

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. W. Böttiger

In-vitro-Metabolisierung von  
Mivacurium durch Seren mit normaler und  
atypischer Pseudocholinesterase-Aktivität

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Sarah Breuckmann  
aus Solingen

promoviert am 18. März 2015



Dekan:                      Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter:      Prof. Dr. med. H. Gerlach

2. Berichterstatter:      Universitätsprofessor Dr. med. U. Fuhr

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. med. M. Theisohn

Prof. Dr. H. Gerlach

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters / einer Promotionsberaterin in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 9. September 2014

Sarah Breuckmann



Die dieser Arbeit zugrundeliegenden HPLC-Serumanalysen und die daraus resultierenden Ergebnisse sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. med. Martin Theisoohn von mir selbst im Institut für Pharmakologie durchgeführt und ermittelt worden.

Die Bestimmung der Dibucainzahlen und der Pseudocholinesterase-Aktivitäten wurden von Herrn Dr. Raimondo Laubinger ausgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Seren entstammen entweder dem durch Herrn Dr. Raimondo Laubinger gewonnenen Pool der 3217 auf das Vorliegen atypischer Pseudocholinesterasen gescreenten Blutspendern der Universität Köln oder wurden Patienten entnommen, die im Rahmen von Intubationsnarkosen in der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität zu Köln auffällig geworden waren; in beiden Fällen war das schriftliche Einverständnis der Patienten für die Untersuchung ihrer Seren eingeholt worden.



## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Ulf Börner † bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und seine besondere Präsenz und Art, die Rolle des Doktorvaters auszufüllen; bei Herrn Prof. Dr. med. Herwig Gerlach für das bereitwillige Entgegenkommen, diese Arbeit nach Herrn Prof. Börners plötzlichem Tod weiter zu betreuen und seine besondere Unterstützung bei der statistischen Aufbereitung der Untersuchungsergebnisse.

Insbesondere bedanke ich mich bei:

Herrn Dr. med. Martin Theisohn, der stets geduldig und hilfsbereit mit umfangreicher fachlicher Kompetenz und Ruhe Unterstützung bot, wann immer sich Fragen oder Probleme ergaben – auch über die Emeritierung hinaus.

Den Mitarbeitern des klinisch-pharmakologischen Labors des Instituts für Pharmakologie der Universität zu Köln: Dr. med. Gerhard Josef, Herrn Ahmad Arbab und Herrn G. Kalabis, die mir jederzeit gerne mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie den anderen Doktoranden des Instituts für konstruktiv-kollegiale Gespräche und Unterstützung in praktischen Fragen.

Meinen Eltern und meinen Freunden für ihre Geduld in der langen Zeit der Fertigstellung – besonders bedanke ich mich bei Dr. med. Hendrikje Lukoschus, Frau Susanne Heide, Dr. med. Sabine Presser, Dr. phil. Friedrich G. Zuther und Herrn Florentin Fiedler für wegweisende Gedanken und hilfreiche Unterstützung. Privatdozent Dr. med. Carsten Müller und Dr. med. Raimondo Laubinger danke ich für ihr bereitwilliges fachlich-inhaltliches Lektorat.



*Gewidmet Prof. Dr. Ulf Börner †*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Geschichte und Stellenwert der Muskelrelaxantien	3
1.2	Mivacurium	4
1.2.1	Verhalten im Organismus	4
1.2.2	Therapeutische Eigenschaften von Mivacurium	7
1.3	Pseudocholinesterasen (PChE)	8
1.3.1	Vorkommen und Charakterisierung	8
1.3.2	Genetische Varianten der Pseudocholinesterase	10
1.4	Fragestellung	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Substanzen, Geräte, Lösungen und Seren	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Geräte	13
2.1.3	Lösungen	14
2.1.4	Seren	15
2.2	Versuchsaufbau und Probengewinnung	16
2.2.1	Einsatz von Serum mit normaler Pseudocholinesterase	16
2.2.2	Einsatz von Seren mit atypischer Pseudocholinesterase	17
2.2.3	Aufbereitung der Proben	17
2.2.4	Interner Standard und Standardproben	17
2.3	Analysedaten	18
2.3.1	HPLC: Zubehör und Bedingungen	18
2.3.2	Validierung des Analyseverfahrens	20
2.4	Archivierung der Daten	23
2.5	Auswertung mit TOPFIT	23
2.6	Darstellung und statistische Auswertung	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	Normalserum	25
3.1.1	Mivacurium und seine Isomere	25
3.1.2	Metabolite	28
3.1.3	Temperaturabhängigkeit	32
3.2	Atypische Seren	37
3.2.1	Homozygote Seren	37
3.2.2	Heterozygote Seren	39
3.2.3	Gegenüberstellung: Atypische Seren vs. Normalserum	46
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1	Methodik	50
4.1.1	Seren	50
4.1.2	Analytik	51

4.2	Ergebnisse .....	52
4.2.1	Normalserum.....	52
4.2.2	Atypische Seren .....	60
4.3	Limitierung .....	64
4.4	Klinische Relevanz und Ausblick.....	65
4.4.1	Konsequenz im klinischen Alltag.....	65
4.4.2	Ausblick.....	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>81</b>
8.1	Diagramme zur Linearität.....	81
8.2	Tabellen zur Intra-Assay-Variabilität .....	85
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	88
8.4	Tabellenverzeichnis .....	90
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>93</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte und Stellenwert der Muskelrelaxantien

Muskelrelaxantien gehören seit der klinischen Einführung des Benzylisochinolins d-Tubocurarin durch Griffith und Johnson 1942 zum medizinischen Operationsalltag. Ihre anästhesiologisch-chirurgische Bedeutung liegt in ihrer Fähigkeit, eine reversible Muskelerschaffung der quergestreiften Skelettmuskulatur herbeizuführen, die die Intubation sowie bestimmte Operationen erleichtert bzw. erst ermöglicht. Der Einsatz von Muskelrelaxantien erlaubte eine Reduktion des nebenwirkungsreichen Anästhetikabedarfs und somit eine erhebliche Senkung der anästhesiebedingten Morbidität und Mortalität [2].

Die Suche nach neuen muskelrelaxierenden Verbindungen führte 1949 zur Entwicklung von Succinyl(di)cholin, dem einzigen klinisch genutzten Vertreter der Klasse der depolarisierenden Muskelrelaxantien. In der Folge galt es, kurzwirksame und gut steuerbare Substanzen ohne Kumulationseffekt zu finden; die Substanzen sollten eine schnelle Erholung der neuromuskulären Funktion nach Operationsende ermöglichen. Die Entwicklungsversuche konzentrierte sich somit auf Substanzen, die entweder einer direkten chemischen Inaktivierung unterliegen oder aber deren Clearance durch rasche Verteilung und Biotransformation gesteigert werden kann. Damit verbunden war die Suche nach einem nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans, das das nebenwirkungsbehaftete Succinylcholin ersetzen kann.

Mit dem Steroidabkömmling Pancuronium wurde 1967 die zweite bis heute gebräuchliche Gruppe nichtdepolarisierender Muskelrelaxantien in die Klinik eingeführt [5].

Die Entdeckung der quaternären Ammoniumverbindung Petalin (1-Benzyltetrahydroisochinolon) als wichtige Komponente der Pflanze *Leontice leonpetalum* und die Beobachtung ihres als Hofmann-Zerfall bezeichneten Abbaus regten schließlich zur Synthese von Atracurium an. Atracurium wurde 1980 in die klinische Anwendung eingeführt [83].

## 1.2 Mivacurium

Aus der Forschung mit dem molekularen Benzylisoquinolin-Grundgerüst von Atracurium ging das kürzer wirkende Relaxans Mivacurium hervor, das in Deutschland 1995/96 [25] in den klinischen Gebrauch eingeführt wurde. Mivacurium war nicht die gesuchte nicht-depolarisierende Substanz, die Succinylcholin komplett ersetzen konnte, schloss aber die pharmakologische Lücke zwischen Succinylcholin und den mittellang wirkenden Substanzen Atracurium, Vecuronium und Rocuronium.

Abbildung 1: Strukturformel Mivacurium (eigene Darstellung)

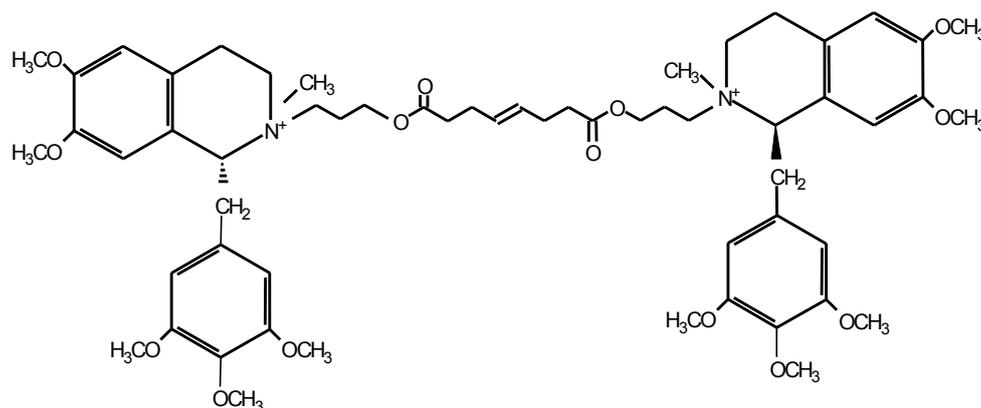


Tabelle 1: Mivacurium – chemische Daten

Handelsname:	Mivacron® GlaxoSmithKline
Chemischer Name:	(R-(R*,R*-(E))-2,2'-((1,8-dioxo-4-octen-1,8-diyl)bis(oxy-3,1-propan-diyl))bis(1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-methyl-1-((3,4,5-trimethoxyphenyl)methyl)isoquinolindichlorid
Summenformel:	C <sub>58</sub> H <sub>80</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>
Molmasse:	1100,18 g/Mol

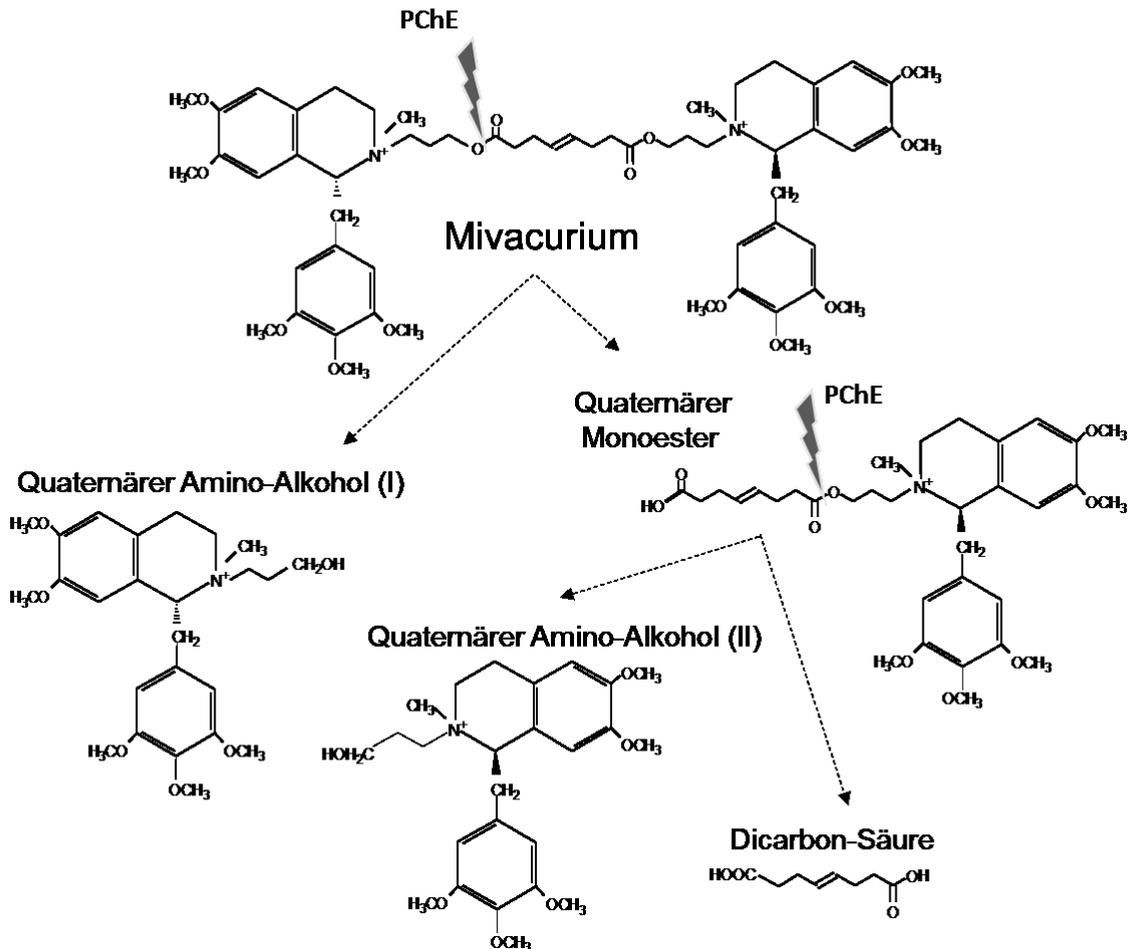
### 1.2.1 Verhalten im Organismus

#### 1.2.1.1 Metabolisierung

Mivacurium wird, ebenso wie Succinylcholin, fast ausschließlich über Pseudocholines-terasen im Plasma abgebaut und unterliegt somit dem Weg der direkten chemischen Inaktivierung durch enzymatische Hydrolyse: Unter Aufnahme von Wasser wird das Substrat in seine Metabolite aufgetrennt. Dabei entstehen aus einem Mol Mivacurium je ein Mol (quaternärer) Säure-Monoester und ein Mol (quaternärer) Amino-Alkohol, insgesamt also zwei Mol Metabolite. In einem zweiten, langsameren Schritt [59], wird der

Säure-Monoester unter Abspaltung einer Dicarbonsäure ebenfalls zu einem Amino-Alkohol abgebaut (s. Abbildung 2). Die Metabolite haben keine klinisch relevante neuromuskuläre, autonome oder kardiovaskuläre Wirkung [24] und werden über Urin [28] und Galle ausgeschieden [30].

Abbildung 2: Modell der Metabolisierung von Mivacurium (eigene Darstellung) – der Angriff der Pseudocholinesterase (PChE) erfolgt zweizeitig an den beiden Esterbindungen



Mivacurium liegt als Strukturisomer in drei möglichen Konfigurationen vor: cis-cis (M-cc, cc), cis-trans (M-ct, ct) und trans-trans (M-tt, tt). Die Massenanteile der drei Isomere werden, je nach Autor, unterschiedlich angegeben: tt-Mivacurium 52-60%, ct-Mivacurium 34-40%, cc-Mivacurium 4-8% [16, 39, 60].

Ebenso wie das Substrat unterliegen auch die Metabolite einer Isomerie, sodass bei der Hydrolyse von Mivacurium insgesamt vier verschiedene Abbauprodukte entstehen können: der Säure-Metabolit kann als cis-Säure (c-S, cS, cis-Sre) oder als trans-Säure (t-S,

tS, trans-Sre) vorliegen, der Alkohol-Metabolit als cis-Alkohol (c-A, cA, cis-Alk) oder trans-Alkohol (t-A, tA, trans-Alk).

### 1.2.1.2 Pharmakokinetik

Die untenstehende Übersicht über die Plasmahalbwertszeit, das Verteilungsvolumen und die Clearance der drei Mivacurium-Isomere *in vivo* [40, 56, 60] zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen dem ct- und dem tt-Isomer auf der einen und dem cc-Isomer auf der anderen Seite: Erstere zeichnen sich durch sehr kurze Plasmahalbwertszeiten um zwei Minuten sowie eine hohe Eliminationsrate aus, während Clearance und Halbwertszeit des letzteren mit denen der mittellang wirkenden Muskelrelaxantien Atracurium und Vecuronium [21, 27] vergleichbar sind (Tabelle 2).

