisation vs. Immobilisation) mehrfaktorielle univariate Varianzanalysen ohne Messwiederholung (ANOVAs) durchgeführt und auf mögliche Interaktionseffekte untersucht. Zeigte sich ein signifikanter Haupt- oder Interaktionseffekt, schlossen sich *post hoc* Analysen in hierarchischer Abfolge an, um die Effekte innerhalb der Subgruppen und die Richtung der Mittelwertsunterschiede zu bestimmen. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = .05$ festgelegt. Die statistischen Analysen wurden mithilfe von IBM SPSS Statistics 23.0 für Windows (SPSS, Chicago, IL) durchgeführt. Unter Verwendung von STATA 14 (Stata Corp LP, College Station, TX) und Adobe InDesign (Adobe Systems Software Ireland Ltd, Irland) wurden die Abbildungen erstellt.

3.4 Ergänzende Experimente

3.4.1 Bestimmung der Methämoglobinfraktion und des Körpergewichts

Neben der quantitativen Bestimmung der Expression des nAChR α 7 wurden am selben Versuchskollektiv weitere Experimente durchgeführt (Schaller et al., 2018). Diese stellen zwar keinen Teil dieser Arbeit dar, sollen jedoch im Folgenden ebenfalls aufgeführt werden, damit die Ergebnisse der Expressionsanalyse des nAChR α 7 im Kontext der gesamten Versuchsreihe diskutiert werden können.

Zunächst ist an dieser Stelle die Messung systemischer Parameter nach Ablauf der 12-tägigen Versuchsreihe zu nennen: Als Surrogatparameter für eine systemische Inflammationsreaktion wurde das Methämoglobinlevel im Blut gemessen. Da sich in Anwesenheit von induzierbarem Stickstoffmonoxid (NO) verstärkt Methämoglobin (MetHb) bildet, liegt bei einer systemischen Inflammationsreaktion ein erhöhtes MetHb-Level vor (Herencia et al., 2002). Zur Bestimmung des MetHb-Anteils am gesamten Hämoglobin wurde vor der Messung der neuromuskulären Funktion (siehe Kapitel 3.4.2) über eine Kanüle Blut aus der A. carotis communis abgenommen und die MetHb-Fraktion per Blutgasanalyse gemessen.

Des Weiteren wurden die Ratten an Tag 0 und an Tag 12 der Versuchsreihe gewogen, um eine Bilanzierung des Körpergewichts innerhalb des Interventionszeitraums zu ermöglichen (Schaller et al., 2018).

3.4.2 Messung der neuromuskulären Funktion

Wie in der Literatur beschrieben wurde die neuromuskuläre Funktion mittels evozierter Mechanomyographie bestimmt (Fink et al., 2008; Frick et al., 2010; Staeuble et al., 2016). Zunächst wurden die Tiere zur Durchführung der Experimente mittels intraperitonealer Applikation von Pentobarbital narkotisiert. Die Anästhesie wurde in Abhängigkeit von der Abwehrbewegung nach Zehenklemmung durch empirische Verabreichungen von $10 - 20\text{mg/kg}$ KG Pentobarbital alle 10-20 Minuten aufrecht erhalten. Nach Verlust des Bewusstseins wurden die Ratten tracheotomiert und mechanisch beatmet. Um einen venösen Zugang für Infusionen zu schaffen, wurde eine Kanüle in der V. jugularis platziert. Außerdem wurde ein arterieller Zugang in die A. carotis communis gelegt, um eine intraarterielle Druckmessung zu ermöglichen und Blutproben zur arteriellen Blutgasanalyse abnehmen zu können. Die Beatmung wurde vor Durchführung der neuromuskulären Funktionstests an die Ergebnisse der Blutgasanalyse angepasst. Dabei wurden ein arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck (PaCO_2) zwischen 35mmHg und 45mmHg , ein arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) von $> 90\text{mmHg}$ und ein pH-Wert zwischen 7,36 und 7,44 anvisiert. Sofern notwendig wurden Verschiebungen des angestrebten Basendefizits von -3mM bis $+3\text{mM}$ durch die Applikation von 1mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) ausgeglichen. Außerdem wurden der Blutzucker auf einen Wert zwischen 80mg/dl und 130mg/dl eingestellt und die rektale Temperatur zwischen $36,8^\circ\text{C}$ und $37,2^\circ\text{C}$ gehalten, wobei die Temperatur des Versuchstisches bei Bedarf angepasst sowie eine Wärmelampe zugeschaltet werden konnten. Durch Monitoring von Herzfrequenz und arteriellem Mitteldruck konnte während der Experimente eine stabile Hämodynamik garantiert werden (Schaller et al., 2018).

In Analogie zu bereits publizierten Arbeiten (Fink et al., 2008; Frick et al., 2010; Staeuble et al., 2016) wurde nun eine evozierte Mechanomyographie durchgeführt. Dabei wurde zunächst der N. sciaticus jeder Seite in Höhe des Oberschenkels freipräpariert, um eine indirekte Stimulation des Muskels über den Nerv zu ermöglichen. Das Sprunggelenk wurde anschließend in Supinationsstellung positioniert und die Sehnen des M. tibialis senkrecht mit den Messwandlern verbunden. Zur Kontrolle des Kraftvektors wurde das Kniegelenk mittels Kirschnerdrahtstiftung fixiert. Daraufhin konnten die Spannkraft einer einzelnen nervinduzierten Muskelzuckung (single twitch tension) und die maximale Spannkraft bei tetanischer Stimulation (peak tetanic tension) mit 50Hz aufgezeichnet werden (Schaller et al., 2018).

3.4.3 Immunhistochemie

Die Anteile des M. tibialis anterior, die nicht für die Westernblotanalyse verwendet wurden (siehe Kapitel 3.2), wurden direkt nach Entnahme in mittels Flüssigstickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren.

Nach Fixierung der Muskelproben unter Verwendung von Surgipath FSC 22 Clear (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden mithilfe eines Kryotoms (Kryostat HM 560-V, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) Gefrierschnitte in einer Dicke von $10\mu\text{m}$ angefertigt, auf Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) übertragen und bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

Vor der spezifischen Färbung wurden die Gefrierschnitte für fünf Minuten in einem 1 : 1-Gemisch aus Aceton und Isopropanol bei -20°C fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung für 60 Minuten in bovinem Serumalbumin in einer 10%igen Verdünnung in Phosphat-gepufferter Natriumchloridlösung mit Tween20 (PBS/T) mit einem pH-Wert von 7,4 inkubiert. Danach erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit den primären Antikörpern in einer Verdünnung von 1 : 1000 in PBS/T. Zur Detektion der spezifischen Zielproteine wurden ein primärer Antikörper gegen langsame schwere Ketten von Myosin (M8421, Sigma, Deutschland) und ein primärer Antikörper gegen schnelle schwere Ketten von Myosin (M4276, Sigma, Deutschland) eingesetzt. Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper (Goat-Anti-Mouse Antibody, 1070-05, SouthernBiotech, Birmingham, USA) in einer Verdünnung von 1 : 5000 in PBS/T inkubiert. Im Anschluss erfolgte unter Verwendung des DAKO Liquid DAB+ Substrate Chromogen Systems (K3467, DAKO, Glostrup, Dänemark) eine Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) für fünf Minuten, ehe für zwei Minuten eine Gegenfärbung mit Mayer's Haematoxylin (Roth, Germany) und 1% Eosin (Morphisto, Germany) initiiert wurde. Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte in destilliertem Wasser gespült, in Ethanollösungen in ansteigender Konzentration (70% und 96%) für jeweils fünf Minuten dehydriert, in Xylol getaucht und mit Dako Mounting Medium (Dako, CA, USA) überzogen (Schaller et al., 2018).

Zwei Mitarbeiter werteten die histologischen Präparate unabhängig voneinander verblindet und in zufälliger Reihenfolge aus. Die histologischen Bilder wurden unter Verwendung des Axio Imager Mikroskops (Zeiss, Deutschland) angefertigt und mittels AxioVision SE64 Rel. 4.9 Software Tool (Zeiss, Deutschland) geeicht. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Querschnittsfläche einer Muskelfaser in μm^2 wurden 20 Muskelfasern in drei unterschiedlichen Schnitten sowohl in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) als auch in der spezifischen Antikörperfärbung der schweren Myosinketten (langsam/schnell) analysiert. Dabei wurden die Querschnittsflächen der Muskelfasern unter Verwendung von AxioVision Measurement Tool (Zeiss, Deutschland) manuell bestimmt und mittels Excel 2016 (Microsoft, USA) ein Durchschnittswert errechnet (Schaller et al., 2018).

4 Ergebnisse

4.1 Tiermodell und Studiendesign

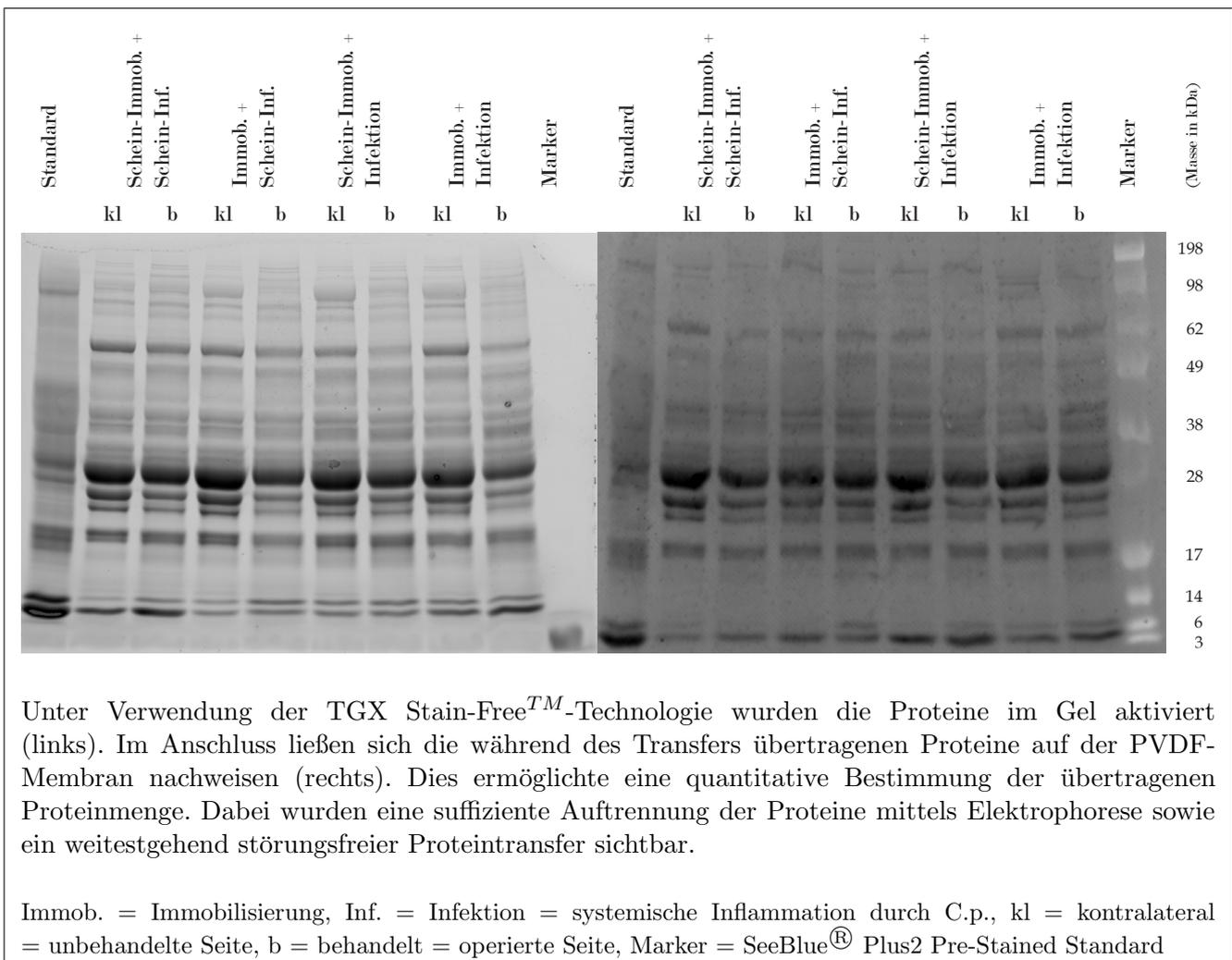
In die tierexperimentelle Studie wurden insgesamt 125 Ratten aufgenommen. Wegen der zu erwartenden erhöhten Mortalität in der Infektionsgruppe wurde die intravenöse Gabe von C.p. bei 73 Ratten durchgeführt, während 52 Tiere eine Scheinbehandlung mit Salzlösung erhielten. Während des 12-tägigen Interventionszeitraums verstarben 17 Tiere infolge der Infektion, sodass die Anzahl der Tiere pro Interventionsgruppe, die in die neuromuskulären Funktionsuntersuchungen ($n_{1-8} = 13$) und in die ex vivo Analysen ($9 \leq n_{1-8} \leq 13$) einbezogen wurden, annähernd ausgeglichen war. Für die Westernblotanalyse konnten Muskelproben von lediglich 92 Versuchstieren verwendet werden, da weitere Versuchstiere wegen intraoperativen Todes vor oder während der neuromuskulären Testung ($n = 5$), verfahrenstechnischer Probleme ($n = 4$) oder sonstiger Ursachen ($n = 7$) ausgeschlossen wurden (siehe Abbildung 1).

4.2 Expression von nAChR α 7

Während der Proteinaktivierung in den TGX Stain-FreeTM-Gelen zeigte sich durchwegs eine erfolgreiche Auftrennung der Proteine mittels Elektrophorese. Die Detektion der auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine ermöglichte im Anschluss eine Überprüfung des Proteintransfers und eine Normalisierung der Rohdaten. Ein erfolgreicher Proteintransfer auf die Membran ohne nennenswerte Artefakte war dabei Voraussetzung für die Bestimmung der Rezeptorexpression, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch methodische Unzulänglichkeiten zu verhindern. Die beschriebenen Zwischenergebnisse zur methodischen Kontrolle der Westernblots sind in Abbildung 2 beispielhaft dargestellt.