Tabelle 2: Pharmakokinetische Parameter der drei Isomere von Mivacurium im Literaturvergleich; Cl = Clearance,  $T_{1/2}$  = Plasmahalbwertszeit, Vd = Verteilungsvolumen

Isomere	Cl (ml/kg x min)	$T_{1/2}$ (min)	Vd (ml/kg)	Quelle
cis-trans	106	1.8	290	[60]
	106	2.0	278	[40]
	46	2.0	54	[56]
trans-trans	63	1.9	150	[60]
	57	2.3	211	[40]
	29	2.4	47	[56]
cis-cis	4.6	52	340	[60]
	3.8	68	227	[40]
	7.0	29	189	[56]

Das Mivacurium-Racemat besteht zu rund 95% aus den ct- und tt-Isomeren, die über eine deutlich höhere neuromuskulär blockierende Potenz verfügen als das nur etwa 5% der Substanz ausmachende cc-Isomer [92]. Daher geht man nach den bisher vorliegenden Erkenntnissen davon aus, dass das cc-Isomer keinen klinisch relevanten Anteil an den neuromuskulär blockierenden Eigenschaften von Mivacurium hat [60, 65].

Setzt man die Clearance der drei Mivacurium-Isomere ins Verhältnis zur Aktivität der Plasmacholinesterase, so ergibt sich eine signifikante Korrelation sowohl für tt-Mivacurium als auch für ct-Mivacurium, nicht jedoch für das cc-Isomer [60]. Möglicherweise liegt die Erklärung dafür in der stereochemischen Enzymspezifität der Plasmacholinesterase: Viele Enzyme zeigen eine stereochemische Spezifität, indem sie nur Molekülformen einer bestimmten Chiralität oder Stereoisomerie angreifen [36].

## 1.2.2 Therapeutische Eigenschaften von Mivacurium

### 1.2.2.1 Pharmakodynamik: Indikation, Dosierung und Wirksamkeit

Wie auch andere peripher angreifende, nicht-depolarisierende Muskelrelaxantien wird Mivacurium hauptsächlich im Rahmen der Kombinationsnarkose eingesetzt, einhergehend mit Intubation und künstlicher Beatmung.

Zur Intubation werden 0,2 mg/kg Körpergewicht Mivacurium appliziert, die innerhalb von 2,5 Minuten zu einer vollständigen Muskelrelaxierung führen, beginnend bei den kleinen Muskeln der Zunge, Augen und Finger über die Muskeln des Stammskeletts bis hin zur Intercostal- und Zwerchfellmuskulatur [1, 41].

Die Wirkdauer, die sich u.a. beschreiben lässt durch die Zeit zwischen 5% und 95% der neuromuskulären Blockade, beträgt für Mivacurium im Mittel 14 Minuten – unabhängig von der Dosierung und auch nach kontinuierlicher Applikation mittels Infusion [90]. Im Vergleich mit Succinylcholin (1mg/kg Körpergewicht) hält die muskuläre Blockade von Mivacurium (0,2 mg/kg Körpergewicht) somit etwa doppelt so lange an [64]; die *in-vitro*-Hydrolyse von Mivacurium beträgt 88% derer von Succinylcholin [90].

### 1.2.2.2 Unerwünschte Wirkungen, Interaktionen und Kontraindikationen

Bisher sind keine kardiovaskulären Nebenwirkungen bei Einsatz von Mivacurium in klinisch üblicher Dosierung beschrieben worden, die auf eine Blockade von Acetylcholinrezeptoren des autonomen Nervensystems schließen lassen [65]. Hämodynamisch relevant aber ist unter Umständen die Mivacurium-induzierte Histaminausschüttung insbesondere bei rascher Injektion und hoher Dosierung des Relaxans [15, 64, 66, 91].

Wie alle nichtdepolarisierenden Muskelrelaxantien wird auch Mivacurium durch halogenierte Inhalationsanästhetika im Sinne einer Verstärkung der Wirkdauer und Intensität der neuromuskulären Blockade beeinflusst [62, 84]. Die Kombination von Mivacurium mit anderen – insbesondere steroidalen – nichtdepolarisierenden Muskelrelaxantien führt zu einer Wirkungsverlängerung von Mivacurium und damit zum Verlust seines eigentlichen Wirkprofils [47, 71, 74].

Wie unter anderem die Untersuchungen von Head-Rapson [40] an nierengesunden, nierensuffizienten und dialysepflichtigen Patienten zeigen konnten, hat eine eingeschränkte Nierenfunktion keinen Einfluss auf die Erholungszeiten und damit die Dauer

der neuromuskulären Relaxation durch Mivacurium. Im Gegensatz dazu muss bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion mit einer bis auf das Dreifache verlängerten muskelrelaxierenden Wirkung von Mivacurium gerechnet werden: Sie spiegelt die reduzierte Cholinesterase-Synthese der Leber wider [20, 39].

Als Kontraindikation für die Verwendung von Mivacurium (ebenso wie von Succinylcholin) gilt das bekannte Vorliegen einer atypischen Pseudocholinesterase. Nach einer Studie von Østergaard [79] ist bei Patienten mit heterozygot-atypischer Pseudocholinesterase mit einer Verlängerung der neuromuskulären Blockadezeit von Mivacurium um 30% bis 50% zu rechnen; bei Patienten mit homozygot atypischer Pseudocholinesterase waren die Erholungszeiten auch nach sehr geringen Mivacurium-Dosen sehr stark verlängert.

## **1.3 Pseudocholinesterasen (PChE)**

### **1.3.1 Vorkommen und Charakterisierung**

Pseudocholinesterase (PChE) bezeichnet eine in der Leber synthetisierte Gruppe miteinander verwandter Enzyme (Synonyme: Plasmacholinesterase, Cholinesterase, Butyrylcholinesterase), die bevorzugt Esterverbindungen des Cholins oder des Thiocholins hydrolytisch spalten [68, 97]. Cholinesterasen finden sich in fast jedem Gewebe des menschlichen Körpers mit Ausnahme der Erythrozyten und liegen als aus vier identischen Peptidketten bestehendes tetrameres Glykoprotein vor [61].

Von dieser Enzymgruppe unterscheidet sich die („echte“) Acetylcholinesterase einerseits durch ihre besondere Affinität zu dem Substrat Acetylcholin [68], andererseits durch ihre Unfähigkeit, sowohl Succinylcholin als auch Mivacurium zu spalten [3, 88]. Die wichtigste Aufgabe der nur im synaptischen Spalt vorkommenden spezifischen Acetylcholinesterase ist der enzymatische Abbau des Überträgerstoffes Acetylcholin.

Die physiologische Funktion der Enzymgruppe der Pseudocholinesterasen dagegen ist bisher nicht klar und abschließend beschrieben, jedoch ist bekannt, dass sie bei einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen eine Rolle spielt. Dazu gehören Aufgaben im Bereich des Fettstoffwechsels [18, 52], regulative Aufgaben bei ionalen transmembranösen Prozessen und eine Protektion der Acetylcholinesterase [69]. In Bezug auf das zentrale Nervensystem wird eine Rolle im Abbau von cholinergen Überträgerstoffen diskutiert [33].

Sicher ist, dass Pseudocholinesterasen für den Abbau einer Reihe von Medikamenten verantwortlich sind, wozu unter anderem Aspirin, Heroin, Lokalanästhetika vom Estertyp und die Muskelrelaxantien Succinylcholin und Mivacuriumchlorid gehören [78, 99].

Die normale Aktivität der Pseudocholinesterase bewegt sich, je nach Labor und Referenzwert, zwischen 3500-8500 U/L [48, 58]. Eine physiologische Erniedrigung der PChE-Aktivität beobachtet man während der Schwangerschaft und in den ersten sechs Lebensmonaten [22, 38, 104].

Zu einer Verringerung der Enzymaktivität kann es bei diversen Erkrankungen, wie z.B. progressiver Muskeldystrophie, kongenitalen Myotonien, Colitis ulcerosa und bei Lebererkrankungen kommen: die Pseudocholinesterase ist ein sensibler Marker für die Syntheseleistung der Leber. Auch maligne Systemerkrankungen, schwere Infektionskrankheiten und postoperative Zustände gehen mit einer Verminderung der Aktivität der Pseudocholinesterase einher [58].

Toxische und medikamentöse Einflüsse können ebenfalls die PChE-Aktivität negativ beeinflussen. Neben Cyclophosphamid [49], das als Zytostatikum Anwendung findet, Bamberol [6, 12], Antidepressiva [72], Metoclopramid [46] und Inhaltsstoffen von Nachtschattengewächsen [51] sind auch für die Anästhesie relevante Medikamente wie die indirekten Parasympathomimetika Pyridostigmin [96], Physostigmin, Neostigmin [86, 95] und Prostigmin zu nennen. Dieser Substanzklasse verwandte Stoffe, sogenannte Alkylphosphate (z.B. E 605 = Parathion), finden in der Landwirtschaft als Pflanzenschutzmittel Verwendung und führen zu einer stark verminderten Enzymaktivität der Pseudocholinesterase ebenso wie der spezifischen Acetylcholinesterase [77, 93].

Zu einer Reduzierung der PChE-Aktivität kommt es ebenfalls unter den Bedingungen eines cardiopulmonalen Bypasses, am ehesten aufgrund von Verdünnungsphänomenen [23, 89].

### 1.3.2 Genetische Varianten der Pseudocholinesterase

1951 wurden erstmals Fälle von unerwarteter postoperativer Apnoe bekannt [26], die im Zusammenhang standen mit der Verabreichung des Muskelrelaxans Succinylcholin. Bei den meisten der betroffenen Patienten ließ sich der Relaxansüberhang durch eine verminderte PChE-Aktivität im Rahmen einer hepatischen Insuffizienz erklären. Einige der Patienten allerdings zeigten zwar eine Aktivitätsminderung der Pseudocholinesterase, wiesen darüber hinaus aber keine Anzeichen einer Lebererkrankung auf [13, 26].

Dieser Sachverhalt war Ausgangspunkt für zahlreiche klinische Studien, in deren Verlauf sich die Existenz von Varianten der Pseudocholinesterase nachweisen ließ, die eine verminderte Aktivität und eine verminderte Substrataffinität zu Succinylcholin aufwiesen.

Eine erste biochemische Methode zur Detektion solcher Varianten entwickelte Kalow 1957 durch den Einsatz des Cholinesterase-Hemmstoffes Dibucain: Die Aktivität einer normalen Pseudocholinesterase ließ sich fast vollständig durch Dibucain hemmen, während die Aktivität der atypischen (= Dibucain-resistenten) Varianten der Pseudocholinesterase nur zu einem deutlich geringeren Prozentsatz hemmbar war [45]. Die Dibucainzahl errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Dibucainzahl} = 100 - [(\text{Aktivität gehemmt} \times 100) / \text{Aktivität ungehemmt}]$$

Dabei liegt nach Kalow [45] bei einer Dibucainzahl von 70-90 eine normale Pseudocholinesterase vor, während eine Dibucainzahl von 40-70 eine heterozygot-atypische Pseudocholinesterase beschreibt; homozygot-atypische Pseudocholinesterasen lassen sich kaum durch Dibucain hemmen und weisen daher Dibucainzahlen zwischen 0 und 20 auf. In der Folge erwiesen sich noch weitere PChE-Hemmstoffe – z.B. Natrium-Fluorid [14, 37] sowie die Carbamate Ro2-0683 [98] und Bambuterol [6, 50]) – einzeln oder in Kombination, geeignet, genetisch alterierte Enzymkonfigurationen nachzuweisen [44].

Genetische Studien der 80er Jahre führten zunächst zur Auffindung des die Pseudocholinesterase codierenden Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 3 in der Region q21-q26 [94]. Seit 1987 ist die komplette Aminosäuresequenz der menschlichen Pseudocholinesterase bekannt und veröffentlicht [61]; 1991 ließ sich der codierende Genort noch weiter auf ein einziges autosomales Gen eingrenzen [4]. Diese Erkenntnisse ermöglichten in der Folge die genetische Unterscheidung und Klassifizierung der PChE-Varianten, von denen inzwischen 65 namentlich benannt sind [70].

Eine Übersicht über die wichtigsten bekannten Varianten der Pseudocholinesterase, ihre Häufigkeit und das Ausmaß der Reduktion ihrer Plasma-Aktivität sowie ihre Succinylcholin-Sensibilität gibt unten stehende Tabelle 3.

Tabelle 3: häufigste genetische PChE-Varianten, ihre Bezeichnung und klinische Eigenschaften; [58] nach [53]

Bezeichnung	Häufigkeit	Aktivität	Succinyl-Empfindlichkeit
USUAL = U	0,98	normal	normal
ATYPICAL = A	0,02	-70%	homozygote sehr
SILENT = S	0,0003	Keine	homozygote extrem
FLUORID = F	0,003	-60%	nur homozygote
H-TYP	unbestimmt	-90%	homozygote extrem
K-TYP	0,13	-33%	nur homozygote
J-TYP	unbestimmt	-66%	homozygote mäßig

## 1.4 Fragestellung

Nach der klinischen Einführung von Mivacurium kam es, ebenso wie schon früher unter Einsatz von Succinylcholin, zu Fällen von prolongierter neuromuskulärer Blockade im Zusammenhang mit seiner Verabreichung [10, 34, 57, 63, 85, 103]. In einigen dieser Fälle konnte im Nachhinein das Vorliegen atypischer Pseudocholinesterase nachgewiesen werden.

Zur *in-vivo*-Metabolisierung von Mivacurium sowohl durch Normalserum [39, 40] als auch durch Seren mit atypischen PChE-Merkmalen liegen inzwischen zahlreiche Studien vor [7, 17, 80-82].

Die *in-vitro*-Metabolisierung von Mivacurium, insbesondere durch Seren mit atypischen Pseudocholinesterasen hingegen ist bislang noch wenig untersucht, ebenso wenig wie die *in-vitro*-Metabolisierung unter Hypothermie. Darüber hinaus gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse, auf welchem Mechanismus die herabgesetzte Fähigkeit zur Metabolisierung der atypischen Pseudocholinesterase in Bezug auf das Substrat Mivacurium beruht.

Es ergaben sich daher folgende Fragestellungen, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollen:

1. Nach welchem Muster wird Mivacurium *in-vitro* durch Normalserum abgebaut? Gibt es im Vergleich zu den bekannten Ergebnissen klinischer Studien auch *in-vitro* ein bevorzugt abgebautes Stereoisomer?
2. Wird Mivacurium durch atypische Pseudocholinesterase enthaltende Seren auch *in-vitro* langsamer umgesetzt, und lassen sich dabei Unterschiede zwischen homo- und heterozygoten Seren beobachten?
3. Werden bestimmte Mivacurium-Isomere *in-vitro* von atypischen Pseudocholinesterasen bevorzugt abgebaut, und unterscheidet sich das Muster der dabei entstehenden Metabolit-Isomere von dem bei Einsatz von Normalserum? Liegt möglicherweise darin der Grund für die klinisch längere Wirkdauer von Mivacurium in Patienten mit atypischen Pseudocholinesterasen?
4. Wie wirkt sich die Absenkung der Metabolisierungstemperatur auf den enzymatischen Abbau von Mivacurium *in-vitro* aus?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Substanzen, Geräte, Lösungen und Seren

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 4: Bezeichnung, chemische Formeln und Herkunft der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Formel	Bezug
Mivacuriumchlorid (Mivacron®)	$C_{58}H_{80}C_{12}N_2O_{14} \times 2 Cl$	alle Substanzen lagen als Racemate vor und wurden über die Fa. GlaxoWellcome bezogen
Quarternärer Säureester-Metabolit des Mivacurium	$C_{33}H_{46}NO_9 \times Cl$	
Quarternärer Alkohol-Metabolit des Mivacurium	$C_{25}H_{36}NO_6 \times Cl$	
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	$C_7H_7FO_2S$	Fa. Sigma
Natriumchlorid (p.a.)	NaCl	alle Substanzen Fa. Merck
Kaliumchlorid (p.a.)	KCl	
Di-Natriumhydrogenphosphat (p.a.)	$Na_2HPO_4$	
Kaliumdihydrogenphosphat (p.a.)	$KH_2PO_4$	
Pseudocholinesterase (PChE) aus Pferdeserum		(CH-Nr. 125 H 7035), Fa. Sigma
Pseudocholinesterase (PChE) aus Humanplasma		(CH-Nr. 84213420-23), Fa. Boehringer
d-Tubocurarin	$C_{37}H_{42}Cl_2N_2O_6$	Fa. ICN
Konzentrierte Schwefelsäure p.a. (18 M)	$H_2SO_4$	Fa. Merck
Dinatriumsulfat wasserfrei	$Na_2SO_4$	Fa. Merck
Ethanol (p.a.)	$C_2H_5OH$	Fa. Merck
Acetonitril (für HPLC)	$C_2H_3N$	Fa. Riedel-de Haën

#### 2.1.2 Geräte

Tabelle 5: Bezeichnung und Herstellernamen der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge Minifuge 2	Fa. Heraeus Christ
Kryothermostat, bestehend aus: Kühlelement Einhängethermostat MP	Fa. Colora Fa. Julabo
Vortex-Schüttler	Fa. Bender und Hohbein
Eppendorf-Zentrifuge 5402	Fa. Eppendorf
Gefriertrockner Hetovac	Fa. Heto

## 2.1.3 Lösungen

### 2.1.3.1 Stammlösungen des Mivacurium und seiner Metabolite

Entsprechend der folgenden Molgewichte wurde von jeder Substanz eine 1 mM Stammlösung hergestellt:

Mivacurium	M = 1100,18 g/mol
Alkoholmetabolit	M = 482,02 g/mol
Säuremetabolit	M = 636,18 g/mol

### 2.1.3.2 PMSF-Lösung

Als pluripotenter Proteasenantagonist kam Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; M: 174,19 g/mol) als Hemmstoff der Pseudocholinesterase in Form einer 100 mM Stammlösung (Lösungsmittel: Ethanol) zum Einsatz.

### 2.1.3.3 Puffer

Der als Reaktionsmedium dienende Na-K-Phosphatpuffer (4 g NaCl; 0,11 g KCl; 0,57 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,14 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf einen Liter bidestilliertes Wasser - Einstellung auf pH 7,4) sollte das physiologische Serum-Milieu möglichst getreu wiedergeben. Auf den Zusatz von Humanalbumin wurde verzichtet, um eine eventuelle Interferenz des Proteins mit der Umsatzkapazität der Pseudocholinesterase zu vermeiden.

### 2.1.3.4 PChE-Lösung

Lösung der 100 Einheiten-Entität humaner Pseudocholinesterase in 2 ml des Puffers ergab eine Humanserum-PChE-Stammlösung mit einer Aktivität von 50.000 U/L, die bis zur weiteren Verwendung aliquotiert bei – 18°C gelagert wurde.

### 2.1.3.5 Tubocurarin

Als Stammlösung des internen Standards d-Tubocurarin (M: 681,66 g/mol) kam eine 2 mM Lösung in H<sub>2</sub>O zur Anwendung.

### 2.1.3.6 Verdünnte Schwefelsäure

Zur Wiederaufnahme der im Hetovac lyophilisierten Proben (s.u.), wurde eine 5 mM Schwefelsäure-Lösung verwendet.

## 2.1.4 Seren

### 2.1.4.1 Serum mit normaler Pseudocholinesterase

Das Blut für den Normalserumpool wurde einer Probandin in einmaliger Sitzung in mehreren Serum-Gel-Monovetten ohne Gelkügelchen (Fa. Sarstedt) entnommen, 10 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert, abesert und in Portionen von 0,5 ml in Eppendorf-Reagiergefäßen bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Gesamtenzymaktivität dieses als Normal- und somit Referenzserum für die Messungen mit atypischen Seren deklarierten Serums lag bei 8086 U/L (gemessen und angegeben mit dem Substrat Butyrylthiocholin bei  $37^{\circ}\text{C}$ ); die Dibucainzahl betrug 86.

### 2.1.4.2 Seren mit atypischer Pseudocholinesterase

Zum Einsatz kamen insgesamt 15 Seren, die entweder im Rahmen einer früheren Screeninguntersuchung an Blutspendern der Universität Köln gewonnen worden waren [58] oder von Patienten stammten, die klinisch durch prolongierte Muskelrelaxation auffällig geworden waren. Elf dieser Seren wurden zunächst aufgrund ihrer Dibucainzahl als heterozygot-atypisch (Dibucainzahl 40-78) und vier als homozygot-atypisch (Dibucainzahl kleiner 40) eingestuft. Dabei wurden aufgrund der Erkenntnisse der Screeninguntersuchung von Laubinger (persönliche Kommunikation) die Grenzen etwas weiter gefasst, als die Referenzwerte des verwendeten Test-Kits nach Knedel und Böttger [48] es vorgeben (Dibucainzahl heterozygot 30-70, homozygot 0-20). Die Bestimmungen der Gesamtaktivitäten und der Dibucainzahlen wurden von Herrn R. Laubinger aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität Köln durchgeführt (gemessen und angegeben bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit dem Substrat Butyrylthiocholin). Tabelle 6 und Tabelle 7 geben eine Übersicht über die untersuchten Seren. Dabei musste Serum 8B, formal aufgrund seiner Dibucainzahl als heterozygot anzusehen, wegen seines Metabolisierungsverhaltens den homozygoten Seren zugerechnet werden.

Tabelle 6: Liste der fünf untersuchten homozygote Seren

Serum	Gesamtaktivität ( U/L )	Dibucainzahl ( % )
14 B	1029	24
13 B	1103	25
5 B	1988	30
4 B	1387	34
8 B	1225	41

Tabelle 7: Liste der zehn untersuchten heterozygote Seren

Serum	Gesamtaktivität ( U/L)	Dibucainzahl ( % )
1 B	3409	50
6 B	3491	76
9 B	2716	75
12 B	1416	77
45	6930	75
547	6017	74
1036	4619	72
1154	10840	73
1349	5225	75
1907	3179	71

## 2.2 Versuchsaufbau und Probengewinnung

Zwei im Wasserbad des Kryothermostat fixierte Erlenmeyer-Kolben mit Schliff und Deckel wurden mit je 20 ml des entsprechend vortemperierten Na-K-Phosphat-Puffers beschickt und durch Zugabe von 200  $\mu$ l der Mivacurium-Stammlösung auf eine Mivacurium-Gesamtkonzentration von 10  $\mu$ Mol/L eingestellt. Die Zugabe einer adäquaten Menge (s.u.) löslicher Pseudocholinesterase bzw. Serum zu Kolben 1 initiierte die Reaktion. Kolben 2 blieb ohne Enzymzusatz und diente als Kontrollansatz sowie zur Erfassung des Spontanzerfalls von Mivacurium. Zu definierten Zeiten (s. 2.2.1) wurden beiden Reaktionsansätzen Proben von je 1 ml entnommen und zur Beendigung der Abbaureaktion in Eppendorf-Reagiergefäßen überführt, die zuvor mit 10  $\mu$ l der Stammlösung des Enzymhemmstoffs PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) versehen worden waren. Die Proben wurden für 10 Sekunden mit dem Vortexschüttler gemischt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gekühlt.

### 2.2.1 Einsatz von Serum mit normaler Pseudocholinesterase

Der Reaktionsansatz wurde mit 0,1 ml des aufgetauten und kurz auf dem Vortexschüttler homogenisierten Serums gespikt. Die Enzymaktivität des Reaktionsansatzes betrug somit 40 U/L.

Die Verlaufsbeobachtung der Metabolisierung erfolgte bei 37°C als der physiologischen Körpertemperatur und bei 27°C als einer Körpertemperatur, wie sie während einer kardiochirurgischen Operation in Hypothermie üblich ist.

Die Entnahmen aus dem Reaktionsansatz erfolgten zu den Zeitpunkten 0, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten.

### **2.2.2 Einsatz von Seren mit atypischer Pseudocholinesterase**

Die eingesetzten Serummengen richteten sich nach der jeweilig gemessenen Gesamtkativität des Serums (s. auch Tabelle 6 und Tabelle 7). Zwecks Vergleichbarkeit mit den Normalserummessungen wurde auch hier jeder Versuchsansatz auf eine resultierende Gesamtkativität von 40 U/L eingestellt; Messungen und Probenentnahmen erfolgten analog dem Protokoll von Kapitel 2.2.

### **2.2.3 Aufbereitung der Proben**

Die bei 4°C gekühlten Proben wurden mit dem Vortex-Schüttler kurz homogenisiert. Für jede Probe wurde ein Eppendorf-Reagiergefäß mit jeweils 50 µl der Tubocurarin-Lösung als internem Standard und 800 µl Acetonitril zur Deproteinisierung vorbereitet. Jeweils 500 µl der Probe wurden in die so vorbereiteten Reagiergefäße überführt. Nach erneutem Mischen zur Proteinfällung und 4-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der klare Überstand in Eppendorf-Reagiergefäße mit perforiertem Deckel abpipettiert. Die Lyophilisation zwecks Volumenreduktion erfolgte während 4-6 Stunden im Gefriertrockner (Hetovac). Die zurückbleibende pulvrige Substanz wurde mit je 150 µl der 5 mM Schwefelsäure-Lösung aufgenommen, resuspendiert und in Autosampler-Probengefäße aus Glas gegeben.

### **2.2.4 Interner Standard und Standardproben**

#### **2.2.4.1 Interner Standard**

Die quantitative Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe eines *internen Standards*. D-Tubocurarin hatte sich aufgrund seiner von Mivacurium und dessen Metaboliten verschiedenen Retentionszeit und seiner ausgeprägten Fluoreszenz als besonders geeignet erwiesen [11]. D-Tubocurarin wurde allen Proben und Standardproben in gleicher Konzentration (2 mM) und Menge (50 µl) zugesetzt.

#### **2.2.4.2 Standardproben**

Zur Herstellung der Standardproben diente eine Pufferlösung (s. 2.1.3.3), aus der unter Zusatz der jeweiligen Stammlösungen von Mivacurium und seinen Metaboliten 5 mM

Standardlösungen (Mivacurium, Alkoholmetabolit, Säuremetabolit) erstellt wurden. Für jede Standardprobe wurde ein Eppendorf-Reagiergefäß mit je 10 µl der PMSF-Lösung präpariert und mit 1 ml der entsprechenden Standardlösung beschickt. Bis zur weiteren Verwendung der Standards erfolgte deren Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Die Notwendigkeit der Erstellung separater Standardproben für die Metabolite ergibt sich aus der Tatsache, dass sowohl Mivacurium als auch sein Säuremetabolit in Lösung stets auch zu einem kleinen Teil als Säuremetabolit und/oder Alkoholmetabolit vorliegen. Eine auf einem Gemisch aller drei Substanzen basierende Standardlösung wäre deswegen a priori mit einer Ungenauigkeit behaftet.

Jede Bestimmungsserie wurde mit je einer Standardprobe jeder Substanz eingeleitet, gefolgt von einer weiteren Standardserie nach der Hälfte der zu analysierenden Proben.

Die Konzentrationsberechnung der Einzelsubstanzen erfolgte auf der Basis des aus jeder Standard-Doppelbestimmung errechneten Mittelwertes.

## **2.3 Analysedaten**

Die Bestimmung der Konzentrationen der Mivacurium-Isomere und der Isomere seiner Metaboliten erfolgte nach der geringfügig modifizierten Methode von Biederbick [11].

### **2.3.1 HPLC: Zubehör und Bedingungen**

Die Konzentrationsbestimmung von Mivacurium und seinen Metaboliten wurde mit einer Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-(HPLC)-Methode realisiert. Die Daten-Akquisition, sowie Integration und Auswertung der Chromatogramme erfolgte auf einem IBM-kompatiblen PC über das MERCK-HITACHI-Programm HPLC-Manager Version 2 (Revision 09) für das D-6000 Interface (s.u.).

Die Bestandteile der verwendeten Hardware sind in Tabelle 8, die für die Apparatur gewählten Einstellungen in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Bestandteile und Einstellungen der HPLC-Apparatur

Typ	Funktion
T-6300	Column-Thermostat
F-1050	Fluorescence-Spectrophotometer
D-6000	Interface
L-6200	Intelligent Pump
AS-4000	Intelligent Auto Sampler
Säule	Spherisorb 5-SCX (I.D. 240 x 4 mm) Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland

Tabelle 9: gewählte Einstellungen der HPLC-Hardware

Parameter	Einstellung
Wellenlänge Exzitation	280 nm
Wellenlänge Emission	320 nm
Injektionsvolumen	50 µl
Säulendruck	160-200 bar
Säulentemperatur	30°C
Flussgeschwindigkeit	2 ml/min
Laufzeit	50 min

### 2.3.1.1 Laufmittel

Die Herstellung der Laufmittel erfolgte auf der Basis zweier Stammlösungen unter Zugabe von Acetonitril und Reinstwasser (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung der flüssigen Phase – Stammlösungen und Elutionen

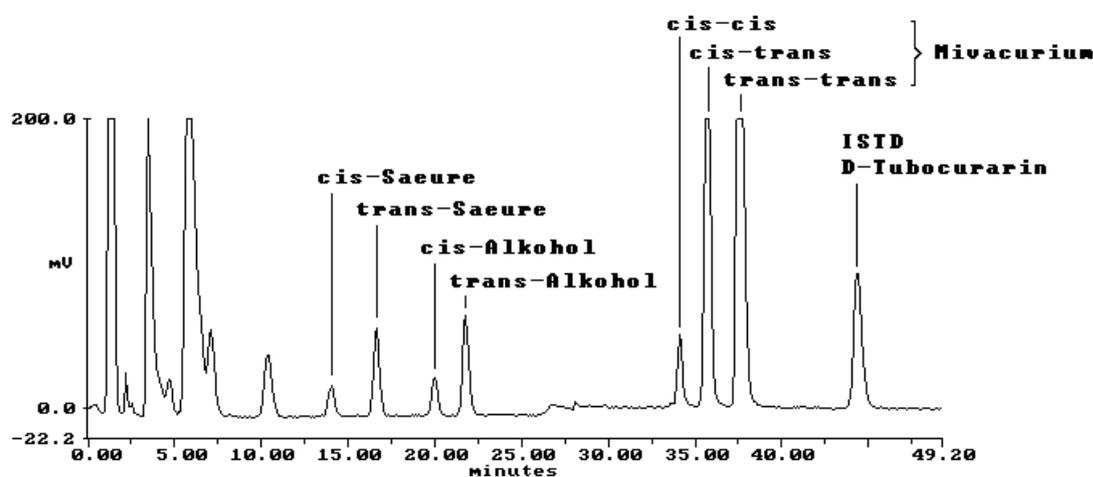
Bezeichnung	A		B	
Stammlösung	3,98 g	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> wasserfrei	31,8 g	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> wasserfrei
	400 ml	Reinstwasser	400 ml	Reinstwasser
	3,6 ml	konzentrierte H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,6 ml	konzentrierte H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Elution	72 ml	Stammlösung A	43 ml	Stammlösung B
	648 ml	Reinstwasser	387 ml	Reinstwasser
	280 ml	Acetonitril	570 ml	Acetonitril

Zur sauberen und raschen Trennung aller acht zu analysierenden Substanzen (drei Mivacurium-Isomere, je zwei Säure-/Alkohol-Isomere sowie d-Tubocurarin als interner Standard) war es nötig, die HPLC-Analyse mit einem Gradienten zu betreiben, der den Elutionsfluß graduell von 100% Elution A zu 100% Elution B regelte. Tabelle 11 stellt das Schema dazu dar, Abbildung 3 zeigt ein typisches Analyse-Chromatogramm.