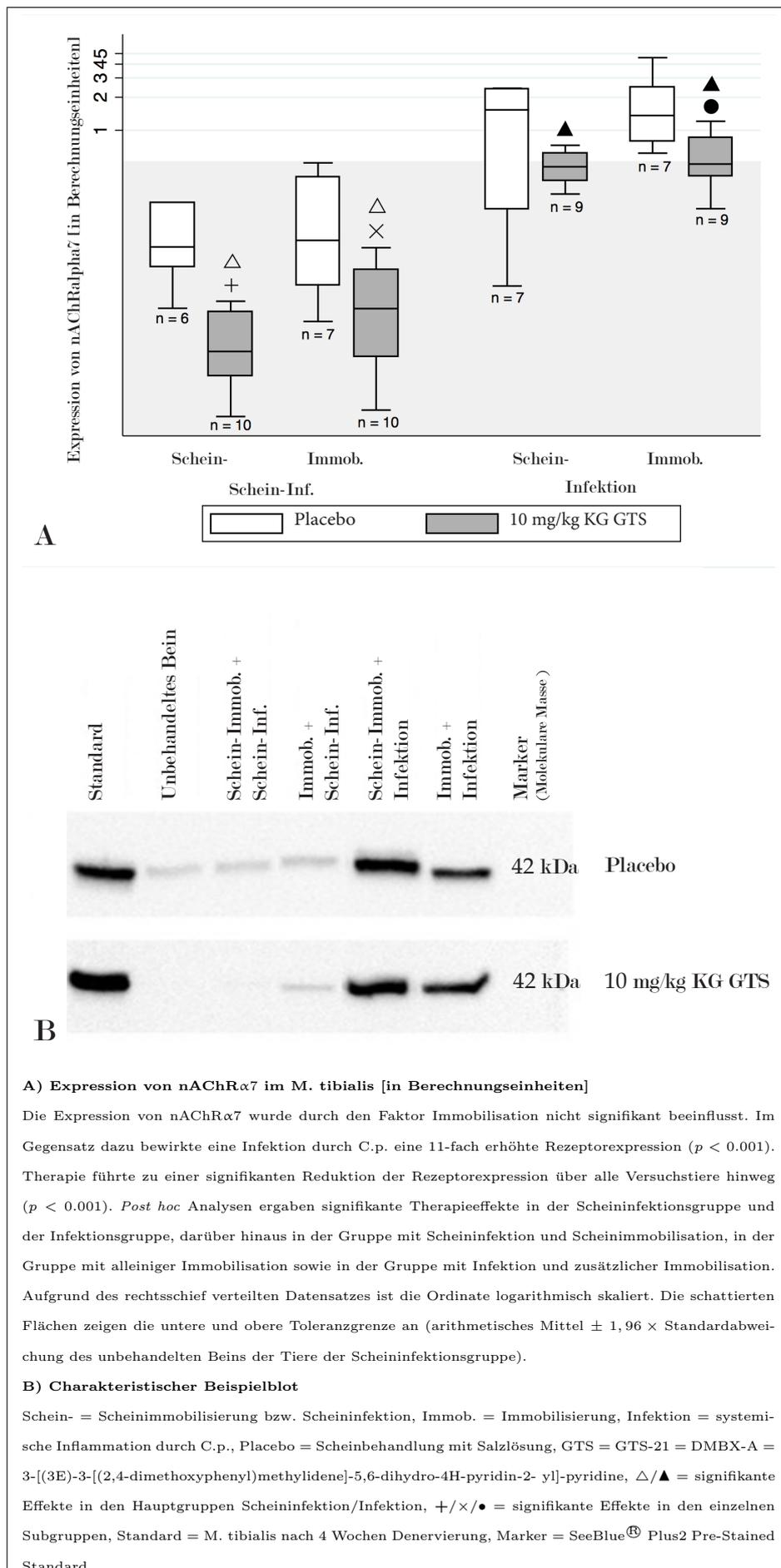
Die Expression von nAChR α 7 jeder Muskelprobe wurde in vier verschiedenen Westernblots bestimmt. Aus den im Bezug auf den Proteintransfer und die Standardproben normalisierten Ergebnissen wurde im Anschluss ein Mittelwert jeder Muskelprobe gebildet, der in die statistischen Berechnungen einging. In der statistischen Analyse zeigte sich, dass die Expression von nAChR α 7 in den Muskeln der Scheinin-

Abbildung 2: Proteinaktivierung im TGX Stain-FreeTM-Gel sowie Kontrolle des Proteintransfers



fektionsgruppe unabhängig vom Faktor Immobilisation gering war (0.19 ± 0.19 Berechnungseinheiten). Im Gegensatz dazu kam es bei Tieren der Infektionsgruppe zu einer um das 11-fache erhöhten Expression von nAChR $\alpha 7$ ($p < 0.001$). Eine alleinige Immobilisation führte nicht zu einer signifikant erhöhten Expression des Rezeptors. Eine zwei Mal täglich verabreichte Behandlung mit 10 mg/kg KG GTS-21 reduzierte die Expression des Rezeptors über alle Versuchstiere hinweg ($p < 0.001$). *Post hoc* Analysen wiesen dabei sowohl in den Scheininfectionsgruppen (0.2 ± 0.2 Berechnungseinheiten in den Tieren mit Placebobehandlung gegenüber 0.02 ± 0.02 Berechnungseinheiten in Tieren mit GTS-21-Behandlung, $p < 0.001$) als auch in den Infektionsgruppen (1.6 ± 1.2 Berechnungseinheiten gegenüber 0.6 ± 0.3 Berechnungseinheiten, $p = 0.028$) einen signifikanten Therapieeffekt nach. In Bezug auf einzelne Interventionsgruppen zeigte sich infolge der Therapie eine signifikante Reduktion der nAChR $\alpha 7$ -Expression in den Subgruppen Scheininfection ohne Immobilisation ($p < 0.001$), Scheininfection mit Immobilisation ($p = 0.008$) sowie Infektion mit zusätzlicher Immobilisation ($p < 0.007$). Abbildung 3 stellt die Expression von nAChR $\alpha 7$ in den einzelnen Interventionsgruppen dar.

Abbildung 3: Bestimmung der Expression von nAChR α 7 mittels Westernblot

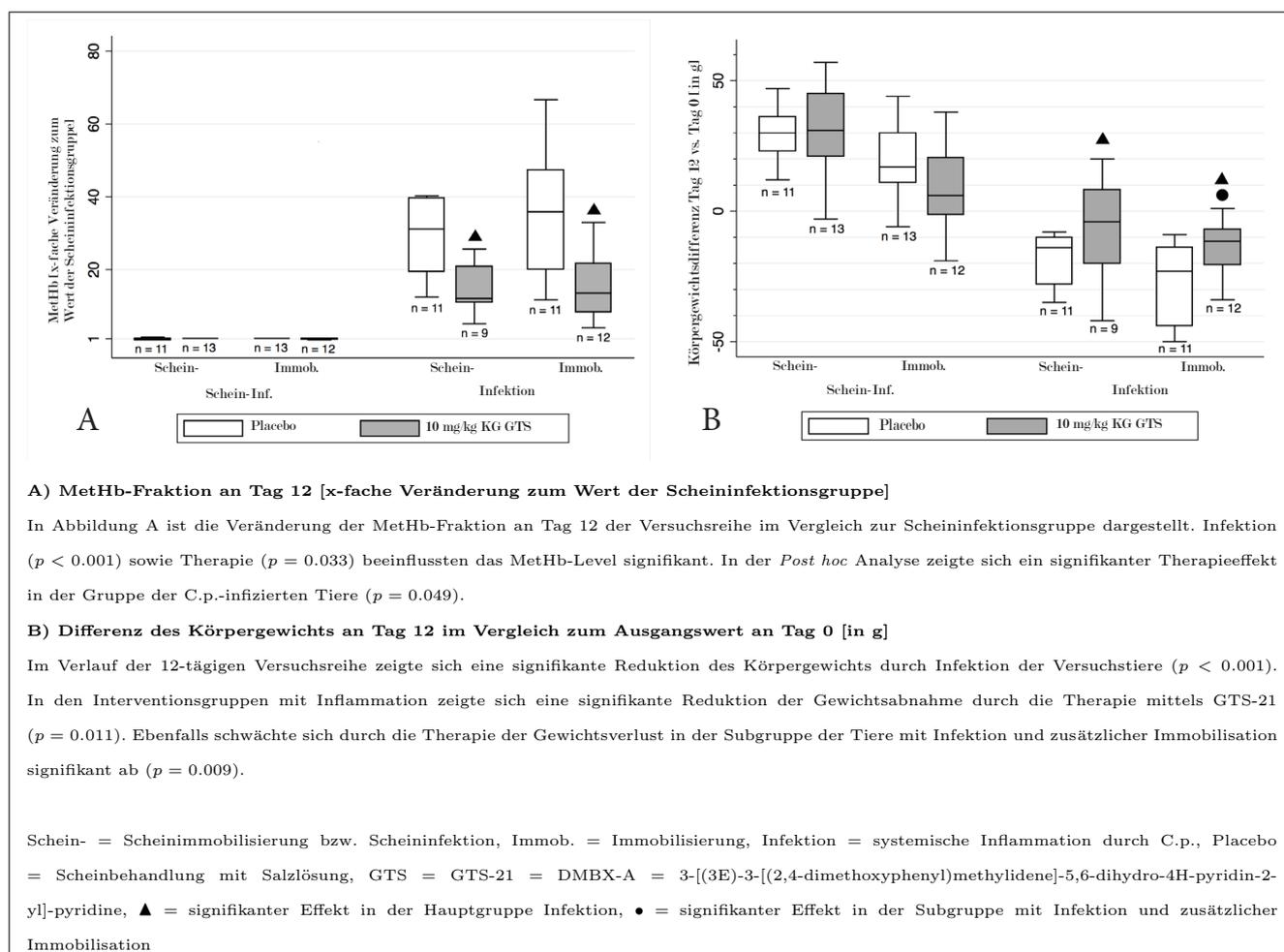


4.3 Auswertung der begleitenden Experimente

4.3.1 Methämoglobinspiegel an Tag 12 der Versuchsreihe

In den Scheininfectionsgruppen waren die Anteile des MetHb am gesamten Hämoglobin sehr gering ($0.3 \pm 0.1\%$). Die MetHb-Fraktion war in dieser Gruppe unabhängig vom Parameter Immobilisation. In den Infektionsgruppen erhöhte sich die MetHb-Fraktion durchschnittlich um das 26-fache ($p < 0.001$), in der Gruppe placebobehandelter Tiere sogar um das 32-fache.

Abbildung 4: MetHb-Fraktion an Tag 12 der Versuchsreihe und Körpergewichtsdifferenz



Die Therapie mittels GTS-21 führte zu einer signifikant reduzierten MetHb-Fraktion ($p = 0.033$). In den Infektionsgruppen schwächte die zweimal tägliche Gabe von 10mg/kg KG GTS-21 den Anstieg der MetHb-Fraktion um 40% ab (vom 32-fachen des Vergleichswerts in der placebobehandelten Gruppe zum 19-fachen in der GTS-21-behandelten Gruppe, $p = 0.049$). Darüber hinaus ist festzuhalten, dass Immobilisation keine Auswirkung auf die MetHb-Fraktion hatte (Schaller et al., 2018).

4.3.2 Veränderungen des Körpergewichts

Tiere der Kontrollgruppe (Scheininjektion, Scheinimmobilisation) nahmen während der 12-tägigen Versuchsreihe signifikant an Gewicht zu. Dabei kam es im Vergleich zu Tag 0 der Versuchsreihe in der Subgruppe mit Placebobehandlung zu einem Anstieg um $30 \pm 9g$ bzw. in der Gruppe mit zusätzlicher GTS-21-Gabe zu einem Anstieg um $31 \pm 18g$. Im Gegensatz dazu verringerte sich das Körpergewicht durch systemische Inflammation mittels intravenöser Verabreichung von C.p. durchschnittlich um $16 \pm 20g$ im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0.001$). Durch die *Post hoc* Analyse konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Infektionsgruppen der Gewichtsverlust durch die Therapie mit $10mg/kg$ KG GTS-21 zweimal täglich signifikant reduziert werden konnte ($-23 \pm 17g$ in der Gruppe mit Placebobehandlung gegenüber $-9 \pm 20g$ in der Gruppe mit GTS-21-Behandlung, $p = 0.011$). Es zeigte sich zudem ein signifikanter Effekt der Immobilisation auf die Körpergewichtsentwicklung ($p < 0.001$). Die *Post hoc* Analyse ergab einen signifikanten Therapieeffekt in der Subgruppe der Tiere mit Infektion und zusätzlicher Immobilisation durch die Verabreichung von $10mg/kg$ KG GTS-21 zweimal täglich ($-29 \pm 16g$ in der Gruppe mit Placebobehandlung gegenüber $-14 \pm 10g$ in der Gruppe mit Behandlung, $p = 0.009$). Abbildung 4B zeigt eine übersichtliche Darstellung der Körpergewichtsdifferenz zwischen Tag 12 und Tag 0 der Versuchsreihe (Schaller et al., 2018).

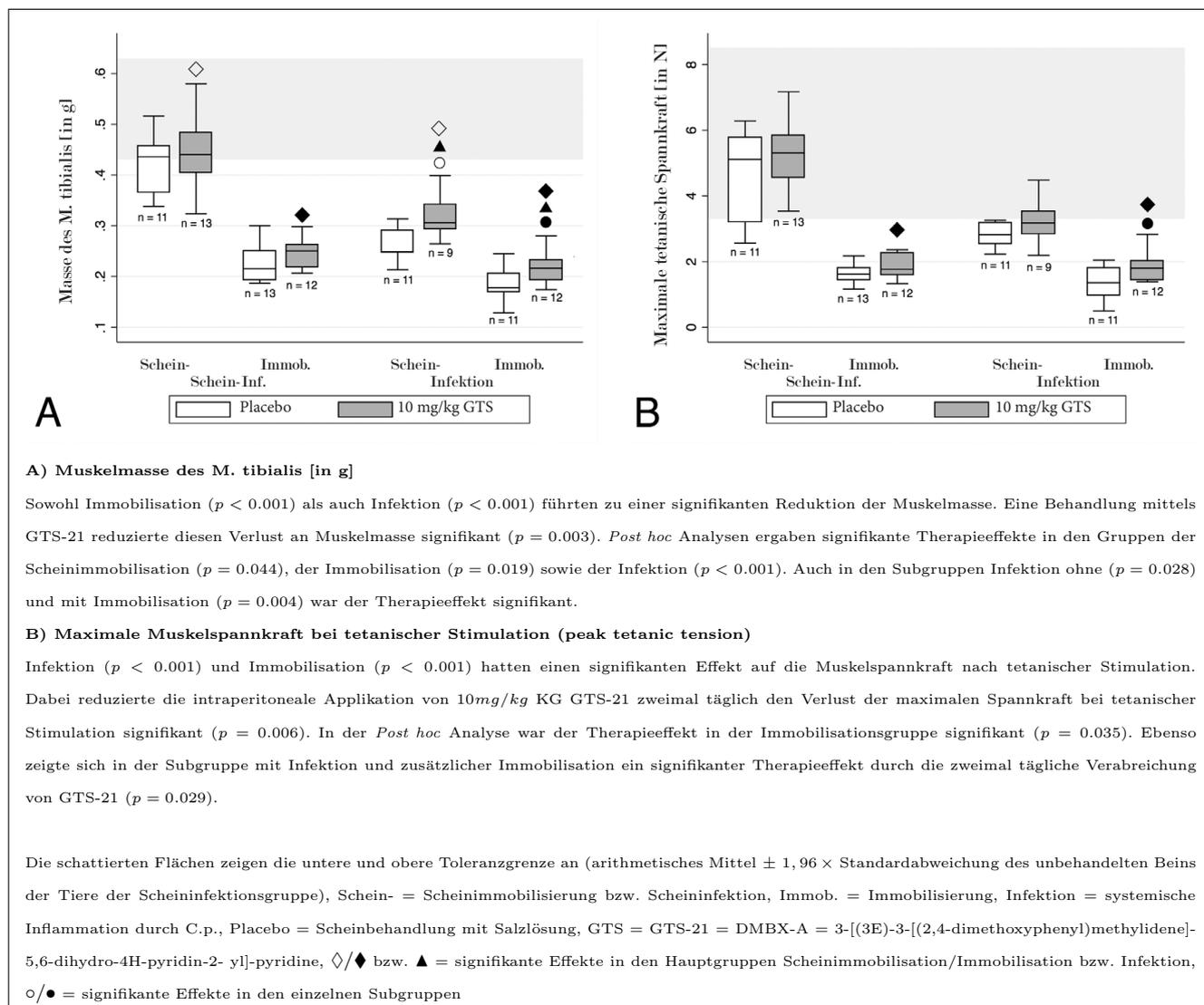
4.3.3 Veränderung der Muskelmasse und Ergebnisse der Mechanomyographie

Sowohl Inflammation ($p < 0.001$) als auch Immobilisation ($p < 0.001$) führten zu einer signifikanten Reduktion der Masse des M. tibialis. Die Kombination beider Parameter bewirkte einen noch deutlicheren Verlust an Muskelmasse ($p < 0.001$). Über alle Tiere hinweg führte eine Therapie mit GTS-21 zu einer Abschwächung des Muskelverlusts ($p = 0.003$). *Post hoc* Analysen ergaben einen Therapieeffekt in der Gruppe der Tiere mit Scheinimmobilisation ($p = 0.044$) sowie mit Immobilisation ($p = 0.019$). Ebenso zeigte sich ein signifikanter Therapieeffekt in den Infektionsgruppen ($p < 0.001$). Dabei kam es durch die zweimal tägliche Verabreichung von GTS-21 in beiden Untergruppen zu einer signifikanten Veränderung der Muskelmasse: In der Subgruppe mit Infektion und Scheinimmobilisation war die Muskelmasse mit $0.32 \pm 0.04g$ im Vergleich zu $0.26 \pm 0.03g$ bei den Tieren ohne Therapie signifikant erhöht ($p = 0.028$). Analog dazu zeigte sich in der Subgruppe mit Infektion und zusätzlicher Immobilisation durch die Therapie eine Erhöhung der Muskelmasse von $0.18 \pm 0.04g$ auf $0.22 \pm 0.03g$ ($p = 0.004$).

Zwar ergab die Auswertung der Spannkraft der einzelnen nervinduzierten Muskelzuckungen (single twitch tension) für alle drei unabhängigen Variablen (Immobilisation, Infektion, Therapie) signifikante Effekte, doch zeigte die *Post hoc* Analyse keinen signifikanten Therapieeffekt. Deshalb wird an

dieser Stelle auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Anders verhält sich die Auswertung der maximalen Spannkraft bei tetanischer Stimulation (maximum tetanic tension), die in Abbildung 5B dargestellt ist. Hier zeigten sich eine signifikante Reduktion der maximalen Spannkraft durch Inflammation ($p < 0.001$), Immobilisation ($p < 0.001$) und ein verstärkter Effekt durch die Kombination beider Interventionen ($p < 0.001$). Insgesamt ließ sich ein signifikanter Therapieeffekt nachweisen ($p = 0.035$), in der *Post hoc* Analyse war dieser Effekt für die Gruppe der immobilisierten Tiere signifikant ($p = 0.006$). Die zweimal täglich mit GTS-21 behandelten Tiere der Subgruppe mit Inflammation und Immobilisation verzeichneten im Vergleich zur Placebogruppe eine signifikant geringere Abnahme der maximalen tetanischen Muskelspannkraft ($1.81 \pm 0.42N$ mit Therapie im Vergleich zu $1.35 \pm 0.51N$, $p = 0.029$) (Schaller et al., 2018).

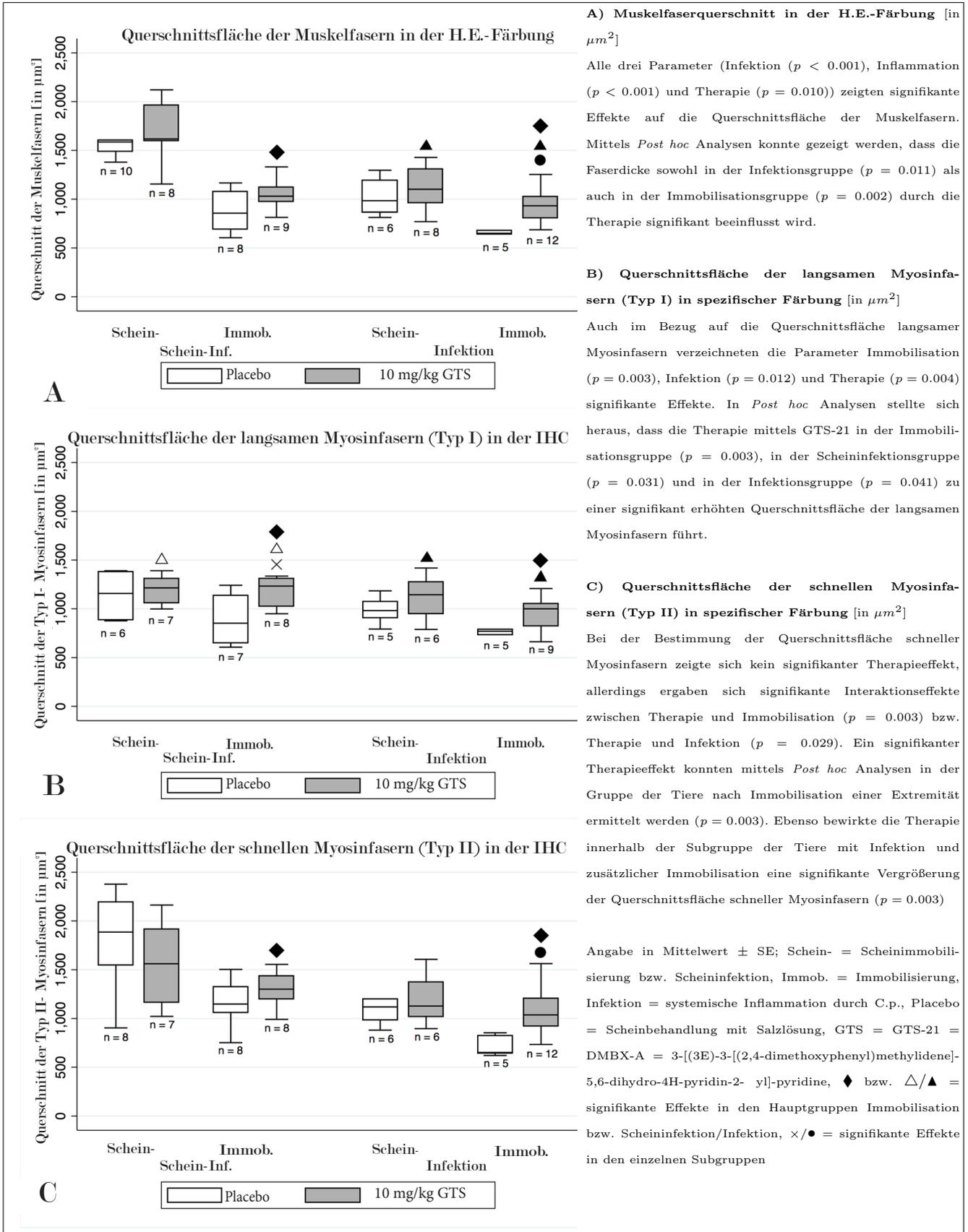
Abbildung 5: Masse des M. tibialis und maximale Muskelspannkraft bei tetanischer Stimulation



4.3.4 Bestimmung des Muskelfaserquerschnitts mittels Immunhistochemie

Bei der Bestimmung der Muskelfaserquerschnittsfläche mittels H.E.-Färbung zeigten sich eine signifikante Reduktion der Faserdicke durch Immobilisation ($p < 0.001$) und Infektion ($p < 0.001$) sowie ein deutlich verstärkter Effekt durch die Kombination beider Interventionen ($p = 0.001$). Über alle Gruppen hinweg schwächte die zweimal tägliche Therapie mittels GTS-21 die Abnahme der Querschnittsfläche signifikant ab ($p = 0.010$). Dieser Effekt war in der *Post hoc* Analyse sowohl innerhalb der Infektionsgruppe als auch innerhalb der Immobilisationsgruppe signifikant. Während die Querschnittsfläche der Muskelfasern bei C.p.-infizierten Tieren mit Placebothherapie $826 \pm 61\mu\text{m}^2$ betrug, erhöhte sich der Wert durch die Therapie auf $1036 \pm 46\mu\text{m}^2$ ($p = 0.011$). Ebenso führte die Therapie bei Tieren mit Immobilisation einer Extremität zu einer Zunahme der Querschnittsfläche im Vergleich zu Tieren der Placebogruppe ($991 \pm 205\mu\text{m}^2$ vs. $781 \pm 220\mu\text{m}^2$, $p = 0.002$). In der Gruppe mit Infektion und zusätzlicher Immobilisation führte die Therapie mit GTS-21 ebenfalls zu einem signifikanten Effekt ($955 \pm 56\mu\text{m}^2$ in der Therapiegruppe im Vergleich zu $630 \pm 87\mu\text{m}^2$ in der Placebogruppe, $p = 0.007$). Ähnliche Ergebnisse lieferte auch die spezifische Färbung der langsamen Myosinfasern. Die Auswirkungen von Inflammation ($p = 0.012$), Immobilisation ($p = 0.003$) und Therapie ($p = 0.004$) auf deren Querschnittsfläche waren jeweils signifikant. In der *Post hoc* Analyse zeigte sich ein Therapieeffekt durch GTS-21 sowohl in den Scheininfektionsgruppen ($1184 \pm 50\mu\text{m}^2$ bei behandelten Tieren gegenüber $1013 \pm 61\mu\text{m}^2$ in der Placebogruppe, $p = 0.031$) als auch in den Infektionsgruppen ($1037 \pm 46\mu\text{m}^2$ bei behandelten Tieren gegenüber $879 \pm 56\mu\text{m}^2$ bei placebobehandelten Tieren, $p = 0.041$). Darüber hinaus erhöhte die Therapie mit GTS-21 die Querschnittsfläche der langsamen Myosinfasern in der Gruppe mit alleiniger Immobilisation von $879 \pm 75\mu\text{m}^2$ auf $1176 \pm 70\mu\text{m}^2$ signifikant ($p = 0.013$). Sowohl Inflammation ($p < 0.001$) als auch Immobilisation ($p < 0.001$) reduzierten die Querschnittsfläche der schnellen Myosinfasern (Typ II) signifikant. Zwar zeigte sich bei der Faserdicke der schnellen Myosinfasern in Bezug auf alle Gruppen kein signifikanter Therapieeffekt, allerdings ergaben sich signifikante Interaktionseffekte zwischen Immobilisation und Therapie ($p = 0.003$) sowie zwischen Inflammation und Therapie ($p = 0.029$). In der *Post hoc* Analyse konnte in der Infektionsgruppe ein signifikanter Therapieeffekt nachgewiesen werden ($1159 \pm 235\mu\text{m}^2$ bei behandelten Tieren vs. $993 \pm 294\mu\text{m}^2$ in Tieren mit Placebobehandlung, $p = 0.003$). Dies gilt auch für die Subgruppe der Tiere mit Infektion und zusätzlicher Immobilisation: So betrug die Querschnittsfläche der schnellen Myosinfasern in dieser Gruppe mit Placebobehandlung $718 \pm 89\mu\text{m}^2$ und mit Therapie $1064 \pm 58\mu\text{m}^2$ ($p = 0.005$). Eine übersichtliche Darstellung der Querschnittsfläche der Muskelfasern in der H.E.-Färbung sowie in den spezifischen Färbungen der langsamen bzw. schnellen Myosinfasern ist in Abbildung 6 zu finden (Schaller et al., 2018).

Abbildung 6: Immunhistochemische Bestimmung der Muskelfaserdicke



5 Diskussion

In Bezug auf die eingangs formulierten Hypothesen ergeben sich folgende Kernergebnisse:

1. Die Immobilisation einer Extremität der Versuchstiere führt nicht zu einem signifikanten Anstieg der Expression der nAChR α 7. Die im Vorfeld aufgestellte Hypothese kann daher nicht verifiziert werden.
2. Eine durch intravenöse Verabreichung von C.p. ausgelöste systemische Inflammationsreaktion zieht eine signifikant erhöhte Expression von nAChR α 7 am Skelettmuskel nach sich. Bei den Tieren der Infektionsgruppe zeigte sich eine im Vergleich zu den Tieren der Scheininfektionsgruppe um das 11-fache erhöhte Rezeptorexpression. Entsprechend kann die Hypothese auf einem Signifikanzniveau von $\alpha < .05$ bestätigt werden.
3. Die systemische Gabe des spezifischen Agonisten GTS-21 führt über alle Interventionsgruppen hinweg zu einer signifikant verminderten Rezeptorexpression. Folglich kann auch diese Hypothese bestätigt werden. In *Post hoc* Analysen konnte gezeigt werden, dass der Therapieeffekt sowohl in den Gruppen mit Scheininfektion als auch in den Gruppen mit systemischer Infektion signifikant war.

Das Expressionsverhalten von nAChR α 7 am Skelettmuskel in Abhängigkeit von verschiedenen Interventionen, die mit der Entwicklung neuromuskulärer Defizite im Sinne einer CIPNM einhergehen, wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Die dabei publizierten Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Studien zum Expressionsverhalten von nAChR α 7 am Skelettmuskel

Autoren	Jahr	Spezies	Intervention	Methode	Zeitpunkt	Ergebnis	Sonstiges
Fischer et al.	1999	Ratte: Ex vivo Muskelbiopsien sowie muskuläre Zelllinien in vitro	Denervierung	In situ Hybridisierung; Immunfluoreszenz; Elektrophysiologie	1-6 Wochen nach Denervierung	Expression von nAChR α 7 im Skelettmuskel ab Tag 13 der Fetalperiode bis zum 7. Tag postnatal sowie ab der zweiten Woche nach Denervierung	Ab der zweiten Woche nach Denervierung zeigte sich ein elektrophysiologisches Ansprechen des Muskels auf Cholin, möglicherweise vermittelt über nAChR α 7
Tsuneki et al.	2003	Maus: Wildtyp sowie Mutante ohne α 7	Denervierung	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR); Elektrophysiologie	2 bzw. 4 Wochen nach Denervierung	Nachweis von nAChR α 7 in 29% der innervierten Muskeln; keine veränderte Expression zwei Wochen nach Denervierung; vier Wochen nach Denervierung Expression in 78% der denervierten Muskeln	In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigte sich ein geringes Ansprechen auf Cholin; nach Blockade der muskulären Rezeptoren war eine Depolarisation der Zelle bei Wildtyp-Mäusen möglich, nicht aber bei Mäusen ohne nAChR α 7
Lee et al.	2014	Maus	Immobilisation für 14 Tage mittels Pinning	Mechanomyographie; Westernblot	2 Wochen nach Beginn der Immobilisation	Per Westernblot Nachweis einer signifikant erhöhten Expression von nAChR α 7 auf der immobilisierten Seite im Vergleich zur Gegenseite bei geringer Fallzahl (n=3)	Durch selektive Blockade der neuromuskulären Übertragung mittels rezeptorspezifischen Antagonisten wurde eine neuromuskuläre Übertragung via nAChR α 7 nachgewiesen
Khan et al.	2014	Maus	Immobilisation mittels nicht-operativer, extraartikulärer Fixierung	Mechanomyographie; Westernblot; Immunhistochemie	21 Tage nach Beginn der Immobilisation	Durch densitometrische Auswertung der Westernblots Nachweis eines dreifachen Anstiegs der Expression von nAChR α 7 des M. soleus auf der immobilisierten Seite im Vergleich zur Gegenseite bei geringer Fallzahl (n=3)	Es konnte zudem eine vermehrte Expression der α 1-Untereinheit des nAChR nachgewiesen werden

Tabelle 1: Studien zum Expressionsverhalten von nAChR α 7 am Skelettmuskel (Fortsetzung)