Tabelle 11: Schema des verwendeten Gradienten

Zeit in min	Elution A in %	Elution B in %
0,0	100	0
23,0	65	35
23,5	0	100
48,0	0	100
49,0	50	50
50,0	100	0

Abbildung 3: Beispiel-Chromatogramm einer Serumprobe mit Darstellung der Peaks aller analysierten Substrat- und Metabolit-Isomere sowie dem internen Standard (ISTD)



## 2.3.2 Validierung des Analyseverfahrens

### 2.3.2.1 Linearität und Nachweisgrenze

Für jede Konzentration muss die Peakfläche der zu untersuchenden Substanzen in einem konstanten Verhältnis zur Fläche des internen Standards stehen. Um eine exakte Kalibrierung zu gewährleisten, mussten diese Relationen im Bereich der zu erwartenden Konzentrationen überprüft werden. Die geringste Konzentration, deren Bestimmung mit einem Variationskoeffizienten von weniger als 20% behaftet war, wurde als untere Bestimmungsgrenze festgelegt,

Danach lagen nach Biederbick [11] die unteren Bestimmungsgrenzen für die Mivacuriumisomere bei 0,005  $\mu\text{Mol/L}$  für Mivacurium-cc, bei 0,002  $\mu\text{Mol/L}$  für Mivacurium-ct und bei 0,003  $\mu\text{Mol/L}$  für Mivacurium-tt. Für den Säuremetabolit ergaben sich untere

Bestimmungsgrenzen von 0,011  $\mu\text{Mol/L}$  (cis) und 0,017  $\mu\text{Mol/L}$  (trans), für den Alkoholmetabolit von 0,021  $\mu\text{Mol/L}$  (cis) und 0,02  $\mu\text{Mol/L}$  (trans); Grafiken zur Linearität finden sich im Anhang (Kapitel 8.1).

### **2.3.2.2 Intra-Assay-Variabilität (Bestimmungsgenauigkeit)**

Die Zuverlässigkeit der Methode wurde durch Mehrfachbestimmungen überprüft: Die Streuung von sieben Proben wurde für je zwei Gesamtkonzentrationsniveaus der Racemate (1  $\mu\text{Mol/L}$  und 10  $\mu\text{Mol/L}$ ) ermittelt. Die Streuung der Mivacurium-Messwerte auf dem Gesamtkonzentrationsniveau 1  $\mu\text{Mol/L}$  lag bei 8,3% für Mivacurium-cc, bei 5,5% für Mivacurium-ct und bei 6,5% für Mivacurium-tt. Die Bestimmungen zur Gesamtkonzentration 10  $\mu\text{Mol/L}$  gingen mit Variationskoeffizienten von 3,5% (cis-cis), 4,5% (cis-trans) und 3,0% (trans-trans) einher. Für den Säure- und den Alkoholmetabolit fanden sich insgesamt etwas niedrigere Variationskoeffizienten: Auf dem 1  $\mu\text{Mol/L}$ -Niveau lag die Streuung bei 3,2% sowohl für die cis-Säure als auch für die trans-Säure; für den Alkohol fanden sich Werte von 4,4% (cis) und 2,9% (trans). Die Streuungswerte der zehnfach höheren Gesamtkonzentration lagen für die cis-Isomere der Metabolite mit 3,9% (Säure) und 3,6% (Alkohol) nahe beieinander, ebenso wie die Streuung der trans-Metabolite: trans-Säure 4,1% und trans-Alkohol 4,0%. Die Tabellen zur Intra-Assay-Variabilität befinden sich unter Kapitel 8.2 im Anhang.

### **2.3.2.3 Inter-Assay-Variabilität (Wiederholbarkeit)**

Für dieses Kriterium mussten die Messungen einer bekannten Konzentration an verschiedenen Tagen gleichförmig ausfallen. Zur Erstellung dieser Wiederholbarkeitsprüfung dienten die 1  $\mu\text{Mol/L}$ -Proben der Messungen zum Linearitätsnachweis; bei sieben Bestimmungsreihen ergaben die 1  $\mu\text{Mol/L}$ -Proben (Gesamtkonzentration der Racemate) folgende Statistik (Tabelle 12, Tabelle 13 und Tabelle 14):

Tabelle 12: Inter-Assay-Variabilität von 1 µMol/L-Proben an sieben Bestimmungstagen – Mivacurium

Mivacurium 1 µMol/L			
Messung Nr.	Miva-cc 0,06 µMol/L	Miva-ct 0,34 µMol/L	Miva-tt 0,6 µMol/L
1	0,0690	0,2753	0,4307
2	0,0631	0,2937	0,5000
3	0,0478	0,3392	0,4907
4	0,0757	0,3457	0,6241
5	0,0389	0,2904	0,4933
6	0,0552	0,3370	0,5444
7	0,0397	0,2815	0,4780
<b>MW</b>	<b>0,056</b>	<b>0,309</b>	<b>0,509</b>
<b>S.D.</b>	<b>0,014</b>	<b>0,030</b>	<b>0,061</b>
<b>S.D.%</b>	<b>25,77</b>	<b>9,82</b>	<b>11,97</b>

Tabelle 13: Inter-Assay-Variabilität von 1 µMol/L-Proben an sieben Bestimmungstagen – Säuremetabolit

Säuremetabolit 1 µMol/L		
Messung Nr.	cis-Säure 0,2 µMol/L	tr-Säure 0,8 µMol/L
1	0,2449	0,9035
2	0,2932	0,8146
3	0,2077	0,8234
4	0,1923	0,7540
5	0,2076	0,8211
6	0,2063	0,8419
7	0,1898	0,7472
<b>MW</b>	<b>0,220</b>	<b>0,815</b>
<b>S.D.</b>	<b>0,037</b>	<b>0,053</b>
<b>S.D.%</b>	<b>16,74</b>	<b>6,53</b>

Tabelle 14: Inter-Assay-Variabilität von 1 µMol/L-Proben an sieben Bestimmungstagen – Alkoholmetabolit

Alkoholmetabolit 1 µMol/L		
Messung Nr.	cis-Alkohol 0,21 µMol/L	tr-Alkohol 0,79 µMol/L
1	0,2637	0,8957
2	0,3522	0,9847
3	0,2673	0,9048
4	0,2868	0,9952
5	0,2691	0,9408
6	0,2690	0,9226
7	0,2400	0,9168
<b>MW</b>	<b>0,278</b>	<b>0,937</b>
<b>S.D.</b>	<b>0,035</b>	<b>0,039</b>
<b>S.D.%</b>	<b>12,70</b>	<b>4,14</b>

## 2.4 Archivierung der Daten

Die von der HPLC-Integrationssoftware errechneten und als „Report-File“ ausgegebenen Werte der Chromatogramm-Peakflächen (Abbildung 3) wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel<sup>®</sup> (Microsoft<sup>®</sup>, s. Kapitel 2.6) übertragen und bearbeitet. Anhand der in jedem HPLC-Lauf mitbestimmten Standardproben konnten die Plasmakonzentrationen der zu analysierenden Substanzen errechnet werden. Die Mittelwerte der Doppelbestimmungen bildeten die Grundlage für alle weiteren Berechnungen und grafischen Darstellungen.

## 2.5 Auswertung mit TOPFIT

Die Berechnung der Halbwertszeiten erfolgte über das Datenverarbeitungsprogramm TOPFIT 2.0 [TOPFIT – Pharmakokinetik and Pharmacodynamic Data Analysis System for the PC (Heinzel 1993), Projekt der Firmen GÖDECKE AG (Freiburg), SCHERING AG (Berlin) und THOMAE GmbH (Biberach a.d. Riß)]. Hierfür wurden die mittels Tabellenkalkulation (s. Kapitel 2.6) errechneten Substanz-Konzentrationen in Form molarer Werte eingetragen und via TOPFIT<sup>®</sup> zu Eliminationshalbwertszeiten weiterverrechnet.

## 2.6 Darstellung und statistische Auswertung

Die Erfassung, Anordnung und grafische Darstellung der Daten fand in einer Standardversion des Tabellenkalkulationsprogramms Excel<sup>®</sup> statt (Microsoft<sup>®</sup> Office Home & Student 2013; Microsoft Corporation, Bereich Microsoft Deutschland GmbH, 85716 Unterschleißheim, Deutschland), ebenso die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten.

Als wesentliche grafische Darstellungsform zur Visualisierung der Konzentrations-Zeit-Verläufe wurden einfache Liniendiagramme genutzt und dabei aus mehreren Messungen gemittelte Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet. Diese Form der Darstellung von pharmakokinetischen Verläufen entspricht den Standards der Literatur. Bei Gruppenvergleichen, etwa von Halbwertszeiten, kamen ferner Säulendiagramme zur Anwendung.

Die entsprechend umstrukturierten Daten-Tabellen in xlsx-Format wurden zur weiteren statistischen Auswertung in eine Statistik-Software importiert (MedCalc<sup>®</sup>, Version 12.4.0

– last modified: January 2, 2013, © 1993-2013; MedCalc<sup>®</sup> Software, Acacialaan 22, B-8400 Ostend, Belgium). Explorative Auswertungen fanden darin mit Hilfe nicht-parametrischer Rangsummentests statt. Gründe hierfür waren neben der häufigen Abweichung der primären Daten von einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) die häufig fehlende Varianzhomogenität (Test nach Levene), die Nutzung sekundärer Daten im Vergleichstest – etwa Halbwertszeiten, die zuvor berechnet worden waren – und eine somit höhere Robustheit der Ergebnisse. Für Vergleiche unabhängiger Gruppen (z.B. homozygote versus heterozygote Seren) kam ein Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung, bei Vergleichen abhängiger Stichproben (z.B. Seren gleicher Herkunft 37° versus 27°C) ein Wilcoxon-Test. Schließlich wurden Rangkorrelationen nach Spearman durchgeführt, um potentielle Abhängigkeiten von Halbwertszeiten und Dibucainzahlen darzustellen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Normalserum

Die Messungen erfolgten bei 37°C über 120 Minuten unter Einsatz einer Normalserummenge, die einer PChE-Aktivität von 40 U/L entspricht. Die aus sieben Messreihen gemittelten Ergebnisse dienen in der Folge als Vergleichswert für die Kernuntersuchungen dieser Arbeit: die Messungen der Metabolisierungsleistungen bezüglich Mivacurium durch Seren, die hetero- bzw. homozygote Pseudocholinesterase enthalten.

Mivacurium erfährt in Normalserum einen exponentiellen Abbau, während seine Metabolite Säure und Alkohol exponentiell zunehmen.

Der Spontanzerfall über zwei Stunden in den Leerproben (Versuchsansatz ohne Zugabe PChE-enthaltenden Serums) ist vernachlässigbar gering: Lediglich 5,2 % ( $0,51 \pm 0,75$  Mol/L) des eingesetzten Mivacurium zerfielen während des Beobachtungszeitraums.

#### 3.1.1 Mivacurium und seine Isomere

Das in einer mittleren Konzentration von  $10,08 \pm 1,04$   $\mu\text{Mol/L}$  vorliegende Mivacurium-Racemat wurde innerhalb des Messzeitraums zu 82,5 % abgebaut: nach 120 Minuten lagen im Mittel nur noch  $1,76 \pm 0,21$   $\mu\text{Mol/L}$  (17,5 %) der Ausgangssubstanz vor.  $8,32 \pm 0,9$   $\mu\text{Mol/L}$  Mivacurium absolut wurden umgesetzt, wobei die einzelnen Isomere unterschiedlich stark metabolisiert wurden.