Autoren	Jahr	Spezies	Intervention	Methode	Zeitpunkt	Ergebnis	Sonstiges
Liu et al.	2014	Ratte	Sepsis mittels CLP	Westernblot; RT-PCR; Immunhistochemie; EMG	Tag 1, 3, 7 und 14 nach CLP	Nachweis einer im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrten Expression des nAChR α 7 sowie des fetalen nAChR in septischen Zuständen mittels Immunhistochemie und Westernblot sowie Analyse der mRNA per Real Time PCR; maximale Expression an Tag 7 nach CLP	Die vermehrte Expression des fetalen nAChR und des nAChR α 7 ging mit einer verminderten Wirkung von Vecuronium einher; die Verabreichung von Ulinastatin reduzierte die Expression der beiden Rezeptoren und bewirkte möglicherweise durch diesen Effekt ein verbessertes Ansprechen auf Vecuronium
Xie et al.	2016	Ratte: Biopsien von Diaphragma und M. tibialis anterior	Sepsis mittels CLP bzw. Scheinoperation	Mechanomyographie; Westernblot; Immunhistochemie	24 Stunden nach Intervention	Detektion von nAChR α 7 in Muskeln der Placebogruppe in fortgeschrittenem Alter; signifikante Hochregulierung von nAChR α 7 nach Induktion von Sepsis	Neben Veränderungen der Rezeptorexpression zeigte sich in fortgeschrittenem Alter und bei Sepsis auch eine verminderte Expression von Neuroregulin 1

Es gilt als unstrittig, dass eine Denervierung des Muskels zu einer erhöhten Expression von nAChR α 7 führt (Fischer et al., 1999; Tsuneki et al., 2003). Die Unterbrechung der motorischen Innervation des Muskels bewirkt dabei eine maximale Immobilisation. Da zwischen Immobilisation durch Gelenkfixierung mittels Pinning und spezifischer Rezeptorexpression keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden konnte, mögen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit überraschen. Für diese kontroversen Ergebnisse können mehrere Erklärungsansätze angeführt werden. Eine Denervierung führt nicht nur zu einer maximalen Immobilisation, sondern blockiert auch die präsynaptische Erregungsleitung. Im vorliegenden Experiment hingegen blieb die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt durch die rein mechanische Unterbindung motorischer Aktivität erhalten. Zusätzlich verhindert eine Denervierung - anders als die hier verwendete Methode - die über die motorische Endplatte hinausgehende Interaktion zwischen Nerv und Muskel. Beispielsweise können vom Nerven ausgeschüttete trophische Einflussfaktoren nach Denervierung ihre Wirkung auf den Muskel nicht entfalten (Friedrich et al., 2015; McArdle, 1983). Der klinischen Praxis auf Intensivstation kommt die mechanische Immobilisation der vorliegenden Arbeit deutlich näher als eine Denervierung. Zwei weitere Studien, die mittels Pinning bzw. mittels extraartikulärer Fixierung eine rein mechanische Immobilisation unter Erhalt der neuromuskulären Übertragung erzielten, zeigten im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit einen per Westernblot detektierten signifikanten Anstieg der nAChR α 7-Expression am Skelettmuskel (Khan et al., 2014; Lee et al., 2014). Kritisch ist an dieser Stelle allerdings die geringe Fallzahl (n=3) beider Arbeiten anzumerken. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auch auf methodische Unterschiede zurückzuführen sein, da die Effekte in beiden Studien nicht an Ratten sondern am Mausmodell nachgewiesen wurden.

Der unterschiedliche Zeitpunkt der Detektion von nAChR α 7 könnte ebenfalls eine Ursache für die kontroversen Ergebnisse darstellen. Fischer et al. (1999) wiesen erst in der zweiten Woche nach Denervierung eine Expression von nAChR α 7 nach. Mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Intervention beobachteten die Autoren einen über sechs Wochen anhaltenden kontinuierlichen Anstieg der Rezeptorexpression. Analog dazu war der Anstieg der spezifischen Rezeptorexpression in der Studie von Tsuneki et al. (2003) nach zwei Wochen noch nicht nachweisbar, während sich zu einem späteren Zeitpunkt eine deutlich gesteigerte Expression zeigte. In der Studie von Khan et al. (2014) wurden die Tiere vor Entnahme der Muskeln zum Nachweis der Rezeptorexpression mittels Westernblot und Immunhistochemie drei Wochen immobilisiert, während die Muskelpräparate in der vorliegenden Studie bereits 12 Tage nach Beginn der Interventionen reseziert wurden. In Anbetracht der zitierten Arbeiten ist es denkbar, dass ein signifikanter Anstieg der nAChR α 7-Expression erst nach längerer Immobilisation nachweisbar ist. Die Tatsache, dass nach Induktion einer Sepsis bereits nach 24 Stun-

den eine signifikant erhöhte Rezeptorexpression im Skelettmuskel nachweisbar ist, beweist allerdings, dass zumindest die Synthese und der Einbau der nAChR α 7 in die postsynaptische Membran deutlich schneller ablaufen können (Liu et al., 2014; Xie et al., 2016).

Auch wenn sich die in Tabelle 1 aufgeführten Arbeiten methodisch stark voneinander unterscheiden, verfolgen sie das selbe Ziel, nämlich die Entwicklung neuromuskulärer Defizite im Sinne einer CIPNM durch kontrollierte Induktion von Immobilisation bzw. Sepsis im Tiermodell zu begünstigen und das Expressionsverhalten des nAChR α 7 in der Pathogenese zu untersuchen. Dabei kam es infolge der Interventionen in allen Arbeiten zu einer erhöhten Expression von nAChR α 7. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die eine signifikant erhöhte Rezeptorexpression nach 12-tägiger kontinuierlicher Infektion, nicht aber infolge alleiniger Immobilisation zeigte, könnte man annehmen, dass lediglich die systemische Inflammation, nicht aber die alleinige Immobilisation zu pathologischen neuromuskulären Veränderungen geführt hat. Dies wird durch die Ergebnisse der Mechanomyographie allerdings eindeutig widerlegt, was die Bedeutung des Vergleichs der Rezeptorexpressionsanalyse mit den begleitenden funktionellen Ergebnissen hervorhebt: Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1% konnte gezeigt werden, dass neben der systemischen Inflammation auch die alleinige Immobilisation zu einer signifikanten Reduktion der maximalen Spannkraft nach tetanischer Stimulation des Muskels führt (Schaller et al., 2018). Die Immobilisation einer Extremität bewirkte also durchaus eine signifikant reduzierte klinische Funktion, nicht aber eine signifikante Erhöhung der Expression von nAChR α 7.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wirken bei der Entwicklung einer ICUAW zahlreiche unabhängige und miteinander interagierende pathogenetische Mechanismen zusammen, die sowohl den Nerven als auch den Muskel sowie die neuromuskuläre Synapse betreffen. Um einer Differenzierung pathogenetischer Abläufe näher zu kommen, sollen nachfolgend die Begriffe CIP, CIM oder CIPNM verwendet werden. Die in den begleitenden Experimenten infolge von Immobilisation nachgewiesene reduzierte Muskelspannkraft nach tetanischer Stimulation kann zum Teil durch Muskelatrophie erklärt werden. Passend dazu zeigten sich nach Immobilisation einer Extremität über 12 Tage eine signifikant reduzierte Muskelmasse des M. tibialis, eine signifikant reduzierte Querschnittsfläche der Muskelfasern sowie eine signifikant reduzierte Dicke der Myosin Typ I- und Typ II- Fasern (Schaller et al., 2018). Es ist demnach denkbar, dass eine alleinige Immobilisation hauptsächlich über veränderte molekulare muskuläre Mechanismen im Sinne einer CIM und weniger über Veränderungen an der neuromuskulären Synapse im Sinne einer CIPNM zu Einschränkungen der neuromuskulären Funktion führt.

Betrachtet man die begleitenden Experimente von Schaller et al. (2018) am selben Versuchskollektiv, so wird der Erfolg der Sepsisinduktion mittels intravenöser Verabreichung von C.p. anhand der

Messung systemischer Parameter deutlich: Infolge der Intervention kam es zu einer um das 26-fache erhöhten MetHb-Fraktion sowie zu einem signifikanten Verlust an Körpergewicht. Die systemische Inflammationsreaktion zog eine signifikant erhöhte Expression der nAChR α 7 nach sich. Darüber hinaus wurden in den begleitenden Experimenten eine durch alleinige Infektion bedingte Reduktion der Masse des M. tibialis, eine signifikante Abnahme der maximalen Spannkraft bei tetanischer Stimulation und eine Verringerung der Querschnittsfläche der Muskelfasern in der H.E.-Färbung sowie in der spezifischen Darstellung der langsamen (Typ I) und schnellen (Typ II) Myosinfasern nachgewiesen (Schaller et al., 2018). Neben der veränderten postsynaptischen Rezeptorexpression kam es demnach auch zu pathologischen Veränderungen am Skelettmuskel sowie zu einer reduzierten neuromuskulären Funktion im Sinne einer CIPNM. Die vorliegenden Ergebnisse reihen sich in die Studien von Liu et al. (2014) und Xie et al. (2016) ein, die einen Anstieg der nAChR α 7-Expression infolge einer Sepsis beschrieben. In den genannten Arbeiten wurden die systemische Inflammationsreaktion allerdings durch coekale Ligatur und Punktion ausgelöst und die erhöhte Rezeptorexpression mittels Westernblot, Immunhistochemie sowie PCR detektiert.

Die Tatsache, dass in den zitierten tierexperimentellen Studien die Induktion von Immobilisation bzw. Sepsis, die wesentlichen Risikofaktoren für die Entwicklung einer CIPNM darstellen, mit einer erhöhten Expression von nAChR α 7 einherging, ist nicht gleichbedeutend mit der Annahme, der Einbau der Rezeptoren in die Skelettmuskelfibrillenmembran sei pathogenetischer Bestandteil der erworbenen neuromuskulären Dysfunktion. Möglicherweise ist sogar das Gegenteil der Fall und rezeptorabhängige Mechanismen wirken der komplexen Pathogenese der Erkrankung entgegen. Dafür spräche zum einen der Nachweis, dass via Stimulation des Rezeptors ein zwar geringes, aber dennoch klinisch relevantes Endplattenpotential sowie in der Konsequenz eine Muskelkontraktion hervorgerufen werden kann (Lee et al., 2014; Tsuneki et al., 2003). Tendenziell wäre also durch Akquise von Rezeptoren, die zusätzlich zu den reifen nAChR an der neuromuskulären Übertragung beteiligt sein können, eine verbesserte synaptische Übertragung an der motorischen Endplatte zu erwarten. Zum anderen vermuten zahlreiche Autoren aufgrund der hohen Leitfähigkeit des Kanals gegenüber Ca^{2+} -Ionen und bekannter second messenger Effekte von Ca^{2+} -Ionen zusätzliche metabotrope Effekte des Rezeptors. So sehen Fischer et al. (1999) einen Zusammenhang zwischen der Funktion des Rezeptors und der Tatsache, dass er lediglich während der Fetalperiode oder während pathologischer Zustände exprimiert wird. Genauer vermuten sie eine Beteiligung des Rezeptors an der Synaptogenese. Ebenso bestärkt die Beobachtung, dass im Rattenmodell während der Wundheilung eine vermehrte Expression von nAChR α 7 in Satellitenzellen nachgewiesen werden konnte (Tian et al., 2015), die Annahme, der Rezeptor könne an Regenerationsvorgängen im Skelettmuskel beteiligt sein. In Anbetracht der Studienlage wären durch

die Expression des Rezeptors also eher Effekte zu erwarten, die der Entwicklung einer CIPNM entgegenwirken. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass eine pharmakologische Stimulation des Rezeptors zu einer verminderten Expression der nAChR α 7 führt. Der Effekt einer prophylaktischen Therapie mit GTS-21 auf die Entwicklung einer CIPNM wurde bisher noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit kam es unter zweimal täglicher Gabe von 10 mg/kg KG GTS-21 zu einer signifikant verminderten Rezeptorexpression. Sowohl in den Hauptgruppen Scheininfektion und Infektion als auch in den Subgruppen Scheininfektion ohne Immobilisation sowie Infektion mit bzw. ohne Immobilisation konnte mittels *Post hoc* Analyse ein signifikanter Therapieeffekt nachgewiesen werden.

Wie erwähnt zeigen zahlreiche Studien eine erhöhte Expression des nAChR γ oder des nAChR α 7 bei gleichzeitigem Vorliegen einer durch Immobilisation oder systemische Infektion hervorgerufenen neuromuskulären Dysfunktion (Friedrich et al., 2015; Khan et al., 2014; Lee et al., 2014). Es wäre allerdings unzulässig, das Level der Expression der nAChR α 7 gleichsam als Marker für die Ausprägung einer CIPNM anzusehen, da aufgrund der aktuellen Studienlage keinesfalls vorausgesetzt werden kann, dass die Entwicklung einer CIPNM zwingend mit einer Expression von nAChR α 7 einhergeht. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten infolge alleiniger Immobilisation kein signifikanter Anstieg der nAChR α 7-Expression, wohl aber eine signifikant reduzierte maximale Spannkraft nach tetanischer Stimulation gezeigt werden. Um die Effekte der Therapie mit GTS-21 zu beurteilen, genügt es also nicht, eine signifikante Verminderung der Rezeptorexpression im Vergleich zur Placebogruppe nachzuweisen, vielmehr ist ein Blick auf die begleitenden klinischen Experimente am selben Versuchskollektiv erforderlich:

Es stellte sich heraus, dass die Therapie mit GTS-21 den Verlust an Muskelmasse abschwächt. Darüber hinaus kam es durch die Therapie mit GTS-21 zu einer signifikant verminderten Abnahme des Muskelfaserquerschnitts in der H.E.-Färbung sowie zu einer signifikant abgeschwächten Reduktion der Dicke der langsamen Myosinfasern (Typ I). In Bezug auf die Dicke der schnellen Myosinfasern (Typ II) konnte zwar kein signifikanter Therapieeffekt gezeigt werden, allerdings ergaben sich signifikante Interaktionseffekte zwischen Immobilisation und Therapie sowie zwischen Infektion und Therapie (Schaller et al., 2018). Somit ist anzunehmen, dass die Therapie mit GTS-21 dem Verlust von Muskelgewebe und Myosin entgegenwirken kann. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse der Mechanomyographie eine verbesserte neuromuskuläre Funktion nach GTS-21-Therapie nach. Der Vollständigkeit halber sollte an dieser Stelle allerdings konstatiert werden, dass die Messung der Spannkraft einzelner Muskelzuckungen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Therapie zeigte (Schaller et al., 2018). In der klinischen Praxis dürfte die Spannkraft nach tetanischer Stimulation die Fähigkeit, wiederholt Muskelarbeit zu verrichten, allerdings deutlich besser widerspiegeln. Die Therapie mit GTS-21 bewirkte

also nicht nur eine veränderte postsynaptische Rezeptorexpression, sondern auch einen morphologisch und funktionell verbesserten Muskelstatus.