Abbildung 4: Konzentrationsverlauf von Mivacurium-tt bei Einsatz von Normalserum

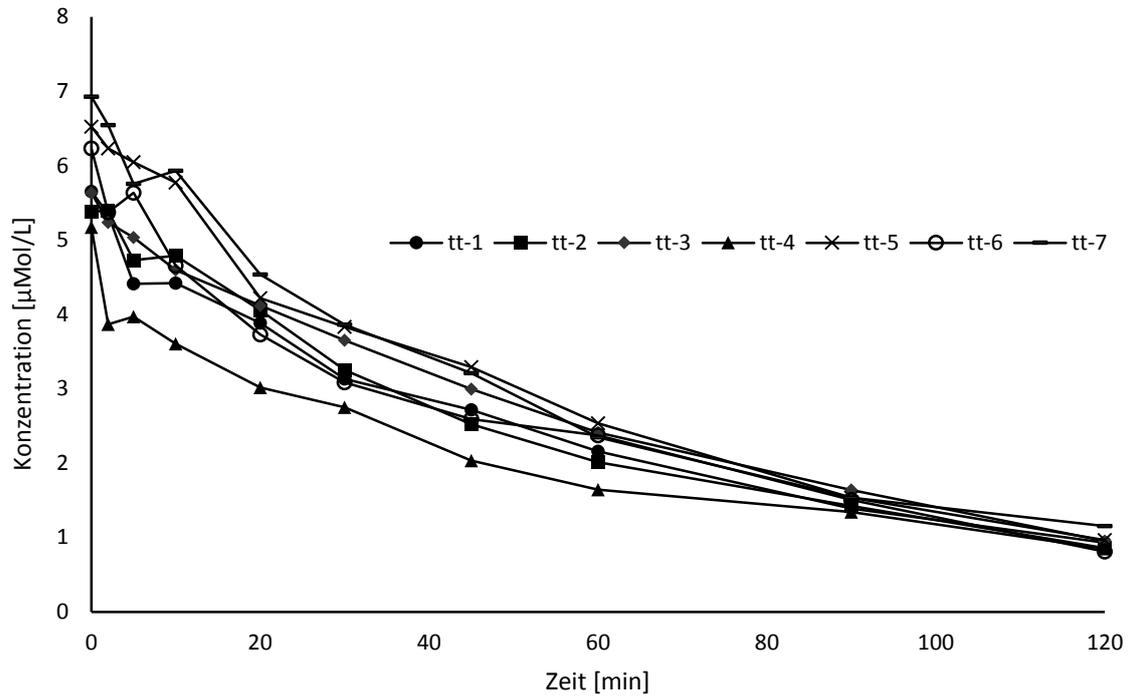


Abbildung 5: Konzentrationsverlauf von Mivacurium-ct bei Einsatz von Normalserum

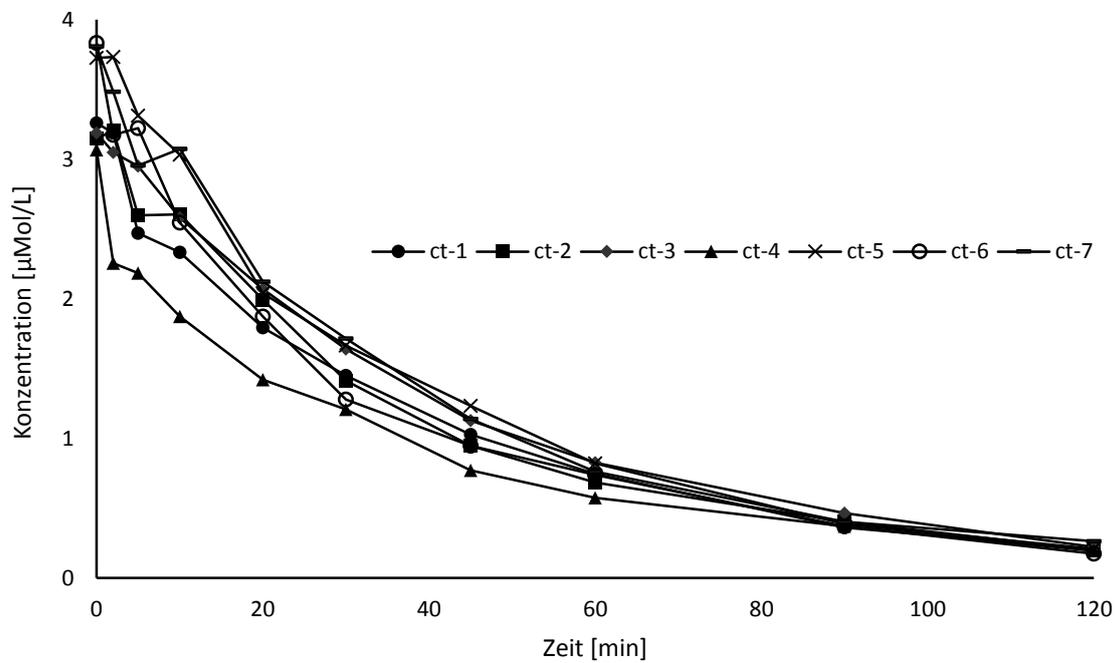
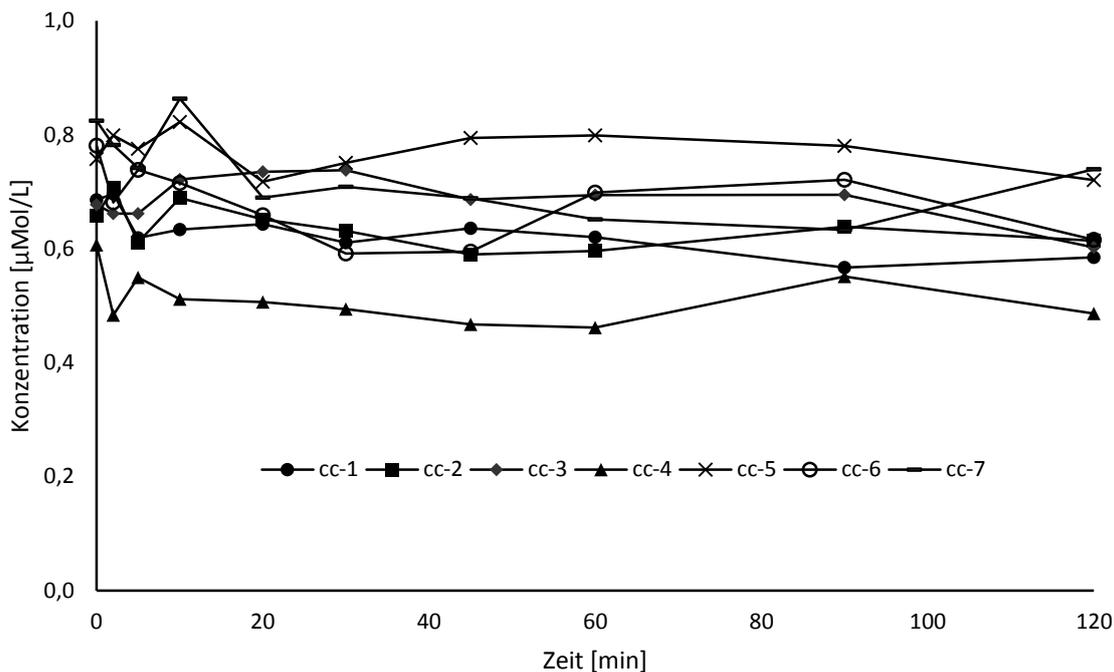


Abbildung 6: Konzentrationsverlauf von Mivacurium-cc bei Einsatz von Normalserum



Die trans-konfigurierten Isomere Mivacurium-ct und Mivacurium-tt werden zügig abgebaut: Das mengenmäßig am stärksten vertretene tt-Isomer (58,9 % Racemat-Anteil) stellt 60,1 % des Gesamtumsatzes. Es wird dabei zu 84,3 % ( $5,0 \pm 0,57 \mu\text{Mol/L}$ ) abgebaut, während Mivacurium-ct, mit dem deutlich geringeren Anteil von 34,1 % am Substrat, mit 93,9 % ( $3,22 \pm 0,33 \mu\text{Mol/L}$ ) nahezu gänzlich verstoffwechselt und mit einem Anteil von 38,8 % am Mivacurium-Gesamtumsatz vergleichsweise bevorzugt abgebaut wurde gegenüber Mivacurium-tt ( $p = 0,0156$ ) (s. Abbildung 4 und Abbildung 5).

Mivacurium-cc, dessen Anteil am Racemat mit 7,1 % am geringsten ist, wurde zu 12,6 % ( $0,09 \pm 0,04 \mu\text{Mol/L}$ ) abgebaut und trägt damit mit 1,1 % zum Gesamtumsatz bei (Abbildung 6). Ein statistischer Unterschied zum Spontanzerfall besteht nicht ( $p = 0,1094$ ). Ebenso zeigt sich innerhalb der drei Isomere kein Unterschied in ihrem Spontanzerfall ( $p = 0,549$ ).

### 3.1.1.1 Halbwertszeiten

Die unterschiedliche Metabolisierungskinetik der drei Mivacurium-Isomere spiegelt sich in verschiedenen langen Halbwertszeiten ( $\text{HWZ} = T/2$ ) wider: Mit einer Halbwertszeit von im Mittel  $752 \pm 269$  Minuten, d.h. über zwölf Stunden, wird M-cc mit Abstand am langsamsten abgebaut. Ein Unterschied zum Spontanzerfall ließ sich nicht nachweisen ( $p =$

0,2929). Die Halbwertszeiten von M-tt und M-ct liegen mit  $43,86 \pm 4,74$  Minuten und  $29,71 \pm 1,34$  Minuten relativ nah zusammen, wobei M-ct statistisch signifikant schneller metabolisiert wird ( $p = 0,0156$ ).

Die für den Spontanzerfall bestimmten Halbwertszeiten bewegen sich für alle Isomere im Bereich von mehreren Stunden, dabei zerfallen M-ct ( $T/2 = 2039 \pm 1325$  Minuten = 34,0 Stunden) und M-tt ( $T/2 = 1715 \pm 968$  Minuten = 28,6 Stunden) ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,594$ ) langsamer als M-cc ( $T/2 = 1359 \pm 1207$  Minuten = 22,6 Stunden).

### 3.1.2 Metabolite

#### 3.1.2.1 Säure

Insgesamt entstanden im Mittel absolut  $6,71 \pm 1,16$   $\mu\text{Mol/L}$  Säuremetabolit aus der eingesetzten Menge Mivacurium; davon  $2,44 \pm 0,38$   $\mu\text{Mol/L}$  cis-Säure (Abbildung 7) und  $4,27 \pm 0,75$   $\mu\text{Mol/L}$  trans-Säure (Abbildung 8). Nach der Dreisatz-Formel:

$$(\Delta S / \Delta M_{\text{gesamt}}) \times 100 = \% S_{\text{prod-M}}$$

wurde die prozentuale Menge der aus dem metabolisierten Mivacurium gebildeten Säure bestimmt <sup>1</sup>. Danach entstanden 29,4% cis-Säure und 51,3% trans-Säure, insgesamt also 80,7% Säuremetabolit aus der umgesetzten Mivacuriumgesamtmenge.

Im Kontrollansatz ohne Zusatz von Pseudocholinesterase entstanden im Spontanzerfall absolut  $0,07 \pm 0,02$   $\mu\text{Mol/L}$  Säuremetabolit (13,1%), davon entfielen  $0,01 \pm 0,02$   $\mu\text{Mol/L}$  (1,4%) auf die cis-Säure und  $0,06 \pm 0,01$   $\mu\text{Mol/L}$  (11,7 %) auf die trans-Säure.

---

1

$\Delta S$	Differenz der Säurekonzentrationen (Säure-cis, Säure-trans bzw. Säure gesamt) zwischen den Zeitpunkten 120 und 0 Minuten
$\Delta M_{\text{gesamt}}$	Differenz der Mivacurium-Gesamtkonzentrationen zwischen den Zeitpunkten 0 und 120 Minuten
$\% S_{\text{prod-M}}$	Säuremenge, die aus dem metabolisierten Mivacurium (entspricht $\Delta M_{\text{gesamt}}$ ) gebildet wurde in Prozent

Abbildung 7: Konzentrationsverlauf der cis-Säureentstehung bei Verwendung von Normalserum

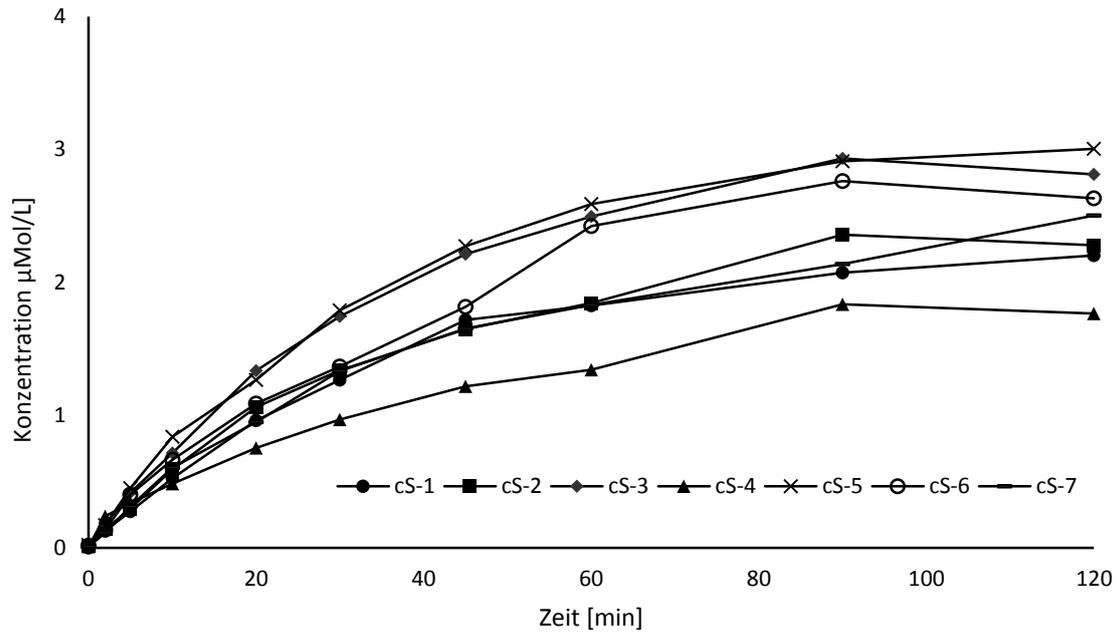
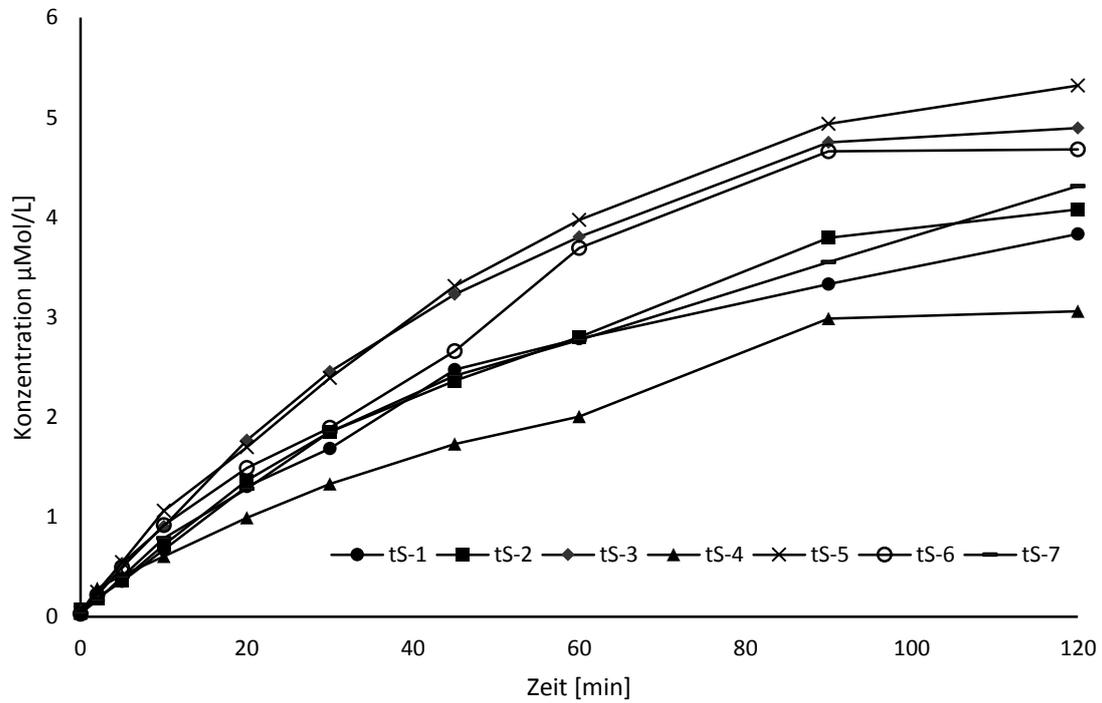


Abbildung 8: Konzentrationsverlauf der trans-Säureentstehung bei Verwendung von Normalserum



### 3.1.2.2 Alkohol

Nach der analog für den Alkoholmetaboliten durchgeführten Berechnung (s. 3.1.2.1) resultiert die Umsetzung von Mivacurium in den Alkoholmetaboliten in einem deutlich weniger ausgewogenen Verhältnis der beiden Alkoholisomere zueinander: Von insgesamt 97,4% ( $8,1 \pm 0,92 \mu\text{Mol/L}$ ) aus Mivacurium entstandenem Alkoholmetaboliten entfällt mit 97,1% ( $8,08 \pm 0,92 \mu\text{Mol/L}$ ) fast die gesamte Menge auf das trans-Isomer, während lediglich  $0,03 \pm 0,02 \mu\text{Mol/L}$  (0,3%) cis-Alkohol nach 120 Minuten messbar sind – eine Menge, die sich nicht von der des Spontanzerfalls unterscheidet ( $p = 0,578$ ). Siehe dazu auch Abbildung 9 und Abbildung 10.

Abbildung 9: Konzentrationsverlauf der cis-Alkoholenstehung unter Einsatz von Normalserum

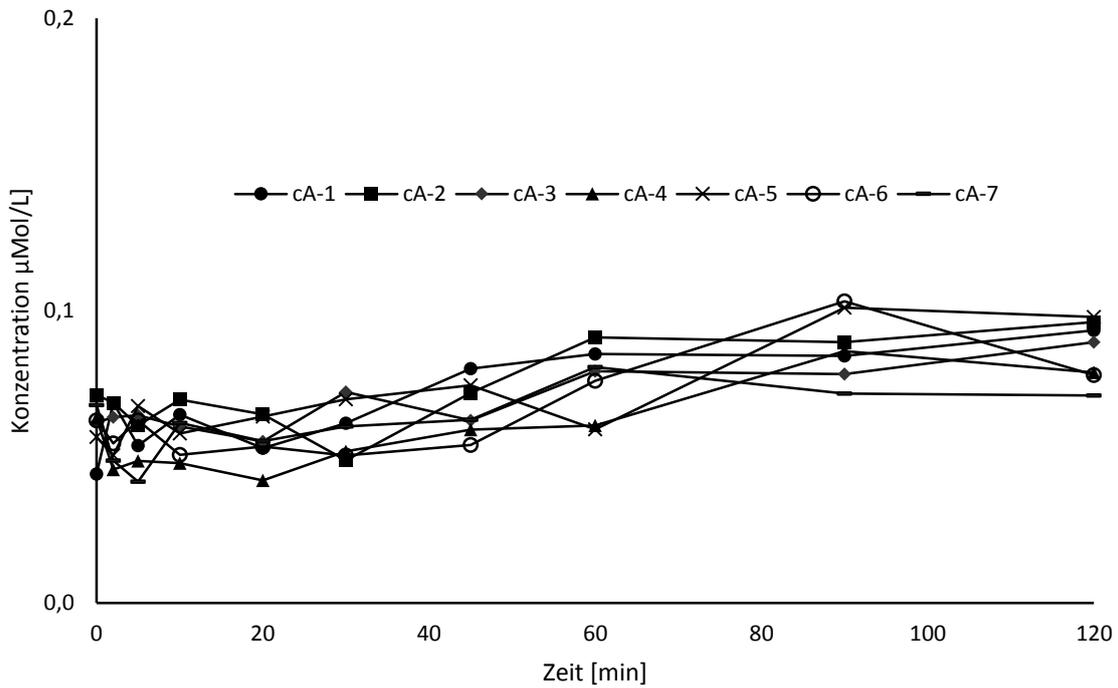
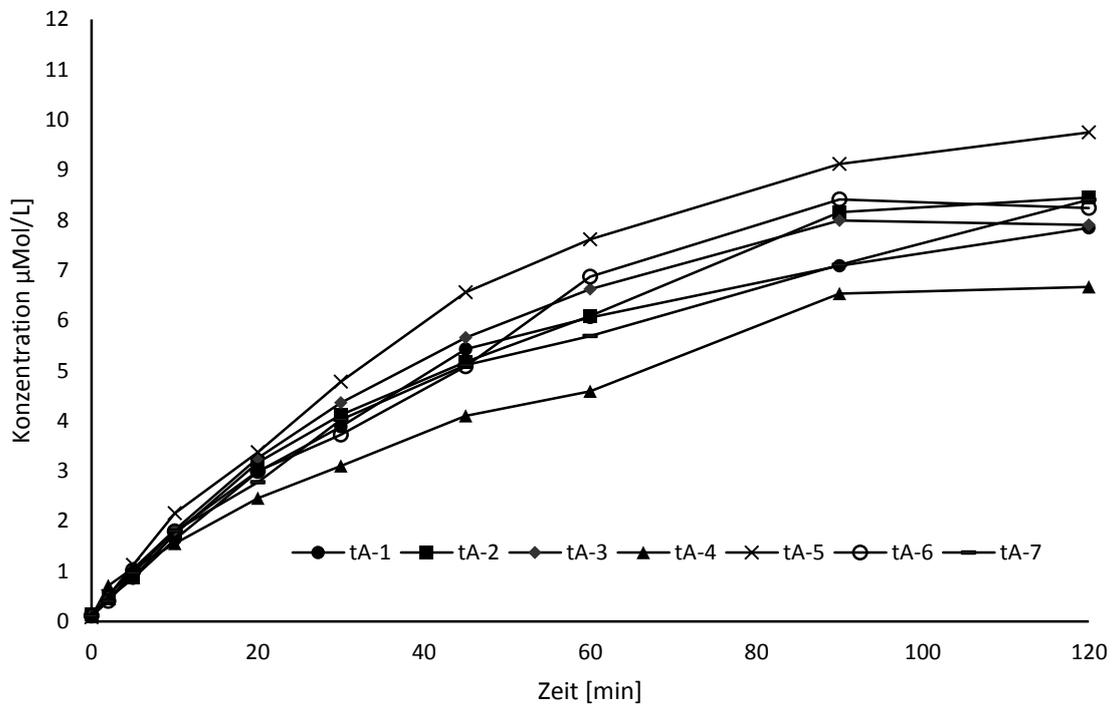


Abbildung 10: Konzentrationsverlauf der trans-Alkoholenstehung unter Einsatz von Normalserum

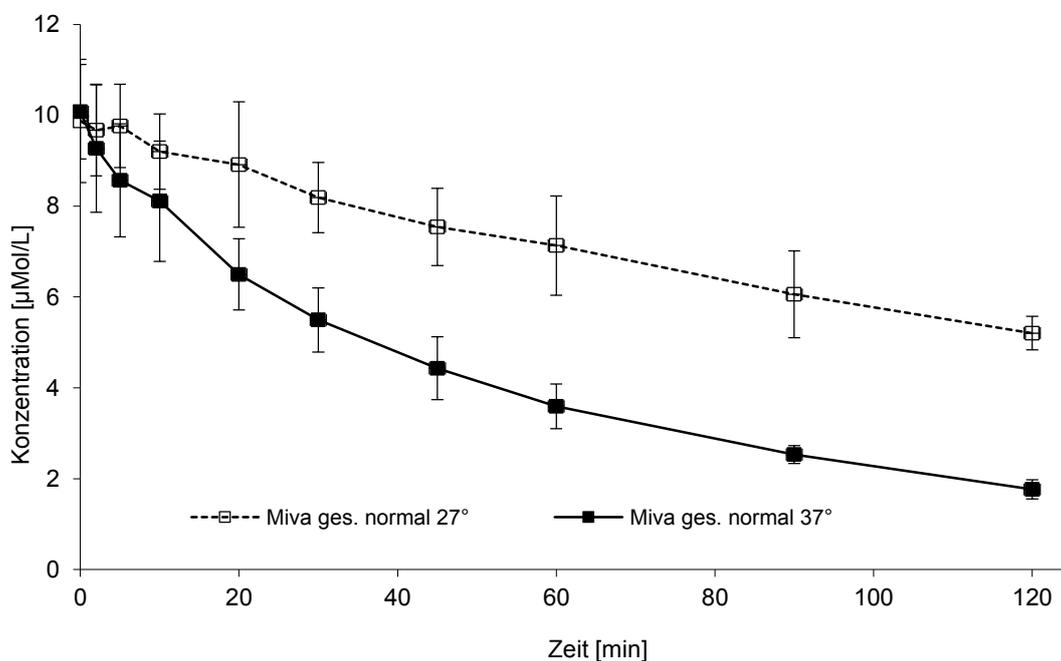


### 3.1.3 Temperaturabhängigkeit

#### 3.1.3.1 Mivacurium und seine Isomere

Wird die Metabolisierungstemperatur von 37°C auf 27°C gesenkt, zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme des Substratabbaus mit  $p = 0,0156$  sowohl für Mivacurium-tt als auch für Mivacurium-ct; für Mivacurium-cc ist die Signifikanz knapp ( $p = 0,0469$ ). Abbildung 17 zeigt vergleichend die summative Darstellung der Konzentrationsverläufe des Mivacuriumracemates bei 37°C und bei 27°C.

Abbildung 11: Temperaturabhängigkeit des Mivacuriumabbaus – Summe der analysierten Mivacurium-Isomere bei 37°C versus 27°C; dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung ( $n = 7$ )



##### 3.1.3.1.1 Halbwertszeiten

Die Herabsetzung der Metabolisierungstemperatur resultiert für beide trans-konfigurierte Mivacurium-Isomere statistisch signifikant in einer annähernden Verdreifachung der gemessenen Halbwertszeiten: für ct um den Faktor 2,6 von  $30 \pm 1,34$  Minuten auf  $79 \pm 8,27$  Minuten ( $p = 0,0006$ ), für tt von  $44 \pm 4,74$  Minuten auf  $141 \pm 12,74$  Minuten ( $p = 0,0006$ ) um den Faktor 3,2 (s. Tabelle 15).

Tabelle 15: Halbwertszeiten und Standardabweichung der Mivacurium-Isomere in Minuten bei 37°C und bei 27°C

T° [°C]	cc [min]	S.D.	ct [min]	S.D.	tt [min]	S.D.
37°	753	269	30	1,34	44	4,74
27°	1964	1586	79	8,27	141	12,74

Die Halbwertszeit des cc-Isomers verlängert sich bei sehr hoher Streuung ohne statistische Signifikanz ebenfalls um das 2,6-Fache: von  $753 \pm 269$  auf  $1964 \pm 1586$  Minuten.

### 3.1.3.1.2 Umsatzkapazität

Eine Absenkung der Metabolisierungstemperatur um zehn Grad Celsius bedeutet eine statistisch bedeutsame Verringerung ( $p = 0,0006$ ) des Substratumsatzes von  $8,32 \pm 0,9$   $\mu\text{Mol/L}$  auf  $4,67 \pm 1,16$   $\mu\text{Mol/L}$ . Das entspricht einem Rückgang der Umsatzkapazität der Pseudocholinesterase bei 27°C um 44% im Vergleich zur Metabolisierung bei 37°C.

Tabelle 16: Mivacurium-Umsatz und PChE-Umsatzkapazität im Temperaturvergleich 37°C versus 27°C (Eins. = Einsatz; Ums\_Kap = Umsatzkapazität, bez. = bezogen)

T°	M_Umsatz [ $\mu\text{Mol/L}$ ]	S.D.	von M_Eins. %	PChE [U/L]	Zeit [min]	Ums_Kap_PChE [ $\mu\text{Mol/L}$ ]/U/min	bez. auf 37° %	$\Delta$ zu 37° %
37°	8,32	0,90	82,51	40	120	0,00173	100	0
27°	4,67	1,16	47,31	40	120	0,00097	56	-44

### 3.1.3.2 Metabolite

Der geringere Substratumsatz geht mit einer geringeren Entstehungsrate der beiden Metabolite einher (s. Abbildung 12 und Abbildung 13). Mit einer Signifikanz von jeweils  $p = 0,0156$  entsteht weniger cis-Säure, trans-Säure und trans-Alkohol im Vergleich zur Metabolisierung bei 37°C. Die cis-Alkohol-Produktion verändert sich bei Absenkung der Temperatur nicht ( $p = 0,2187$ ).

Abbildung 12: Säureentstehung bei 37°C und 27°C; Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung (n = 7)

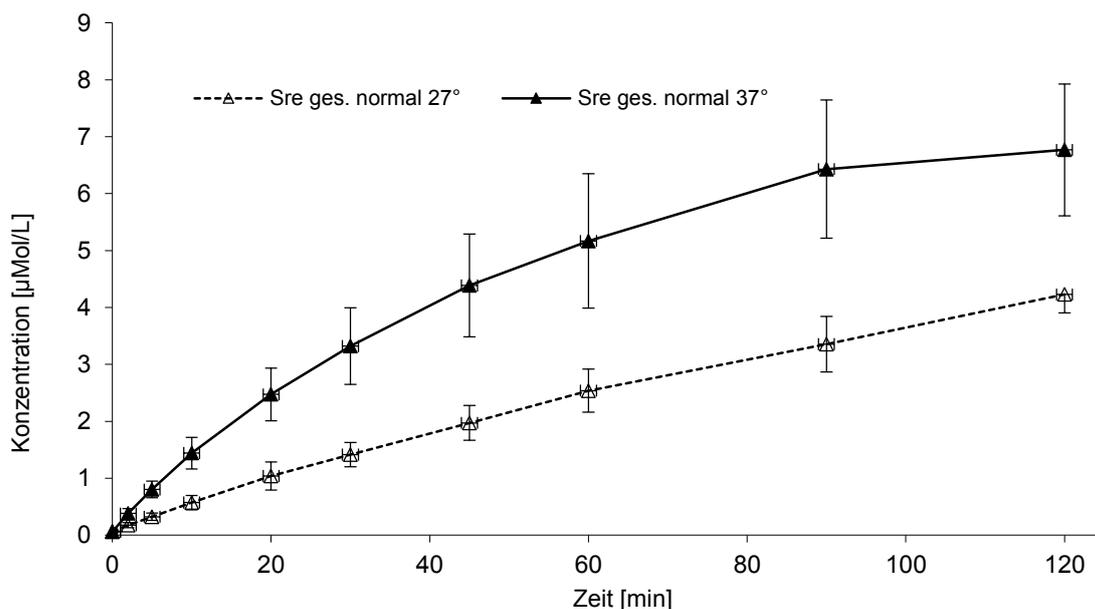
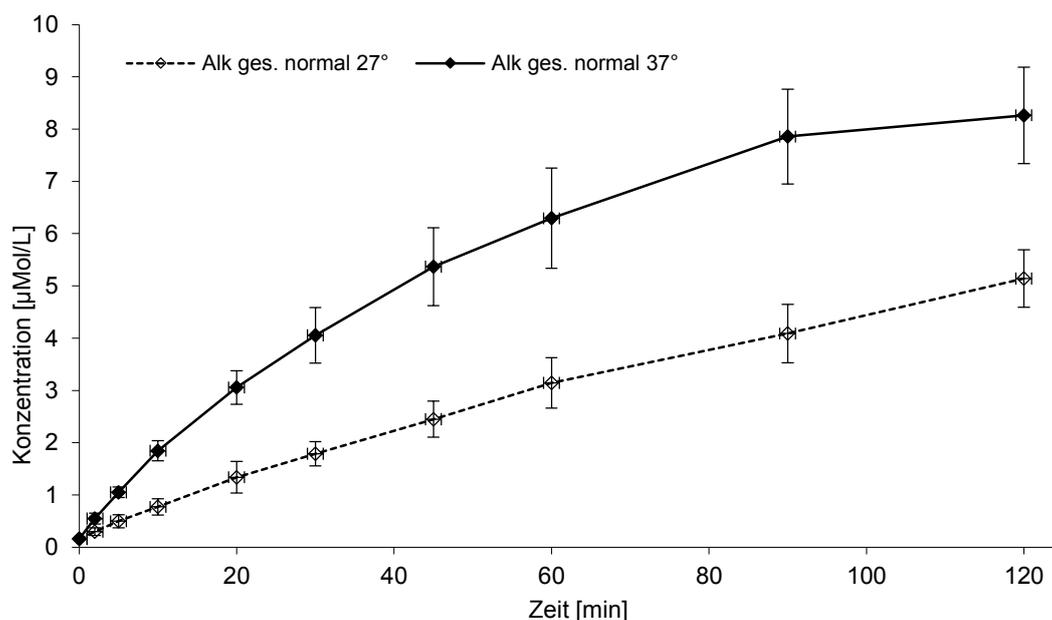


Abbildung 13: Alkoholentstehung bei 37°C und 27°C; Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung (n = 7)



Die prozentuale Verteilung von cis- und trans-Isomerie bleibt bezüglich des Alkoholmetaboliten erhalten (Abbildung 14), während es innerhalb des Säuremetaboliten zu einer leichten Verschiebung des cis-trans-Verhältnisses kommt: Im Vergleich zum Metabolismus bei 37°C entstehen beim Abbau unter 27°C 6,8 % mehr cis-Säure, im Gegenzug gleichzeitig 6,8% weniger trans-Säure (Abbildung 15).