Durch welche lokalen Mechanismen am Skelettmuskel die Effekte einer Therapie mit GTS-21 vermittelt werden könnten, wurde bereits aufgeführt. An dieser Stelle ist aber festzuhalten, dass durch die systemische Verabreichung des Wirkstoffs nicht nur nAChR α 7 an der neuromuskulären Synapse beeinflusst werden. Klinische Konsequenzen sind natürlich auch an anderen Geweben mit Expression dieser Rezeptoren zu erwarten. Hierbei sind insbesondere die nAChR α 7 zirkulierender Immunzellen zu nennen, über die systemische antiinflammatorische Effekte vermittelt werden (Borovikova et al., 2000; De Jonghe & Ulloa, 2007; Khan et al., 2012; Wang et al., 2004). So zeigten z.B. Wang et al. (2004) in ihrer Studie, dass eine elektrische Stimulation des N. vagus die Produktion von inflammatorischen Zytokinen nur dann inhibieren konnte, wenn das Tier nAChR α 7 synthetisieren konnte. Passend dazu konnte in einer anderen Studie belegt werden, dass die Verabreichung von GTS-21 im Tiermodell zu einer verringerten Produktion von TNF α und zu einer verringerten Mortalität nach Verbrennungsverletzungen führt (Khan et al., 2012). Es ist also anzunehmen, dass die Therapie mit GTS-21 über zirkulierende Immunzellen vermittelte systemische antiinflammatorische Effekte bewirkt. Da eine systemische Inflammation sowohl in zahlreichen Studien verwandter Arbeiten als auch in der vorliegenden Versuchsreihe zu einer neuromuskulären Dysfunktion im Sinne einer CIPNM führte, ist es sehr wahrscheinlich, dass systemische antiinflammatorische Effekte der Entwicklung einer CIPNM entgegenwirken können. In den begleitenden Experimenten der vorliegenden Arbeit führte in der Infektionsgruppe die Therapie mit GTS-21 im Vergleich zur Placebobehandlung zu einem signifikant verminderten Anstieg der MetHb-Fraktion sowie zu einem signifikant reduzierten Verlust an Körpergewicht (Schaller et al., 2018). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die Therapie mit GTS-21 die durch die Gabe von C.p. induzierte systemische Inflammationsreaktion abschwächen kann. Der therapeutische Benefit bezüglich der morphologischen und funktionellen Veränderungen am Muskel könnte sowohl durch die dargelegten lokalen Mechanismen der Stimulation von nAChR α 7 an der neuromuskulären Synapse als auch über die via nAChR α 7 zirkulierender Immunzellen vermittelte systemische Immunsuppression erreicht werden. Da GTS-21 in der vorliegenden Arbeit durch intraperitoneale Applikation systemisch verabreicht wurde, kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, in welchem Verhältnis systemische und lokale molekulare Therapieeffekte der Entwicklung einer CIPNM entgegenwirken. Hier bietet sich ein Ansatz für weitere Forschung an. Zur Differenzierung zwischen lokalen und systemischen Therapieeffekten könnte man z.B. Tiere mit Depletion von Leukozyten verwenden. Dadurch würden ausschließlich lokale Effekte an der neuromuskulären Synapse beeinflusst, deren klinische Auswirkungen man anschließend bestimmen könnte. Allerdings ginge dies mit einer reduzierten

Immunkompetenz einher, was wiederum das Ausmaß der systemischen Inflammationsreaktion als wesentlichen Modulators der Entwicklung einer neuromuskulären Dysfunktion beeinflussen würde.

Durch Verwendung des etablierten Double-Hit Modells (Fink et al., 2008) konnten die Auswirkungen von Immobilisation und/oder systemischer Inflammation sowie die Effekte der Therapie mit GTS-21 auf die Expression der nAChR α 7 unter kontrollierten Rahmenbedingungen untersucht werden. Das verwendete Studiendesign erlaubte eine Einschätzung der Rezeptorexpression lediglich nach Ablauf des 12-tägigen Untersuchungszeitraums. Dieser Gesichtspunkt mag die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einschränken, da das Level der nAChR α 7-Expression wie bereits ausgeführt vom zeitlichen Abstand zum Beginn der Intervention abhängt (Fischer et al., 1999; Liu et al., 2014; Tsuneki et al., 2003). Eine Bestimmung der Rezeptorexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Immobilisation bzw. Infektion wäre sicherlich interessant, um Vergleiche zum klinischen Verlauf einer CIPNM ziehen zu können. Im Kontext des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Double-Hit Modells ist eine beliebige Verlängerung des Interventionszeitraums unmöglich, da die Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen Infektion über einen längeren Zeitraum nicht praktikabel erscheint und eine wesentlich erhöhte Mortalität nach sich ziehen würde.

Um zwischen den einzelnen Westernblots eine Vergleichbarkeit herzustellen und damit statistische Berechnungen zu ermöglichen, wurde jeder Versuchsreihe eine identische Standardprobe hinzugefügt. Wie bereits erwähnt, wurde anhand der Relation der normalisierten Standardwerte ein Faktor ermittelt, mit dem die Ergebnisse der übrigen Muskelproben verrechnet wurden. Eine artefaktbedingte Verfälschung der Standardprobe hätte also Auswirkungen auf alle ermittelten Werte des Westernblots. Allerdings gilt diese Einschränkung lediglich für Artefakte, die in Arbeitsschritten zwischen der Normalisierung der Proteinbanden und der Detektion der Chemilumineszenzsignale entstanden sind. Mögliche Messfehler könnten auch bei der Analyse der spezifischen Chemilumineszenzbanden mittels ImageLab entstanden sein, bei der die Grenzen des Messbereichs aller Proteinbanden manuell gesetzt wurden. In den Randbereichen der spezifischen Proteinbanden können dabei kleine artefaktbedingte Hintergrundsignale nicht immer eindeutig von spezifischen Proteinsignalen abgegrenzt werden. Um bei diesem manuellen Schritt keine Verzerrungen der Ergebnisse zu provozieren, wurden alle Bandengrenzen von der selben Person festgelegt. Die dennoch unvermeidliche Unschärfe im Randbereich der Bande dürfte statistisch allenfalls bei sehr schwachem Signal der Bande ins Gewicht fallen.

Zur Stimulation der nAChR α 7 wurden zweimal täglich 10mg/kg KG GTS-21 appliziert. Dabei sollte nicht unerwähnt bleiben, dass über die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik dieses Wirkstoffs bei Nagetieren bisher wenig bekannt ist. Die optimale Dosis des Medikaments, seine Pharmakokinetik im Rahmen systemischer Inflammationsreaktionen sowie die optimale Therapiedauer könnten in

zukünftigen Studien näher untersucht werden, da sich durch Modifikation des Therapieregimes unter Umständen die Effekte noch deutlich steigern lassen.

In weiteren Schritten könnte GTS-21 auch in Studien mit humanen Testpersonen eingesetzt werden, um den Einfluss auf systemische Inflammationsreaktionen und/oder den Effekt einer Prophylaxe gegenüber der Entwicklung einer neuromuskulären Dysfunktion zu untersuchen. Über klinische Phase II-Studien an gesunden, nicht rauchenden Freiwilligen existieren bereits Veröffentlichungen, in denen keine nennenswerten Nebenwirkungen von GTS-21 beschrieben werden (Kitagawa et al., 2003; Kox et al., 2011), sodass eine gute Verträglichkeit angenommen werden kann. Allerdings schlug ein erster Versuch, klinische Parameter und Zytokinlevel im Blut nach Induktion einer systemischen Inflammationsreaktion mittels Gabe von GTS-21 signifikant zu beeinflussen, fehl (Kox et al., 2011). An dieser Stelle sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik des Medikaments auch im menschlichen Organismus noch näher betrachtet werden muss. Das therapeutische Potential des Wirkstoffs könnte in der zitierten Studie durch ein ineffizientes Therapieregime verkannt worden sein. In der genannten Studie wurde GTS-21 beispielsweise oral verabreicht, während in der vorliegenden Arbeit eine intraperitoneale Applikation vorgenommen wurde. Die Untersuchung der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von GTS-21 bedarf daher weiterer Forschung.

6 Zusammenfassung

Die erworbene Muskelschwäche auf Intensivstation (ICUAW) stellt eine häufige Komplikation in der Intensivmedizin dar (Friedrich et al., 2015; Stevens et al., 2007). Die Erkrankung bewirkt durch die Entwicklung neuromuskulärer Defizite eine deutlich erhöhte Morbidität und Mortalität (Ali et al., 2008; Garnacho-Montero et al., 2005; Griffiths & Hall, 2010; Hund, 2001). Um geeignete therapeutische Strategien zu entwickeln, ist ein Verständnis der pathogenetischen Vorgänge essentiell. Neben molekularen Veränderungen des Nerven und des Muskels scheinen auch strukturelle und funktionelle Abweichungen der neuromuskulären Synapse in der Pathogenese eine Rolle zu spielen (Friedrich et al., 2015). Unter anderem weisen einige Studien darauf hin, dass es nach Denervation, Immobilisation oder systemischer Inflammation zu einer erhöhten Expression des nAChR α 7 kommt (Fischer et al., 1999; Khan et al., 2014; Lee et al., 2014; Liu et al., 2014; Tsuneki et al., 2003; Xie et al., 2016). Bisher konnte allerdings nur darüber spekuliert werden, welche funktionellen Konsequenzen die veränderte Rezeptorexpression nach sich zieht. Unter Verwendung des bereits etablierten Double-Hit Modells (Fink et al., 2008) wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen einer kontinuierlichen systemischen Inflammation durch Induktion einer Sepsis sowie einer 12-tägigen Immobilisierung einer Extremität durch Pinning auf die Expression des nAChR α 7 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Immobilisation alleine keine signifikant erhöhte Expression des Rezeptors zur Folge hat. Im Gegensatz dazu war die intravenöse Applikation von C.p. mit einer signifikant erhöhten Rezeptorexpression am Skelettmuskel assoziiert.

Zum ersten Mal wurden die Auswirkungen von GTS-21, einem spezifischen Agonisten des nAChR α 7, untersucht. Dabei führte die Therapie mittels 10 mg/kg KG GTS-21 zu einer signifikanten Reduktion der Rezeptorexpression. In begleitenden Experimenten am selben Versuchskollektiv konnten ferner positive Therapieeffekte im Hinblick auf systemische Parameter wie Methämoglobinspiegel und Körpergewicht, auf die maximale Muskelspannkraft nach tetanischer Stimulation sowie auf die durchschnittliche Querschnittsfläche der Muskelfasern nachgewiesen werden (Schaller et al., 2018). Die Arbeit liefert also Hinweise darauf, dass man sich eine durch bestimmte Konditionen bedingte veränderte Rezeptorexpression therapeutisch zu Nutze machen könnte. An dieser Stelle könnten zukünftige For-

schungsarbeiten ansetzen und untersuchen, ob und wie man mit Hilfe von GTS-21 auch am Menschen den Krankheitsverlauf der ICUAW beeinflussen kann.

Literaturverzeichnis

- ALBUQUERQUE, EX ; ALKONDON, M ; PEREIRA, EFR ; CASTRO, NG ; SCHRATTENHOLZ, A ; BARBOSA, CTF ; BONFANTECABARCAS, R ; ARACAVAL, Y ; EISENBERG, HM ; MAELICKE, A: Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Pharmacological characterization and modulation of synaptic function. In: *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 280 (1997), MAR, Nr. 3, S. 1117–1136. – ISSN 0022-3565
- ALI, NA ; O'BRIEN, JM ; HOFFMANN, SP ; PHILLIPS, G ; GARLAND, A ; FINLEY, JCW ; ALMOOSA, K ; HEJAL, R ; WOLF, KM ; LEMESHOW, S ; CONNORS, AF ; MARSH, CB ; CONSORTIUM, Midwest Critical C.: Acquired weakness, handgrip strength, and mortality in critically ill patients. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 178 (2008), AUG 1, Nr. 3, S. 261–268. – ISSN 1073-449X
- ALKONDON, M ; PEREIRA, EFR ; CORTES, WS ; MAELICKE, A ; ALBUQUERQUE, EX: Choline is a selective agonist of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. In: *European journal of neuroscience* 9 (1997), DEC, Nr. 12, S. 2734–2742. – ISSN 0953-816X
- ARREDONDO, J ; CHERNYAVSKY, AI ; JOLKOVSKY, DL ; P, KE ; GRANDO, SA: Receptor-mediated tobacco toxicity: Cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha 7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. In: *Faseb journal* 20 (2006), OCT, Nr. 12, S. 2093–2101. – ISSN 0892-6638
- BEDNARIK, J ; LUKAS, Z ; VONDRACEK, P: Critical illness polyneuromyopathy: The electrophysiological components of a complex entity. In: *Intensive care medicine* 29 (2003), SEP, Nr. 9, S. 1505–1514. – ISSN 0342-4642
- BEREK, K ; MARGREITER, J ; WILLEIT, J ; BEREK, A ; SCHMUTZHARD, E ; MUTZ, NJ: Polyneuropathies in critically ill patients: A prospective evaluation. In: *Intensive care medicine* 22 (1996), SEP, Nr. 9, S. 849–855. – ISSN 0342-4642
- BERG, DK ; CONROY, WG: Nicotinic alpha 7 receptors: Synaptic options and downstream signaling in neurons. In: *Journal of neurobiology* 53 (2002), DEC, Nr. 4, S. 512–523. – ISSN 0022-3034
- BERGHE, G Van den ; SCHOONHEYDT, K ; BECX, P ; BRUYNINCKX, F ; WOUTERS, PJ: Insulin therapy protects the central and peripheral nervous system of intensive care patients. In: *Neurology* 64 (2005), APR 26, Nr. 8, S. 1348–1353. – Annual Meeting of the Endocrine-Society, New Orleans, LA, JUN, 2004. – ISSN 0028-3878

- BOLTON, CF: Neuromuscular manifestations of critical illness. In: *Muscle & Nerve* 32 (2005), AUG, Nr. 2, S. 140–163. – ISSN 0148-639X
- BOLTON, CF ; GILBERT, JJ ; HAHN, AF ; SIBBALD, WJ: Polyneuropathy in critically ill patients. In: *Journal of neurology neurosurgery and psychiatry* 47 (1984), Nr. 11, S. 1223–1231. – ISSN 0022-3050
- BOROVIKOVA, LV ; IVANOVA, S ; ZHANG, MH ; YANG, H ; BOTCHKINA, GI ; WATKINS, LR ; WANG, HC ; ABUMRAD, N ; EATON, JW ; TRACEY, KJ: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. In: *Nature* 405 (2000), MAY 25, Nr. 6785, S. 458–462. – ISSN 0028-0836
- BOUZAT, C ; GUMILAR, F ; SPITZMAUL, G ; WANG, HL ; RAYES, D ; HANSEN, SB ; TAYLOR, P ; SINE, SM: Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. In: *Nature* 430 (2004), AUG 19, Nr. 7002, S. 896–900. – ISSN 0028-0836
- BRADFORD, MM: Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72 (1976), Nr. 1-2, S. 248–254. – ISSN 0003-2697
- CASAER, MP: Muscle weakness and nutrition therapy in ICU. In: *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 18 (2015), MAR, Nr. 2, S. 162–168. – ISSN 1363-1950
- CASTRO, NG ; ALBUQUERQUE, EX: Alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. In: *Biophysical journal* 68 (1995), FEB, Nr. 2, S. 516–524. – ISSN 0006-3495
- CHAI, JK ; WU, YQ ; SHENG, ZY: Role of ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia. In: *Critical care medicine* 31 (2003), JUN, Nr. 6, S. 1802–1807. – ISSN 0090-3493
- CHENSUE, SW ; TEREBUH, PD ; REMICK, DG ; SCALES, WE ; KUNKEL, SL: In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosisfactor during experimental endotoxemia. Kinetiks, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects. In: *American journal of pathology* 138 (1991), FEB, Nr. 2, S. 395–402. – ISSN 0002-9440
- COHEN-CORY, S: The developing synapse: Construction and modulation of synaptic structures and circuits. In: *Science* 298 (2002), OCT 25, Nr. 5594, S. 770–776. – ISSN 0036-8075
- CORPENNO, R ; DWORKIN, B ; CACCIANI, N ; SALAH, H ; BERGMAN, HM ; RAVARA, B ; VITADELLO, M ; GORZA, L ; GUSTAFSON, AM ; HEDSTROM, Y ; PETERSSON, J ; FENG, HZ ; JIN, JP ; IWAMOTO, H ; YAGI, N ; ARTEMENKO, K ; BERGQUIST, J ; LARSSON, L: Time course analysis of mechanical ventilation-induced diaphragm contractile muscle dysfunction in the rat. In: *Journal of physiology-London* 592 (2014), SEP 1, Nr. 17, S. 3859–3880. – ISSN 0022-3751
- CRONE, C: Tetraparetic critically ill patients show electrophysical signs of myopathy. In: *Muscle & Nerve* 56 (2017), SEP, Nr. 3, S. 433–440. – ISSN 0148-639X

- DE JONGHE, B ; BASTUJI-GARIN, S ; SHARSHAR, T ; OUTIN, H ; BROCHARD, L: Does ICU-acquired paresis lengthen weaning from mechanical ventilation? In: *Intensive care medicine* 30 (2004), JUN, Nr. 6, S. 1117–1121. – ISSN 0342-4642
- DE JONGHE, B ; SHARSHAR, T ; LEFAUCHEUR, JP ; AUTHIER, FJ ; DURAND-ZALESKI, I ; BOUSSARSAR, M ; CERF, C ; RENAUD, E ; MESRATI, F ; CARLET, J ; RAPHAEL, JC ; OUTIN, H ; BASTUJI-GARIN, S ; NEUROMYOPATH, Grp R. d'Etude: Paresis acquired in the intensive care unit - A prospective multicenter study. In: *Jama-Journal of the american medical association* 288 (2002), DEC 11, Nr. 22, S. 2859–2867. – ISSN 0098-7484
- DE JONGHE, WJ ; ULLOA, L: The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. In: *British journal of pharmacology* 151 (2007), AUG, Nr. 7, S. 915–929. – ISSN 0007-1188
- DI GIOVANNI, S ; MOLON, A ; BROCCOLINI, A ; MELCON, G ; MIRABELLA, M ; HOFFMAN, EP ; SERVIDEL, S: Constitutive activation of MAPK cascade in acute quadriplegic myopathy. In: *Annals of neurology* 55 (2004), FEB, Nr. 2, S. 195–206. – ISSN 0364-5134
- DRUSCHKY, A ; HERKERT, M ; RADESPIEL-TROGER, M ; DRUSCHKY, K ; HUND, E ; BECKER, CM ; HILZ, MJ ; ERBGUTH, F ; NEUNDORFER, B: Critical illness polyneuropathy: clinical findings and cell culture assay of neurotoxicity assessed by it prospective study. In: *Intensive care medicine* 27 (2001), APR, Nr. 4, S. 686–693. – ISSN 0342-4642
- EIKERMANN, M ; LATRONICO, N: What is new in prevention of muscle weakness in critically ill patients? In: *Intensive care medicine* 39 (2013), DEC, Nr. 12, S. 2200–2203. – ISSN 0342-4642
- FENZI, F ; LATRONICO, N ; REFATTI, N ; RIZZUTO, N: Enhanced expression of E-selectin on the vascular endothelium of peripheral nerve in critically ill patients with neuromuscular disorders. In: *Acta neuropathologica* 106 (2003), JUL, Nr. 1, S. 75–82. – ISSN 0001-6322
- FILATOV, GN ; RICH, MM: Hyperpolarized shifts in the voltage dependence of fast inactivation of Na(V)1.4 and Na(V)1.5 in a rat model of critical illness myopathy. In: *Journal of physiology-London* 559 (2004), SEP 15, Nr. 3, S. 813–820. – ISSN 0022-3751
- FINFER, S ; C, Australian New Zealand I. ; GRP, Canadian Critical Care T.: Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients with traumatic brain injury: Long-term follow-up of a subgroup of patients from the NICE-SUGAR study. In: *Intensive care medicine* 41 (2015), JUN, Nr. 6, S. 1037–1047. – ISSN 0342-4642
- FINK, H ; HELMING, M ; UNTERBUCHNER, C ; LENZ, A ; NEFF, F ; MARTYN, JAJ ; BLOBNER, M: Systemic inflammatory response syndrome increases immobility-induced neuromuscular weakness. In: *Critical care medicine* 36 (2008), MAR, Nr. 3, S. 910–916. – ISSN 0090-3493

- FISCHER, U ; REINHARDT, S ; ALBUQUERQUE, EX ; MAELICKE, A: Expression of functional alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor during mammalian muscle development and denervation. In: *European journal of neuroscience* 11 (1999), AUG, Nr. 8, S. 2856–2864. – ISSN 0953-816X
- FRICK, CG ; FINK, H ; GORDAN, ML ; ECKEL, B ; MARTYN, JAJ ; BLOBNER, M: Chronic escherichia coli infection induces muscle wasting without changing acetylcholine receptor numbers. In: *Intensive care medicine* 34 (2008), MAR, Nr. 3, S. 561–567. – ISSN 0342-4642
- FRICK, CG ; HELMING, M ; MARTYN, JAJ ; BLOBNER, M ; FINK, H: Continuous administration of pyridostigmine improves immobilization-induced neuromuscular weakness. In: *Critical care medicine* 38 (2010), MAR, Nr. 3, S. 922–927. – ISSN 0090-3493
- FRIEDRICH, O ; FINK, RHA ; HUND, E: Understanding critical illness myopathy: Approaching the pathomechanism. In: *Journal of nutrition* 135 (2005), JUL, Nr. 7, S. 1813S–1817S. – 43rd Annual Meeting of the American-Society-for-Clinical-Nutrition, SAN DIEGO, CA, APR 12-13, 2003. – ISSN 0022-3166
- FRIEDRICH, O ; HUND, E ; WEBER, C ; HACKE, W ; FINK, RHA: Critical illness myopathy serum fractions affect membrane excitability and intracellular calcium release in mammalian skeletal muscle. In: *Journal of neurology* 251 (2004), JAN, Nr. 1, S. 53–65. – ISSN 0340-5354
- FRIEDRICH, O ; REID, MB ; BERGHE, G Van den ; VANHOREBEEK, I ; HERMANS, G ; RICH, MM ; LARSSON, L: The sick and the weak: Neuropathies/Myopathies in the critically ill. In: *Physiological reviews* 95 (2015), JUL, Nr. 3, S. 1025–1109. – ISSN 0031-9333
- GARNACHO-MONTERO, J ; AMAYA-VILLAR, R ; GARCIA-GARMENDIA, JL ; MADRAZO-OSUNA, J ; ORTIZ-LEYBA, C: Effect of critical illness polyneuropathy on the withdrawal from mechanical ventilation and the length of stay in septic patients. In: *Critical care medicine* 33 (2005), FEB, Nr. 2, S. 349–354. – ISSN 0090-3493
- GARNACHO-MONTERO, J ; MADRAZO-OSUNA, J ; GARCIA-GARMENDIA, JL ; ORTIZ-LEYBA, C ; JIMENEZ-JIMENEZ, FJ ; BARRERO-ALMODOVAR, A ; GARNACHO-MONTERO, MC ; MOYANO-DEL-ESTAD, MR: Critical illness polyneuropathy: Risk factors and clinical consequences. A cohort study in septic patients. In: *Intensive care medicine* 27 (2001), AUG, Nr. 8, S. 1288–1296. – ISSN 0342-4642
- GORDON, BS ; KELLEHER, AR ; KIMBALL, SR: Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. In: *International journal of biochemistry & cell biology* 45 (2013), OCT, Nr. 10, S. 2147–2157. – ISSN 1357-2725
- GRIFFITHS, RD ; HALL, JB: Intensive care unit-acquired weakness. In: *Critical care medicine* 38 (2010), MAR, Nr. 3, S. 779–788. – ISSN 0090-3493
- GROSU, HB ; LEE, YI ; LEE, J ; EDEN, E ; EIKERMANN, M ; ROSE, KM: Diaphragm muscle thinning in patients who are mechanically ventilated. In: *Chest* 142 (2012), DEC, Nr. 6, S. 1455–1460. – ISSN 0012-3692

- GUAN, ZZ ; ZHANG, X ; RAVID, R ; NORDBERG, A: Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. In: *Journal of neurochemistry* 74 (2000), JAN, Nr. 1, S. 237–243. – ISSN 0022-3042
- GUERTLER, A ; KUNZ, N ; GOMOLKA, M ; HORNHARDT, S ; FRIEDL, AA ; McDONALD, K ; KOHN, JE ; POSCH, A: Stain-free technology as a normalization tool in western blot analysis. In: *Analytical biochemistry* 433 (2013), FEB 15, Nr. 2, S. 105–111. – ISSN 0003-2697
- HELLIWELL, TR ; COAKLEY, JH ; WAGENMAKERS, AJM ; GRIFFITHS, RD ; CAMPBELL, IT ; GREEN, CJ ; McCLELLAND, P ; BONE, JM: Necrotizing myopathy in critically-ill patients. In: *Journal of pathology* 164 (1991), AUG, Nr. 4, S. 307–314. – ISSN 0022-3417
- HERENCIA, F ; LOPEZ-GARCIA, MP ; UBEDA, A ; FERRANDIZ, ML: Nitric oxide-scavenging properties of some chalcone derivatives. In: *Nitric oxide-biology and chemistry* 6 (2002), MAR, Nr. 2, S. 242–246. – ISSN 1089-8603
- HERMANS, G ; BERGHE, G Van den: Clinical review: intensive care unit acquired weakness. In: *Critical care* 19 (2015), AUG 5. – ISSN 1466-609X
- HERMANS, G ; CASAER, MP ; CLERCKX, B ; GUIZA, F ; VANHULLEBUSCH, T ; DERDE, S ; MEERSSEMAN, P ; DERESE, I ; MESOTTEN, D ; WOUTERS, PJ ; VANCROMPHAUT, S ; DEBAVEYE, Y ; GOSSELINK, R ; GUNST, J ; WILMER, A ; BERGHE, G Van den ; VANHOREBEEK, I: Effect of tolerating macronutrient deficit on the development of intensive-care unit acquired weakness: a subanalysis of the EPaNIC trial. In: *Lancet respiratory medicine* 1 (2013), OCT, Nr. 8, S. 621–629. – ISSN 2213-2600
- HERMANS, G ; VAN MECHELEN, H ; CLERCKX, B ; VANHULLEBUSCH, T ; MESOTTEN, D ; WILMER, A ; CASAER, MP ; MEERSSEMAN, P ; DEBAVEYE, Y ; VAN CROMPHAUT, S ; WOUTERS, PJ ; GOSSELINK, R ; BERGHE, G Van den: Acute outcomes and 1-year mortality of intensive care unit-acquired weakness. A cohort study and propensity-matched analysis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 190 (2014), AUG 15, Nr. 4, S. 410–420. – ISSN 1073-449X
- HERMANS, G ; WILMER, A ; MEERSSEMAN, W ; MILANTS, I ; WOUTERS, PJ ; BOBBAERS, H ; BRUYNINCKX, F ; BERGHE, G Van den: Impact of intensive insulin therapy on neuromuscular complications and ventilator dependency in the medical intensive care unit. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 175 (2007), MAR 1, Nr. 5, S. 480–489. – ISSN 1073-449X
- HERRIDGE, MS ; CHEUNG, AM ; TANSEY, CM ; MATTE-MARTYN, A ; DIAZ-GRANADOS, N ; AL-SAIDI, F ; COOPER, AB ; GUEST, CB ; MAZER, CD ; MEHTA, S ; STEWART, TE ; BARR, A ; COOK, D ; SLUTSKY, AS ; GRP, Canadian Critical Care T.: One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. In: *New england journal of medicine* 348 (2003), FEB 20, Nr. 8, S. 683–693. – ISSN 0028-4793
- HERRIDGE, MS ; TANSEY, C. ; MATTE, A ; TOMLINSON, G ; DIAZ-GRANADOS, N ; COOPER, A ; GUEST, CB ; MAZER, CD ; MEHTA, S ; STEWART, TE ; KUDLOW, P ; COOK, D ; SLUTSKY, AS ; CHEUNG, AM ; GRP,

- Canadian Critical Care T.: Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. In: *New england journal of medicine* 364 (2011), APR 7, Nr. 14, S. 1293–1304. – ISSN 0028-4793
- HOLECEK, M: Muscle wasting in animal models of severe illness. In: *International journal of experimental pathology* 93 (2012), JUN, Nr. 3, S. 157–171. – ISSN 0959-9673
- HUND, E: Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. In: *Journal of neurology* 248 (2001), NOV, Nr. 11, S. 929–934. – ISSN 0340-5354
- HUSSAIN, SNA ; CORNACHIONE, AS ; GUICHON, C ; AL KHUNAIZI, A ; LEITE, FS ; PETROF, BJ ; MOFARRAHI, M ; MOROZ, N ; VARENNE, B de ; GOLDBERG, P ; RASSIER, DE: Prolonged controlled mechanical ventilation in humans triggers myofibrillar contractile dysfunction and myofilament protein loss in the diaphragm. In: *Thorax* 71 (2016), MAY, Nr. 5, S. 436–445. – ISSN 0040-6376
- JESCHKE, MG ; FINNERTY, CC ; SUMAN, OE ; KULP, G ; MLCAK, RP ; HERNDON, DN: The effect of oxandrolone on the endocrinologic, inflammatory, and hypermetabolic responses during the acute phase postburn. In: *Annals of surgery* 246 (2007), SEP, Nr. 3, S. 351–362. – 127th Annual Meeting of the American-Surgical-Association, Colorado Springs, CO, APR, 2007. – ISSN 0003-4932
- JUEMANN, K ; LUNZ, D ; ZAUSIG, YA ; GRAF, BM ; ZINK, W: Intensive care unit-acquired weakness in the critically ill : Critical illness polyneuropathy and critical illness myopathy. In: *Der Anaesthetist* 60 (2011), OCT, Nr. 10, S. 887–901. – URL <https://doi.org/10.1007/s00101-011-1951-7>. – ISSN 0003-2417
- KEM, WR: The brain alpha 7 nicotinic receptor may be an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease: Studies with DMXBA (GTS-21). In: *Behavioural brain research* 113 (2000), AUG, Nr. 1-2, S. 169–181. – ISSN 0166-4328
- KERBAUL, F ; BROUSSE, M ; COLLART, F ; PELLISSIER, JF ; PLANCHE, D ; FERNANDEZ, C ; GOUIN, F ; GUIDON, C: Combination of histopathological and electromyographic patterns can help to evaluate functional outcome of critical ill patients with neuromuscular weakness syndromes. In: *Critical care* 8 (2004), DEC, Nr. 6, S. R358–R366. – ISSN 1466-609X
- KHAN, J ; HARRISON, TB ; RICH, MM ; MOSS, M: Early development of critical illness myopathy and neuropathy in patients with severe sepsis. In: *Neurology* 67 (2006), OCT 24, Nr. 8, S. 1421–1425. – ISSN 0028-3878
- KHAN, MAS ; FARKHONDEH, M ; CROMBIE, J ; JACOBSON, L ; KANEKI, M ; MARTYN, JAJ: Lipopolysaccharide upregulates alpha 7 acetylcholine receptors: Stimulation with GTS-21 mitigates growth arrest of macrophages and improves survival in burned mice. In: *Shock* 38 (2012), AUG, Nr. 2, S. 213–219. – ISSN 1073-2322
- KHAN, MAS ; SAHANI, N ; NEVILLE, KA ; NAGASHIMA, M ; LEE, S ; SASAKAWA, T ; KANEKI, M ; MARTYN, JAJ: Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 92 (2014), JAN, Nr. 1, S. 1–8. – ISSN 0008-4212