Abbildung 14: Prozentuale Verteilung von cis- und trans-Alkoholmetabolit bei Metabolisierung unter 37°C und 27°C

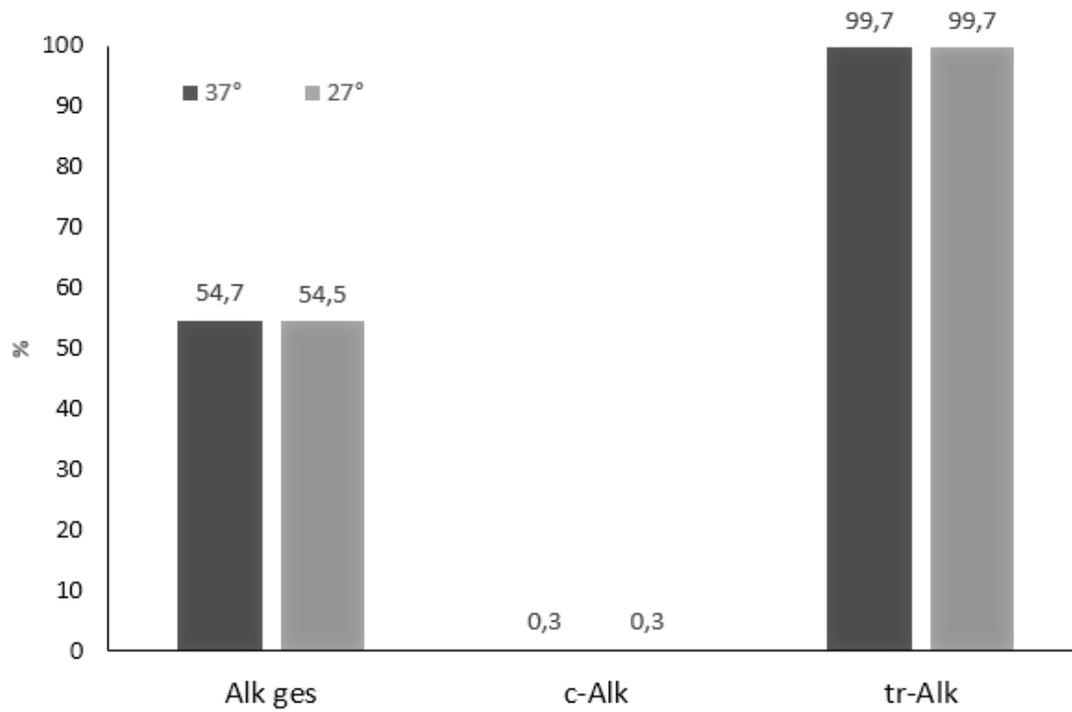
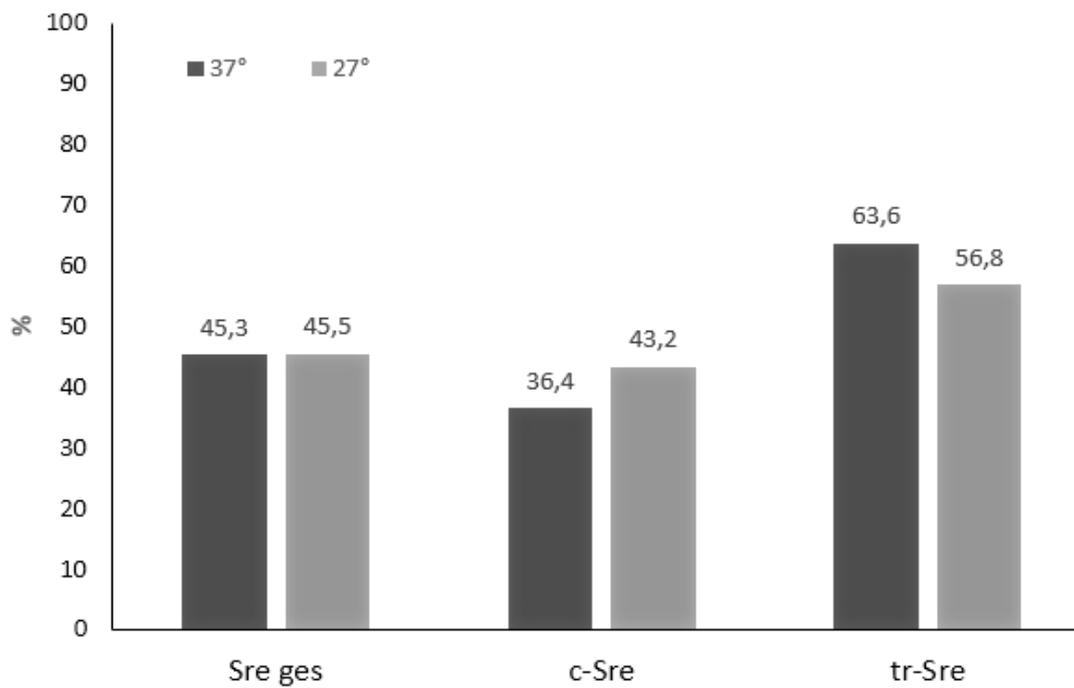


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung von cis- und trans-Säuremetabolit bei Metabolisierung unter 37°C und 27°C



Die cis-trans-Verschiebung innerhalb des Säuremetaboliten schlägt sich auch nieder in einer leicht verschobenen, statistisch aber nicht signifikanten Bilanz der cis- bzw. trans-Isomere insgesamt zueinander. Während unter 37°C 16,7% cis-Isomere anfallen und 83,3% trans-Isomere, so entstehen unter 27°C in geringem Maße (3,1%) mehr cis- (19,8%) und in gleichem Maße weniger trans-Isomere (80,2%) (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Metabolitenstehung im Temperaturvergleich – Darstellung der prozentualen Anteile entstandener Säure- und Alkoholmetabolite sowie cis- und trans-Metabolite in Bezug zur absolut entstandenen Metabolitgesamtmenge

37°C Normalserum				27°C Normalserum			
Metabolit gesamt		14,81	µMol/L	Metabolit gesamt		9,15	µMol/L
davon %				davon %			
	cis	trans	Σ		cis	trans	Σ
<b>Sre</b>	16,5	28,8	<b>45,3</b>	<b>Sre</b>	19,7	25,8	<b>45,5</b>
<b>Alk</b>	0,2	54,5	<b>54,7</b>	<b>Alk</b>	0,2	54,3	<b>54,5</b>
Σ	<b>16,7</b>	<b>83,3</b>		Σ	<b>19,8</b>	<b>80,2</b>	

## 3.2 Atypische Seren

### 3.2.1 Homozygote Seren

Alle fünf homozygoten Seren, die Gegenstand der Untersuchung waren, weisen eine deutlich reduzierte Gesamtaktivität der Pseudocholinesterase zwischen 1029 und 1988 U/L auf. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Metabolisierungsansätze unter Einsatz eines Serumäquivalents durchgeführt, das einer PChE-Aktivität von 40 U/L entspricht.

Unter Einsatz dieser Serumäquivalente kam es zu keinem relevanten Abbau von Mivacurium zu Säure und Alkohol: Der Gesamtumsatz von Mivacurium nach 120 Minuten liegt mit hoher Varianz bei  $0,24 \pm 0,29 \mu\text{Mol/L}$ , entsprechend einem umgesetzten Mivacuriumanteil von 2,39%. Die Kontrollmessung zeigt einen Spontanzerfall ohne statistischen Unterschied zum Verum-Ansatz von  $0,11 \pm 0,76 \mu\text{Mol/L}$  (1,12%). Abbildung 16, Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen die Verum-Konzentrationsverläufe der drei Mivacurium-Isomere unter Einsatz der fünf verschiedenen homozygoten Seren.

Abbildung 16: Einzelmessungen der homozygoten Seren ( $n = 5$ ) – Abbau von Mivacurium-cc

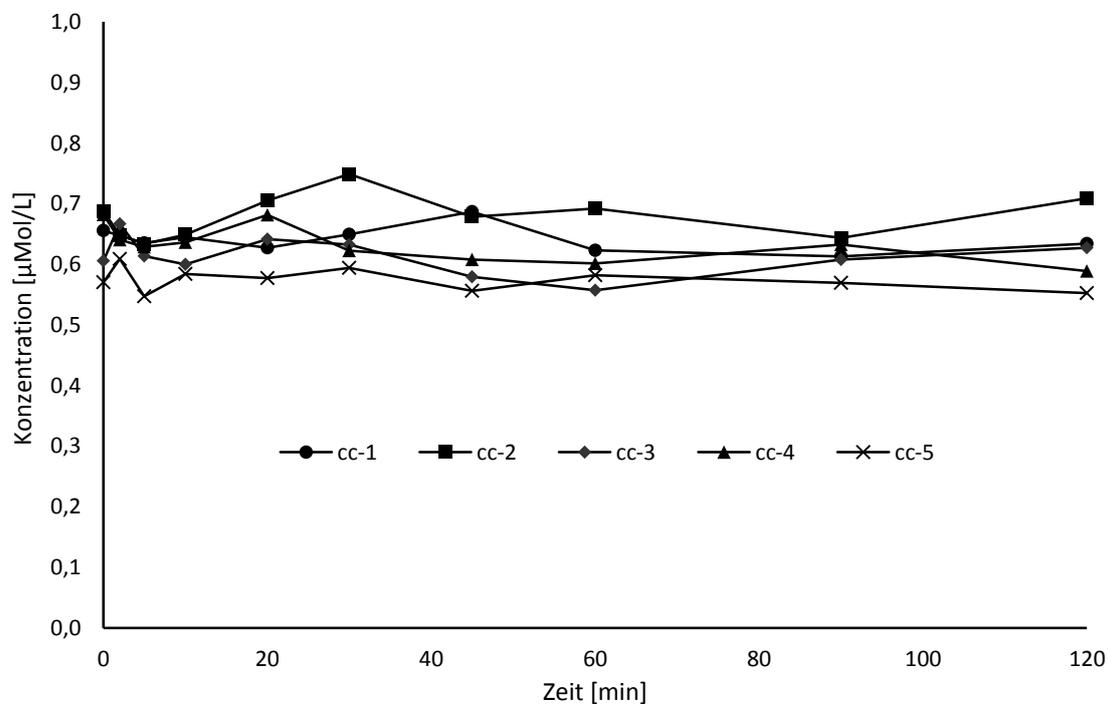
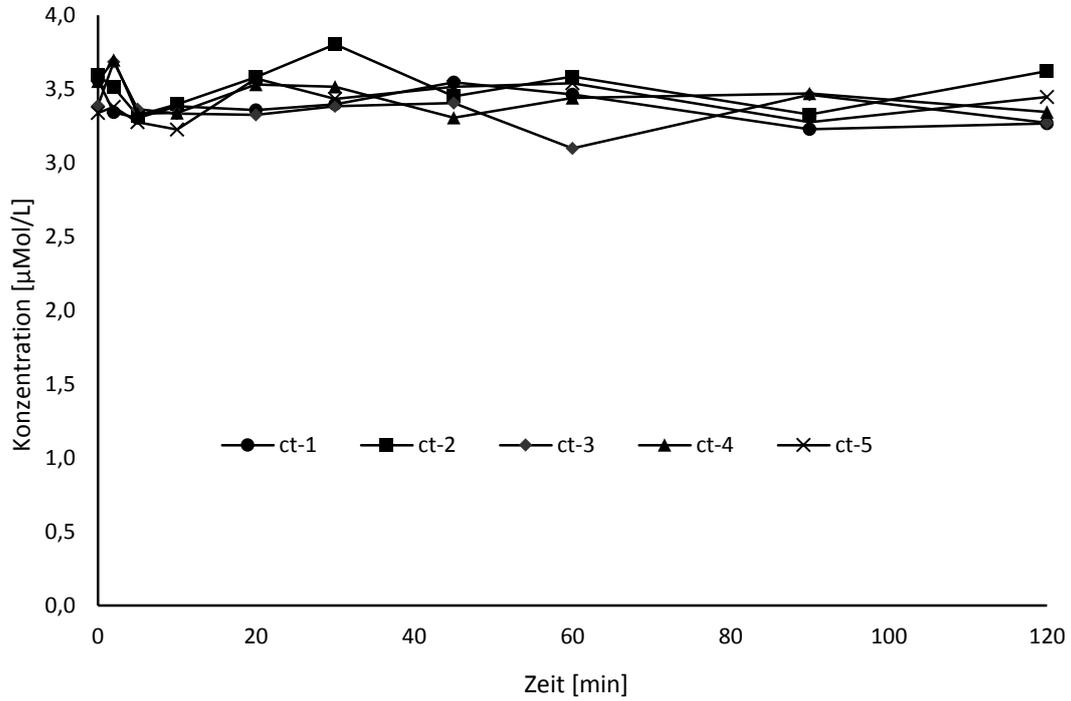
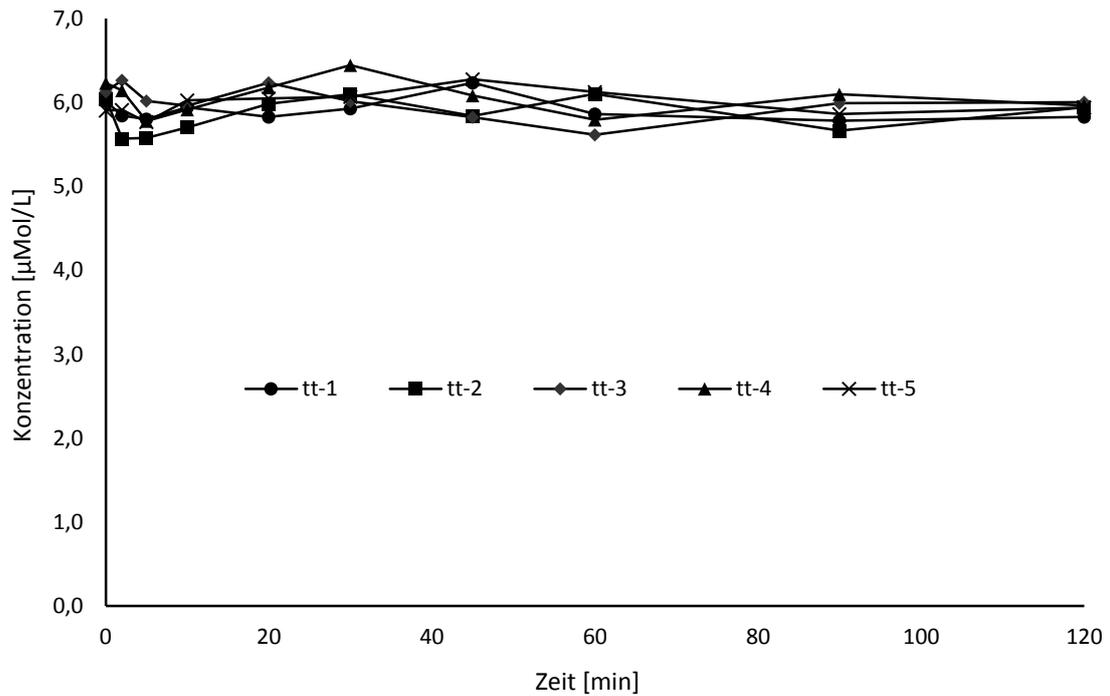


Abbildung 17: Einzelmessungen der homozygoten Seren ( $n = 5$ ) – Abbau von Mivacurium-ctAbbildung 18: Einzelmessungen der homozygoten Seren ( $n = 5$ ) – Abbau von Mivacurium-tt

Entsprechend des minimalen Umsatzes von Mivacurium fielen keine statistisch signifikant vom Spontanzerfall verschiedenen Metabolitmengen an: Nach 120 Minuten wurden  $0,23 \pm 0,04 \mu\text{Mol/L}$  Säuremetabolit und  $0,27 \pm 0,07 \mu\text{Mol/L}$  Alkoholmetabolit gemessen.

Die fehlende Metabolisierungskapazität der homozygoten Seren spiegelt sich auch in den Halbwertszeit-Bestimmungen (s. Tabelle 18) wider: Bei großer Varianz unterscheidet sich die Halbwertszeit des tt-Isomers bei Einsatz homozygoter Seren nicht statistisch signifikant von der des Spontanzerfalls. Die Halbwertszeiten von M-cc und M-ct konnten aufgrund einer zu geringen Probenanzahl nicht statistisch untersucht werden.