- KITAGAWA, H ; TAKENOUCI, T ; AZUMA, R ; WESNES, KA ; KRAMER, WG ; CLODY, DE ; BURNETT, AL:
Safety, pharmacokinetics, and effects on cognitive function of multiple doses of GTS-21 in healthy, male
volunteers. In: *Neuropsychopharmacology* 28 (2003), MAR, Nr. 3, S. 542–551. – ISSN 0893-133X
- KLAUDE, M ; FREDRIKSSON, K ; TJADER, I ; HAMMARQVIST, F ; AHLMAN, B ; ROOYACHERS, O ; WERNERMAN,
J: Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. In: *Clinical science*
112 (2007), MAY, Nr. 9-10, S. 499–506. – ISSN 0143-5221
- KLEYWEG, RP ; VANDERMECHE, FGA ; SCHMITZ, PIM: Interobserver agreement in the assessment of muscle
strength and functional abilities in Guillan-Barre-syndrome. In: *Muscle & Nerve* 14 (1991), NOV, Nr. 11,
S. 1103–1109. – ISSN 0148-639X
- KOX, M ; POMPE, JC ; GOUBERVILLE, MCG de ; HOEVEN, JG van der ; HOEDEMAEKERS, CW ; PICKKERS,
P: Effects of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 on the innate immune response in
humans. In: *Shock* 36 (2011), JUL, Nr. 1, S. 5–11. – ISSN 1073-2322
- LACOMIS, D ; GIULIANI, MJ ; VANCOTT, A ; KRAMER, DJ: Acute myopathy of intensive care: Clinical,
electromyographic, and pathological aspects. In: *Annals of neurology* 40 (1996), OCT, Nr. 4, S. 645–654. –
ISSN 0364-5134
- LACOMIS, D ; ZOCHODNE, DW ; BIRD, SJ: Critical illness myopathy. In: *Muscle & Nerve* 23 (2000), DEC,
Nr. 12, S. 1785–1788. – ISSN 0148-639X
- LATRONICO, N ; BERTOLINI, G ; GUARNERI, B ; BOTTERI, M ; PELI, E ; ANDROLETTI, S ; BERA, P ; LUCIANI,
D ; NARDELLA, A ; VITTORIELLI, E ; SIMINI, B ; CANDIANI, A: Simplified electrophysiological evaluation
of peripheral nerves in critically ill patients: The Italian multi-centre CRIMYNE study. In: *Critical care* 11
(2007), Nr. 1. – ISSN 1466-609X
- LATRONICO, N ; FENZI, F ; RECUPERO, D ; GUARNERI, B ; TOMELLERI, G ; TONIN, P ; DEMARIA, G ;
ANTONINI, L ; RIZZUTO, N ; CANDIANI, A: Critical illness myopathy and neuropathy. In: *Lancet* 347 (1996),
JUN 8, Nr. 9015, S. 1579–1582. – ISSN 0140-6736
- LATRONICO, N ; RASULO, FA: Presentation and management of ICU myopathy and neuropathy. In: *Current
opinion in critical care* 16 (2010), APR, Nr. 2, S. 123–127. – ISSN 1070-5295
- LEE, S ; YANG, HS ; SASAKAWA, T ; KHAN, MAS ; KHATRI, A ; KANEKI, M ; MARTYN, JAJ: Immobilization
with atrophy induces de novo expression of neuronal nicotinic alpha 7 acetylcholine receptors in muscle
contributing to neurotransmission. In: *Anesthesiology* 120 (2014), JAN, Nr. 1, S. 76–85. – ISSN 0003-3022
- LETTER, MACJ de ; SCHMITZ, PIM ; VISSER, LH ; VERHEUL, FAM ; SCHELLENS, RLLA ; COUL, DAWO de ;
MECHE, FGM van der: Risk factors for the development of polyneuropathy and myopathy in critically ill
patients. In: *Critical care medicine* 29 (2001), DEC, Nr. 12, S. 2281–2286. – ISSN 0090-3493

- LEVINE, S ; NGUYEN, T ; TAYLOR, N ; FRISCIA, ME ; BUDAK, MT ; ROTHENBERG, P ; ZHU, J ; SACHDEVA, R ; SONNAD, S ; KAISER, L ; RUBINSTEIN, NA ; POWERS, SK ; SHRAGER, JB: Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. In: *New england journal of medicine* 358 (2008), MAR 27, Nr. 13, S. 1327–1335. – ISSN 0028-4793
- LI, YP ; REID, MB: NF-kappa B mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. In: *American Journal of physiology-regulatory integrative and comparative physiology* 279 (2000), OCT, Nr. 4, S. R1165–R1170. – ISSN 0363-6119
- LI, YP ; SCHWARTZ, RJ ; WADDELL, ID ; HOLLOWAY, BR ; REID, MB: Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappa B activation in response to tumor necrosis factor alpha. In: *Faseb journal* 12 (1998), JUL, Nr. 10, S. 871–880. – ISSN 0892-6638
- LINDSTROM, JM: Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves - Comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. In: AGIUS, MA AND RICHMAN, DP AND FAIRCLOUGH, RH AND MASELLI, RA (Hrsg.): *Myasthenia gravis and related disorders: biochemical basis for disease of the neuromuscular junction* Bd. 998 New York Acad Sci; Myasthenia Gravis Fdn Amer Inc (Veranst.), 2003, S. 41–52. – 10th International Conference on Myasthenia Gravis and Related Disorders, Key Biscayne, Florida, MAY, 2002. – ISBN 1-57331-396-3
- LIU, L ; MIN, S ; LI, W ; WEI, K ; LUO, J ; WU, G ; AO, L ; CAO, J ; WANG, B ; WANG, Z: Pharmacodynamic changes with vecuronium in sepsis are associated with expression of $\alpha 7$ - and γ -nicotinic acetylcholine receptor in an experimental rat model of neuromyopathy. In: *British journal of anaesthesia* 112 (2014), JAN, Nr. 1, S. 159–168. – ISSN 0007-0912
- LLANO-DIEZ, M ; RENAUD, G ; ANDERSSON, M ; MARRERO, HG ; CACCIANI, N ; ENGQUIST, H ; CORPENO, R ; ARTEMENKO, K ; BERGQUIST, J ; LARSSON, L: Mechanisms underlying ICU muscle wasting and effects of passive mechanical loading. In: *Critical care* 16 (2012), Nr. 5. – ISSN 1466-609X
- LLOYD, GK ; WILLIAMS, M: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. In: *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 292 (2000), FEB, Nr. 2, S. 461–467. – ISSN 0022-3565
- LORIN, S ; NIERMAN, DM: Critical illness neuromuscular abnormalities. In: *Critical care clinics* 18 (2002), JUL, Nr. 3, S. 553+. – ISSN 0749-0704
- LUKAS, RJ ; CHANGEUX, JP ; LE NOVERE, N ; ALBUQUERQUE, EX ; BALFOUR, DJK ; BERG, DK ; BERTRAND, D ; CHIAPPINELLI, VA ; CLARKE, PBS ; COLLINS, AC ; DANI, JA ; GRADY, SR ; KELLAR, KJ ; LINDSTROM, JM ; MARKS, MJ ; QUIK, M ; TAYLOR, PW ; WONNACOTT, S: International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. In: *Pharmacological reviews* 51 (1999), JUN, Nr. 2, S. 397–401. – ISSN 0031-6997
- MACDONALD, J ; GALLEY, HF ; WEBSTER, NR: Oxidative stress and gene expression in sepsis. In: *British journal of anaesthesia* 90 (2003), FEB, Nr. 2, S. 221–232. – ISSN 0007-0912

- MALDIFASSI, MC ; ATIENZA, G ; ARNALICH, F ; LOPEZ-COLLAZO, E ; CEDILLO, JL ; MARTIN-SANCHEZ, C ; BORDAS, A ; RENART, J ; MONTIEL, C: A new IRAK-M-mediated mechanism implicated in the anti-inflammatory effect of nicotine via alpha 7 nicotinic receptors in human macrophages. In: *Plos one* 9 (2014), SEP 26, Nr. 9. – ISSN 1932-6203
- MARATHE, PH ; DWERSTEG, JF ; PAVLIN, EG ; HASCHKE, RH ; HEIMBACH, DM ; SLATTERY, JT: Effect of thermal injury on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium in humans. In: *Anesthesiology* 70 (1989), MAY, Nr. 5, S. 752–755. – ISSN 0003-3022
- MARTYN, JAJ ; FAGERLUND, MJ ; ERIKSSON, LI: Basic principles of neuromuscular transmission. In: *Anaesthesia* 64 (2009), MAR, Nr. 1, S. 1–9. – ISSN 0003-2409
- MARTYN, JAJ ; RICHTSFELD, M: Succinylcholine-induced hyperkalemia in acquired pathologic states - Etiologic factors and molecular mechanisms. In: *Anesthesiology* 104 (2006), JAN, Nr. 1, S. 158–169. – ISSN 0003-3022
- MARTYN, JAJ ; SZYFELBEIN, SK ; ALI, HH ; MATTEO, RS ; SAVARESE, JJ: Increased D-tubocurarine requirement following major thermal injury. In: *Anesthesiology* 52 (1980), Nr. 4, S. 352–355. – ISSN 0003-3022
- MASSA, R ; CARPENTER, S ; HOLLAND, P ; KARPATI, G: Loss and renewal of thick myofilaments in glucocorticoid-treated rat soleus after denervation and reinnervation. In: *Muscle & Nerve* 15 (1992), NOV, Nr. 11, S. 1290–1298. – ISSN 0148-639X
- MATSUNAGA, K ; KLEIN, TW ; FRIEDMAN, H ; YAMAMOTO, Y: Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to legionella pneumophila infection by nicotine. In: *Journal of immunology* 167 (2001), DEC 1, Nr. 11, S. 6518–6524. – ISSN 0022-1767
- MCARDLE, JJ: Molecular aspects of the trophic influence of nerve on muscle. In: *Progress in Neurobiology* 21 (1983), Nr. 3, S. 135 – 198. – ISSN 0301-0082
- MEESEN, RLJ ; DENDALE, P ; CUYPERS, K ; BERGER, J ; HERMANS, A ; THIJS, H ; LEVIN, O: Neuromuscular electrical stimulation as a possible means to prevent muscle tissue wasting in artificially ventilated and sedated patients in the intensive care unit: A pilot study. In: *Neuromodulation* 13 (2010), OCT, Nr. 4, S. 315–321. – ISSN 1094-7159
- MISSIAS, AC ; CHU, GC ; KLOCKE, BJ ; SANES, JR ; MERLIE, JP: Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: Regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. In: *Developmental biology* 179 (1996), OCT 10, Nr. 1, S. 223–238. – ISSN 0012-1606
- MOZAFFAR, T ; HADDAD, F ; ZENG, M ; ZHANG, LY ; ADAMS, GR ; BALDWIN, KM: Molecular and cellular defects of skeletal muscle in an animal model of acute quadriplegic myopathy. In: *Muscle & Nerve* 35 (2007), JAN, Nr. 1, S. 55–65. – ISSN 0148-639X

- NANAS, S ; KRITIKOS, K ; ANGELOPOULOS, E ; SIAFAKA, A ; TSIKRIKI, S ; PORIAZI, M ; KANALOUPITI, D ; KONTOGEORGI, M ; PRATIKAKI, M ; ZERVAKIS, D ; ROUTSI, C ; ROUSSOS, C: Predisposing factors for critical illness polyneuromyopathy in a multidisciplinary intensive care unit. In: *acta neurologica scandinavica* 118 (2008), SEP, Nr. 3, S. 175–181. – ISSN 0001-6314
- NARIMATSU, E ; NIIYA, T ; KAWAMATA, M ; NAMIKI, A: Sepsis stage dependently and differentially attenuates the effects of nondepolarizing neuromuscular blockers on the rat diaphragm in vitro. In: *Anesthesia and analgesia* 100 (2005), MAR, Nr. 3, S. 823–829. – ISSN 0003-2999
- NEEDHAM, DM ; DINGLAS, VD ; BIENVENU, OJ ; COLANTUONI, E ; WOZNIAC, AW ; RICE, TW ; HOPKINS, RO ; NETWORK, NIH NHLBI A.: One year outcomes in patients with acute lung injury randomised to initial trophic or full enteral feeding: Prospective follow-up of EDEN randomised trial. In: *BMJ-British medical journal* 346 (2013), MAR 19. – ISSN 1756-1833
- NIIYA, T ; NARIMATSU, E ; NAMIKI, A: Acute late sepsis attenuates effects of a nondepolarizing neuromuscular blocker, rocuronium, by facilitation of endplate potential and enhancement of membrane excitability in vitro. In: *Anesthesiology* 105 (2006), NOV, Nr. 5, S. 968–975. – ISSN 0003-3022
- OCHALA, J ; GUSTAFSON, AM ; LLANO-DIEZ, M ; RENAUD, G ; LI, M ; AARE, S ; QAISAR, R ; BANDUSEELA, VC ; HEDSTROM, Y ; TANG, X ; DWORKIN, B ; FORD, GC ; NAIR, KS ; PERERA, S ; GAUTEL, M ; LARSSON, L: Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: Underlying mechanisms. In: *Journal of physiology-London* 589 (2011), APR 15, Nr. 8, S. 2007–2026. – ISSN 0022-3751
- OLINCY, A ; HARRIS, JG ; JOHNSON, LL ; PENDER, V ; KONGS, S ; ALLENSWORTH, D ; ELLIS, J ; ZERBE, GO ; LEONARD, S ; STEVENS, KE ; STEVENS, JO ; MARTIN, L ; ADLER, LE ; SOTI, F ; KEM, WR ; FREEDMAN, R: Proof-of-concept trial of an alpha 7 nicotinic agonist in schizophrenia. In: *Archives of general psychiatry* 63 (2006), JUN, Nr. 6, S. 630–638. – ISSN 0003-990X
- OSTA, WA ; EL-OSTA, MA ; PEZHMAN, EA ; RAAD, RA ; FERGUSON, K ; MCKELVEY, GM ; MARSH, HM ; WHITE, M ; PEROV, S: Nicotinic acetylcholine receptor gene expression is altered in burn patients. In: *Anesthesia and analgesia* 110 (2010), MAY, Nr. 5, S. 1355–1359. – ISSN 0003-2999
- PAPAZIAN, L ; FOREL, JM ; GACOIN, A ; PENOT-RAGON, C ; PERRIN, G ; LOUNDOU, A ; JABER, S ; ARNAL, JM ; PEREZ, D ; SEGHBAYAN, JM ; CONSTANTIN, JM ; COURANT, P ; LEFRANT, JY ; GUERIN, C ; PRAT, G ; MORANGE, S ; ROCH, A ; INVESTIGATORS, ACURASYS S.: Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. In: *New england journal of medicine* 363 (2010), SEP 16, Nr. 12, S. 1107–1116. – ISSN 0028-4793
- PETERSEN, AMW ; PEDERSEN, BK: The anti-inflammatory effect of exercise. In: *Journal of applied physiology* 98 (2005), APR, Nr. 4, S. 1154–1162. – ISSN 8750-7587

- PHILLIPS, SM ; GLOVER, EI ; RENNIE, MJ: Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. In: *Journal of applied physiology* 107 (2009), SEP, Nr. 3, S. 645–654. – ISSN 8750-7587
- POWERS, SK ; KAVAZIS, AN ; MCCLUNG, JM: Oxidative stress and disuse muscle atrophy. In: *Journal of applied physiology* 102 (2007), JUN, Nr. 6, S. 2389–2397. – ISSN 8750-7587
- RAHMAN, A ; WILUND, K ; FITSCHEN, PJ ; JEEJEEBHOY, K ; AGARWALA, R ; DROVER, JW ; MOURTZAKIS, M: Elderly persons with ICU-acquired weakness: The potential role for beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation? In: *Journal of parenteral and enteral nutrition* 38 (2014), JUL, Nr. 5, S. 567–575. – ISSN 0148-6071
- REID, MB ; LANNERGREN, J ; WESTERBLAD, H: Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor-alpha - Involvement of muscle myofilaments. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 166 (2002), AUG 15, Nr. 4, S. 479–484. – ISSN 1073-449X
- RENAUD, G ; LLANO-DIEZ, M ; RAVARA, B ; GORZA, L ; FENG, HZ ; JIN, JP ; CACCIANI, N ; GUSTAFSON, AM ; OCHALA, J ; CORPENO, R ; LI, M ; HEDSTROM, Y ; FORD, GC ; NAIR, KS ; LARSSON, L: Sparing of muscle mass and function by passive loading in an experimental intensive care unit model. In: *Journal of physiology-London* 591 (2013), MAR, Nr. 5, S. 1385–1402. – ISSN 0022-3751
- RICH, MM ; PINTER, MJ ; KRANER, SD ; BARCHI, RL: Loss of electrical excitability in an animal model of acute quadriplegic myopathy. In: *Annals of neurology* 43 (1998), FEB, Nr. 2, S. 171–179. – ISSN 0364-5134
- RIVERO-GUTIERREZ, B ; ANZOLA, A ; MARTINEZ-AUGUSTIN, O ; MEDINA, FS de: Stain-free detection as loading control alternative to ponceau and housekeeping protein immunodetection in western blotting. In: *Analytical biochemistry* 467 (2014), DEC 15, S. 1–3. – ISSN 0003-2697
- ROSSIGNOL, B ; GUERET, G ; PENNEC, JP ; MOREL, J ; RANNOU, F ; GIROUX-METGES, MA ; TALARMIN, H ; GILOUX, M ; ARVIEUX, CC: Effects of chronic sepsis on contractile properties of fast twitch muscle in an experimental model of critical illness neuromyopathy in the rat. In: *Critical care medicine* 36 (2008), JUN, Nr. 6, S. 1855–1863. – ISSN 0090-3493
- ROULEAU, G ; KARPATI, G ; CARPENTER, S ; SOZA, M ; PRESCOTT, S ; HOLLAND, P: Glucocorticoid excess induces preferential depletion of myosin in denervated skeletal muscle fibers. In: *Muscle & Nerve* 10 (1987), JUN, Nr. 5, S. 428–438. – ISSN 0148-639X
- ROUTSI, C ; GEROVASILI, V ; VASILEIADIS, I ; KARATZANOS, E ; PITSOLIS, T ; TRIPODAKI, E ; MARKAKI, V ; ZERVAKIS, D ; NANAS, S: Electrical muscle stimulation prevents critical illness polyneuropathy: A randomized parallel intervention trial. In: *Critical care* 14 (2010), Nr. 2. – ISSN 1466-609X
- SAEED, RW ; VARMA, S ; PENG-NEMEROFF, T ; SHERRY, B ; BALAKHANEH, D ; HUSTON, J ; TRACEY, KJ ; AL-ABED, Y ; METZ, CN: Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. In: *Journal of experimental medicine* 201 (2005), APR 4, Nr. 7, S. 1113–1123. – ISSN 0022-1007

- SCHALLER, SJ ; ANSTEY, M ; BLOBNER, M ; EDRICH, T ; GRABITZ, SD ; GRADWOHL-MATIS, I ; HEIM, M ; HOULE, T ; KURTH, T ; LATRONICO, N ; LEE, J ; MEYER, MJ ; PEONIS, T ; TALMOR, D ; VELMAHOS, GC ; WAAK, K ; WALZ, JM ; ZAFONTE, R ; EIKERMANN, M ; MOBILIZATION, Int Early SOMS-Guided: Early, goal-directed mobilisation in the surgical intensive care unit: A randomised controlled trial. In: *Lancet* 388 (2016), OCT 1, Nr. 10052, S. 1377–1388. – ISSN 0140-6736
- SCHALLER, SJ ; NAGASHIMA, M ; SCHÖNFELDER, M ; SASAKAWA, T ; SCHULZ, F ; KHAN, MAS ; KEM, WR ; SCHNEIDER, G ; SCHLEGEL, J ; LEWALD, H ; BLOBNER, M ; MARTYN, JAJ: GTS-21 attenuates loss of body mass, muscle mass, and function in rats having systemic inflammation with and without disuse atrophy. In: *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* (2018), JUL. – URL <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2180-6>. – ISSN 1432-2013
- SCHEFOLD, JC ; BIERBRAUER, J ; WEBER-CARSTENS, S: Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. In: *Journal of cachexia sarcopenia and muscle* 1 (2010), DEC, Nr. 2, S. 147–157. – ISSN 2190-5991
- SCHWEICKERT, WD ; POHLMAN, MC ; POHLMAN, A. ; NIGOS, C ; PAWLIK, AJ ; ESBROOK, CL ; SPEARS, L ; MILLER, M ; FRANCYK, M ; DEPRIZIO, D ; SCHMIDT, GA ; BOWMAN, A ; BARR, R ; MCCALLISTER, KE ; HALL, JB ; KRESS, JP: Early physical and occupational therapy in mechanically ventilated, critically ill patients: a randomised controlled trial. In: *Lancet* 373 (2009), MAY-JUN, Nr. 9678, S. 1874–1882. – ISSN 0140-6736
- SEGHELINI, E: Direct stimulation: a useful technique. In: *European Journal of anaesthesiology* 25 (2008), Nr. 42, S. 181–185. – Brain Annual Meeting, Brescia, ITALY, MAY 09-12, 2007. – ISSN 0265-0215
- SEGREDO, V ; CALDWELL, JE ; MATTHAY, MA ; SHARMA, ML ; GRUENKE, LD ; MILLER, RD: Persistent paralysis in critically ill patients after long-term administration of vecuronium. In: *New england journal of medicine* 327 (1992), AUG 20, Nr. 8, S. 524–528. – ISSN 0028-4793
- SEGUELA, P ; WADICHE, J ; DINELEYMILLER, K ; DANI, JA ; PATRICK, JW: Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. In: *Journal of neuroscience* 13 (1993), FEB, Nr. 2, S. 596–604. – ISSN 0270-6474
- STAEUBLE, CG ; HELMING, M ; MARTYN, JAJ ; BLOBNER, M ; FINK, H: Neuromuscular recovery is prolonged after immobilization or superimposition of inflammation with immobilization compared to inflammation alone: data from a preclinical model. In: *Critical care medicine* 44 (2016), NOV, Nr. 11, S. E1097–E1110. – ISSN 0090-3493
- STEVENS, RD ; DOWDY, DW ; MICHAELS, RK ; MENDEZ-TELLEZ, PA ; PRONOVOST, PJ ; NEEDHAM, DM: Neuromuscular dysfunction acquired in critical illness: A systematic review. In: *Intensive Care Medicine* 33 (2007), NOV 1, Nr. 11, S. 1876–1891. – URL <https://doi.org/10.1007/s00134-007-0772-2>. – ISSN 1432-1238

- TAKALA, J ; RUOKONEN, E ; WEBSTER, NR ; NIELSEN, MS ; ZANDSTRA, DF ; VUNDELINCKX, G ; HINDS, CJ ; LOPONEN, E ; RAUHALA, V ; HOVILEHTO, S ; KARLSSON, S ; KAIRI, P ; BELLAMY, MC ; SEPER, JM ; REYNAERT, M ; DIVE, AM ; DUGERNIER, T ; RYDVALL, A ; VERNERSSON, E ; GIBSON, F ; BOTFIELD, C: Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. In: *New england journal of medicine* 341 (1999), SEP 9, Nr. 11, S. 785–792. – ISSN 0028-4793
- TEENER, JW ; RICH, MM: Dysregulation of sodium channel gating in critical illness myopathy. In: *Journal of muscle research and cell motility* 27 (2006), MAY, Nr. 5-7, S. 291–296. – ISSN 0142-4319
- TENNILA, A ; SALMI, T ; PETTILA, V ; ROINE, RO ; VARPULA, T ; TAKKUNEN, O: Early signs of critical illness polyneuropathy in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. In: *Intensive care medicine* 26 (2000), SEP, Nr. 9, S. 1360–1363. – ISSN 0342-4642
- TIAN, ZL ; JIANG, SK ; ZHANG, M ; WANG, M ; LI, JY ; ZHAO, R ; WANG, LL ; LIU, M ; LI, SS ; ZHANG, MZ ; GUAN, DW: Alpha 7 nAChR is expressed in satellite cells at different myogenic status during skeletal muscle wound healing in rats. In: *Journal of molecular histology* 46 (2015), DEC, Nr. 6, S. 499–509. – ISSN 1567-2379
- TIAO, G ; HOBLER, S ; WANG, JJ ; MEYER, TA ; LUCHETTE, FA ; FISCHER, JE ; HASSELGREN, PO: Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. In: *Journal of clinical investigation* 99 (1997), JAN 15, Nr. 2, S. 163–168. – ISSN 0021-9738
- 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? In: *Anesthesiology* 91 (1999), AUG, Nr. 2, S. 448–460. – ISSN 0003-3022
- TSUNEKI, H ; SALAS, R ; DANI, JA: Mouse muscle denervation increases expression of an alpha 7 nicotinic receptor with unusual pharmacology. In: *Journal of physiology-London* 547 (2003), FEB 15, Nr. 1, S. 169–179. – ISSN 0022-3751
- VAN WESTERLOO, DJ ; GIEBELEN, IA ; FLORQUIN, S ; BRUNO, MJ ; LAROSA, GJ ; ULLOA, L ; TRACEY, KJ ; POLL, T Van der: The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. In: *Gastroenterology* 130 (2006), MAY, Nr. 6, S. 1822–1830. – ISSN 0016-5085
- WANG, H ; LIAO, H ; OCHANI, M ; JUSTINIANI, M ; LIN, XC ; YANG, LH ; AL-ABED, Y ; WANG, HC ; METZ, C ; MILLER, EJ ; TRACEY, KJ ; ULLOA, L: Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. In: *Nature medicine* 10 (2004), NOV, Nr. 11, S. 1216–1221. – ISSN 1078-8956
- WANG, H ; YU, M ; OCHANI, M ; AMELLA, CA ; TANOVIC, M ; SUSARLA, S ; LI, JH ; WANG, HC ; YANG, H ; ULLOA, L ; AL-ABED, Y ; CZURA, CJ ; TRACEY, KJ: Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation. In: *Nature* 421 (2003), JAN 23, Nr. 6921, S. 384–388. – ISSN 0028-0836

- WEBER-CARSTENS, S ; DEJA, M ; KOCH, S ; SPRANGER, J ; BUBSER, F ; WERNECKE, KD ; SPIES, CD ; SPULER, S ; KEH, D: Risk factors in critical illness myopathy during the early course of critical illness: A prospective observational study. In: *Critical care* 14 (2010), Nr. 3
- WEBER-CARSTENS, S ; KOCH, S ; SPULER, S ; SPIES, CD ; BUBSER, F ; WERNECKE, KD ; DEJA, M: Nonexcitable muscle membrane predicts intensive care unit-acquired paresis in mechanically ventilated, sedated patients. In: *Critical care medicine* 37 (2009), SEP, Nr. 9, S. 2632–2637. – ISSN 0090-3493
- WEBER-CARSTENS, S ; SCHNEIDER, J ; WOLLERSHEIM, T ; ASSMANN, A ; BIERBRAUER, J ; MARG, A ; AL HASANI, H ; CHADT, A ; WENZEL, K ; KOCH, S ; FIELITZ, J ; KLEBERS, C ; FAUST, K ; MAI, K ; SPIES, CD ; LUFT, FC ; BOSCHMANN, M ; SPRANGER, J ; SPULER, S: Critical illness myopathy and GLUT4 significance of insulin and muscle contraction. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 187 (2013), FEB 15, Nr. 4, S. 387–396. – ISSN 1073-449X
- WOLF, SE ; EDELMAN, LS ; KEMALYAN, N ; DONISON, L ; CROSS, J ; UNDERWOOD, M ; SPENCE, RJ ; NOPPENBERGER, D ; PALMIERI, TL ; GREENHALGH, DG ; LAWLESS, M ; VOIGT, D ; EDWARDS, P ; WARNER, P ; KAGAN, R ; HATFIELD, S ; JENG, J ; CREAN, D ; HUNT, J ; PURDUE, G ; BURRIS, A ; CAIRNS, B ; KESSLER, M ; KLEIN, RL ; BAKER, R ; YOWLER, C ; TUTULO, W ; FOSTER, K ; CARUSO, D ; HILDEBRAND, B ; BENJAMIN, W ; VILLARREAL, C ; SANFORD, AP ; SAFFLE, J: Effects of oxandrolone on outcome measures in the severely burned: A multicenter prospective randomized double-blind trial. In: *Journal of burn care & Research* 27 (2006), MAR-APR, Nr. 2, S. 131–139. – 36th Annual Meeting of the American-Burn-Association, Vancouver, CANADA, MAR 24-27, 2004. – ISSN 1559-047X
- WOLLERSHEIM, T ; WOEHLECKE, J ; KREBS, M ; HAMATI, J ; LODKA, D ; LUTHER-SCHROEDER, A ; LANGHANS, C ; HAAS, K ; RADTKE, T ; KLEBER, C ; SPIES, C ; LABEIT, S ; SCHUELKE, M ; SPULER, S ; SPRANGER, J ; WEBER-CARSTENS, S ; FIELITZ, J: Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness. In: *Intensive care medicine* 40 (2014), APR, Nr. 4, S. 528–538. – ISSN 0342-4642
- XIE, F ; MIN, S ; LIU, L ; PENG, L ; HAO, X ; ZHU, X: Advanced age enhances the sepsis-induced up-regulation of the gamma- and alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors in different parts of the skeletal muscles. In: *archives of gerontology and geriatrics* 65 (2016), JUL-AUG, S. 1–8. – ISSN 0167-4943
- Z'GRAGGEN, WJ ; LIN, CSY ; HOWARD, RS ; BEALE, RJ ; BOSTOCK, H: Nerve excitability changes in critical illness polyneuropathy. In: *Brain* 129 (2006), SEP, S. 2461–2470. – ISSN 0006-8950
- ZIFKO, UA ; ZIPKO, HT ; BOLTON, CF: Clinical and electrophysiological findings in critical illness polyneuropathy. In: *Journal of the neurological sciences* 159 (1998), AUG 14, Nr. 2, S. 186–193. – ISSN 0022-510X
- ZINK, W ; KAESS, M ; HOFER, S ; PLACHKY, J ; ZAUSIG, YA ; SINNER, B ; WEIGAND, MA ; FINK, RHA ; GRAF, BM: Alterations in intracellular Ca²⁺-homeostasis of skeletal muscle fibers during sepsis. In: *Critical care medicine* 36 (2008), MAY, Nr. 5, S. 1559–1563. – ISSN 0090-3493

ZINK, W ; KOLLMAR, R ; SCHWAB, S: Critical illness polyneuropathy and myopathy in the intensive care unit.

In: *Nature reviews neurology* 5 (2009), JUL, Nr. 7, S. 372–379. – ISSN 1759-4758

ZOCHODNE, DW ; BOLTON, CF ; WELLS, GA ; GILBERT, JJ ; HAHN, AF ; BROWN, JD ; SIBBALD, WA: Critical

illness polyneuropathy - A complication of sepsis and multiple organ failure. In: *Brain* 110 (1987), AUG,

Nr. 4, S. 819–842. – ISSN 0006-8950