*Tabelle 18: Halbwertszeiten in Minuten der Mivacurium-Isomere bei Einsatz von homozygoten Seren im Vergleich mit dem Spontanzerfall (ohne Zugabe von Serum)*

HWZ (min)	Serum homozygot 40 U/L			Spontanzerfall (= Kontrolle)		
	cc	ct	tt	cc	ct	tt
8 B	1121	2050	6290	1225	2572	1261
4 B	1382	3023	1138	2578	3347	3338
14 B	832	1834	2203	kein Wert	kein Wert	kein Wert
13 B	884	2194	5046	kein Wert	9113	2560
5 B	1223	6428	2761	8413	kein Wert	1816
<b>Mittelwert</b>	<b>1089</b>	<b>3106</b>	<b>3488</b>	<b>4072</b>	<b>5011</b>	<b>2244</b>
<b>S.D.</b>	<b>231</b>	<b>1911</b>	<b>2120</b>	<b>3820</b>	<b>3573</b>	<b>903</b>
<b>S.D.%</b>	<b>21</b>	<b>62</b>	<b>61</b>	<b>94</b>	<b>71</b>	<b>40</b>

### 3.2.2 Heterozygote Seren

Gemäß Prävalenz und Inzidenz standen mehr heterozygote als homozygote Seren zur Verfügung. Mit Ausnahme eines Serums (Serum 12 B, Messung 4) weisen alle Seren eine Enzymaktivität auf, die im Normbereich liegt. Auch die Messungen der heterozygoten Seren wurden mit einem Serumäquivalent von 40 U/L durchgeführt.

#### 3.2.2.1 Mivacurium und seine Isomere

Anders als bei Einsatz der homozygoten Seren kommt es in den Versuchsansätzen mit heterozygoten Seren zu einem deutlichen Umsatz des Substrates Mivacurium, wie unten stehende Abbildungen zeigen (Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21). Zu sehen sind dort die Konzentrationsverläufe unter Einsatz der zehn verschiedenen Patientenserum, die Mivacurium-Isomere sind einzeln erfasst.

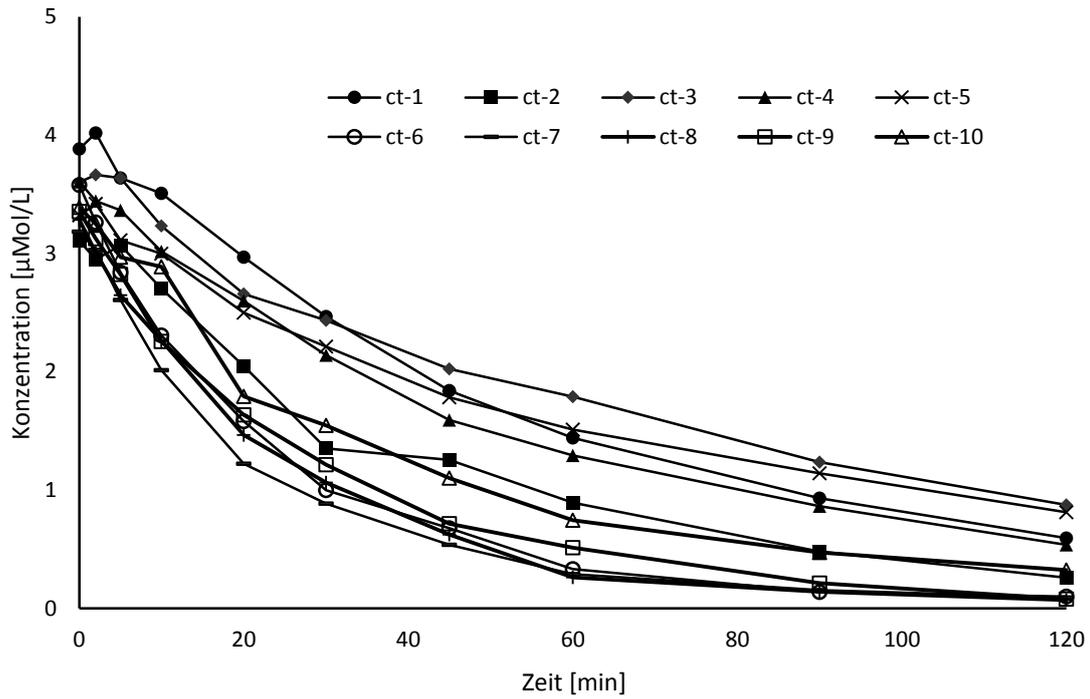
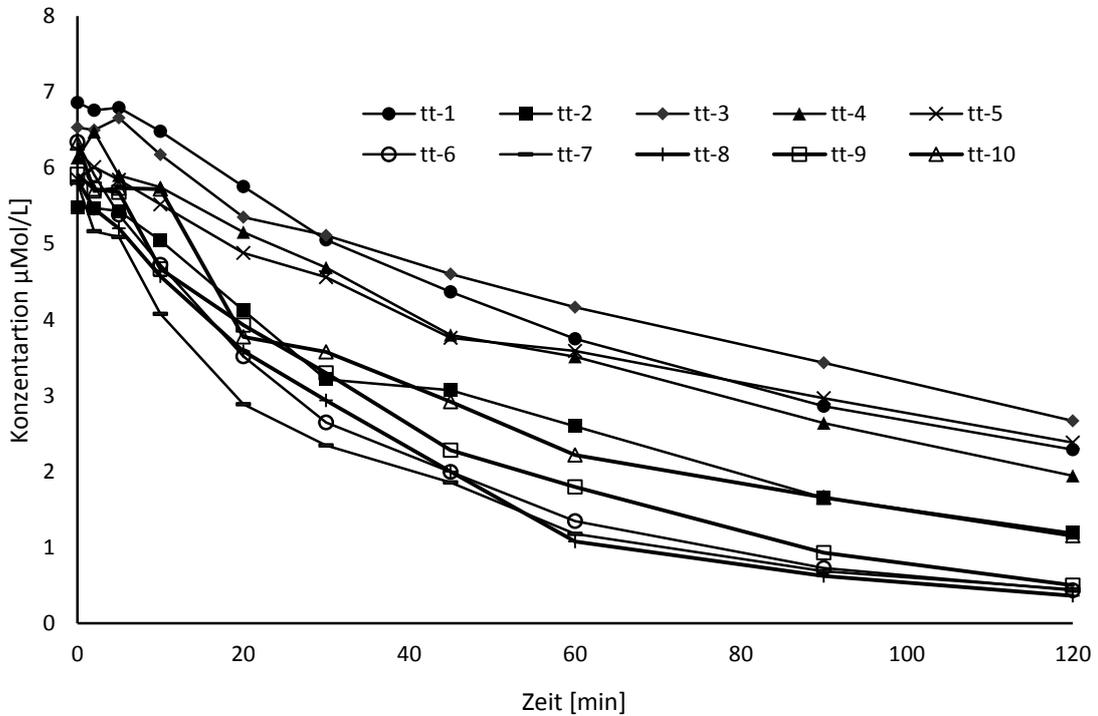
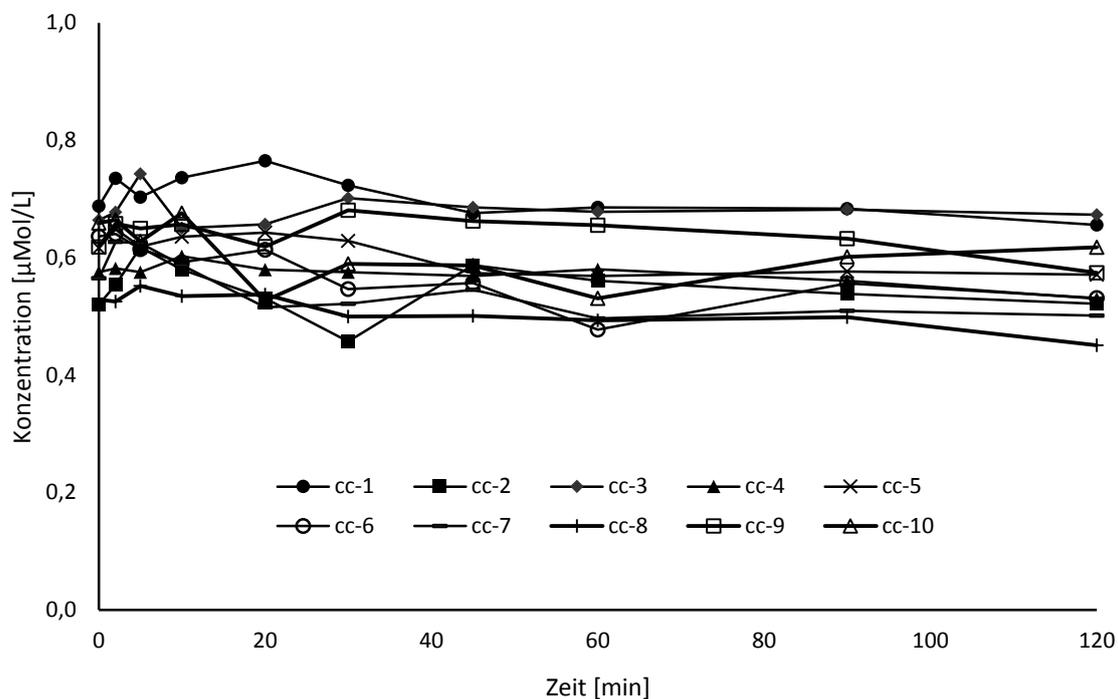
Abbildung 19: Einzelmessungen der heterozygoten Seren ( $n = 10$ ) – Konzentrationsverlauf Mivacurium-ctAbbildung 20: Einzelmessungen der heterozygoten Seren ( $n = 10$ ) – Konzentrationsverlauf Mivacurium-tt

Abbildung 21: Einzelmessungen der heterozygoten Seren ( $n = 10$ ) – Konzentrationsverlauf Mivacurium-cc

Insgesamt werden im Mittel  $7,87 \pm 1,18 \mu\text{Mol/L}$  (77,6%) des eingesetzten Mivacurium-Racemats innerhalb des 120-minütigen Messzeitraums umgesetzt. Die beiden trans-konfigurierten Isomere werden dabei zügig abgebaut: Das mengenmäßig am stärksten vertretene tt-Isomer (60,2% Racemat-Anteil) stellt 60,6% des Gesamtumsatzes und wird dabei zu 78,1% ( $4,77 \pm 0,85 \mu\text{Mol/L}$ ) metabolisiert. Mivacurium-ct, mit einem deutlich geringeren Anteil von 33,8% am Racemat, trägt zu 38,8% zum Mivacurium-Gesamtumsatz bei und wird dabei zu 89,1% abgebaut. Es wird statistisch signifikant mehr ct-Mivacurium als tt-Mivacurium abgebaut ( $p = 0,002$ ). Das cc-Isomer zeigt im Metabolisierungsansatz statistisch kein vom Spontanzerfall abweichendes Verhalten.

### 3.2.2.1.1 Halbwertszeiten

Die Halbwertszeiten für M-cc betragen im Mittel  $863 \pm 300$  Minuten. M-ct und M-tt werden mit Halbwertszeiten von  $35,6 \pm 14,4$  Minuten und  $55,0 \pm 24,4$  Minuten metabolisiert (s. Tabelle 19). Dabei wird M-ct statistisch signifikant ( $p = 0,002$ ) schneller metabolisiert als M-tt.

Tabelle 19: Halbwertszeiten aller untersuchten heterozygoten Seren ( $n = 10$ )

HWZ (min)	Serum heterozygot 40 U/L			Spontanzerfall (= Kontrolle)		
	cc	ct	tt	cc	ct	tt
1 B	873	43	72	7473	4769	8538
6 B	1376	33	54	1970	1487	1096
9 B	971	58	93	1027	1210	kein Wert
12 B	1066	43	68	1425	2315	1231
1349	623	58	89	kein Wert	kein Wert	kein Wert
1907	650	22	31	2690	1196	1638
1036	414	22	32	3173	2755	3889
1154	535	21	29	1238	1641	1892
547	1092	22	34	1148	1381	1491
45	1031	34	49	1395	1934	1450
<b>Mittelwert</b>	<b>863</b>	<b>36</b>	<b>55</b>	<b>2393</b>	<b>2076</b>	<b>2653</b>
<b>S.D.</b>	<b>300</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>2042</b>	<b>1136</b>	<b>2536</b>
<b>S.D.%</b>	<b>35</b>	<b>41</b>	<b>44</b>	<b>85</b>	<b>55</b>	<b>96</b>

Der Vergleich von Verum und Kontrolle zeigt bei den cc-Halbwertszeiten einen statistisch signifikant ( $p = 0,0039$ ) schnelleren Abbau des Isomers unter Verumbedingungen, der sich im statistischen Vergleich der cc-Konzentrationswerte (Verum/Spontanzerfall) nicht zeigt.

### 3.2.2.2 Metabolite

#### 3.2.2.2.1 Säure

Unter Einsatz der heterozygoten Seren entstanden nach 120 Minuten  $6,82 \pm 1,04 \mu\text{Mol/L}$  Säure absolut. Bezogen auf die umgesetzte Mivacuriummenge entspricht das einer Menge von 86,6% aus Mivacurium entstandenem Säuremetabolit, die sich mit 31,1% ( $2,45 \pm 0,2 \mu\text{Mol/L}$ ) cis-Säure und 55,5% ( $4,37 \pm 0,82 \mu\text{Mol/L}$ ) trans-Säure in einem Verhältnis von annähernd 1: 2 auf die beiden Strukturisomere verteilt. Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen in jeweils zehn Einzelmessungen die Konzentrationsverläufe der cis- bzw. trans-Säure bei Einsatz der heterozygoten Seren.

Abbildung 22: *cis*-Säure – Einzelmessungen der heterozygoten Seren ( $n = 10$ )

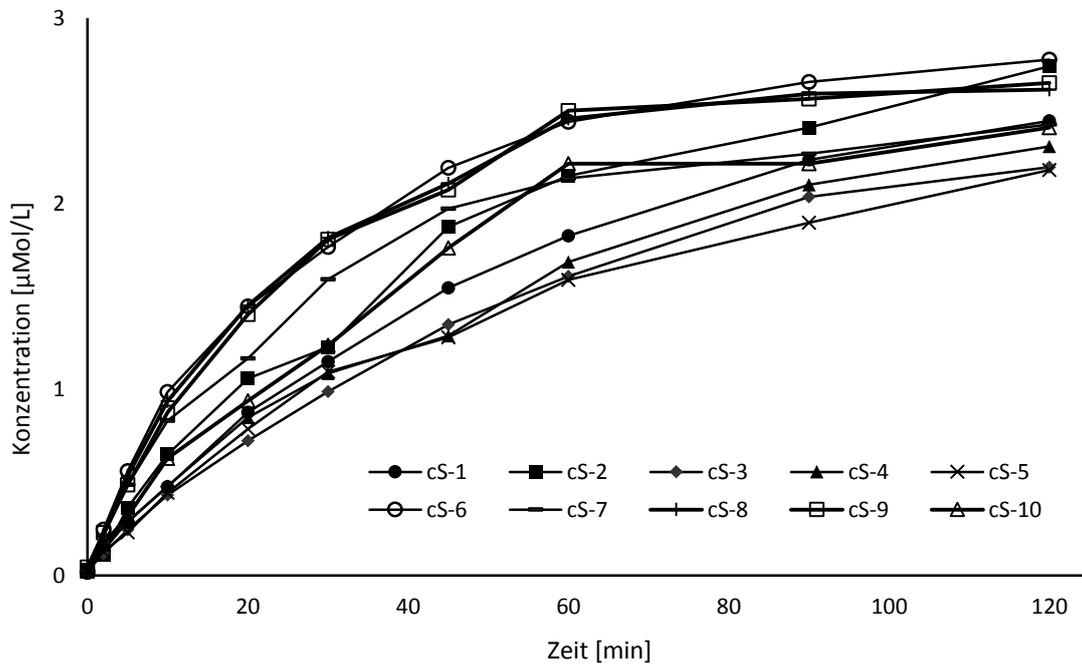
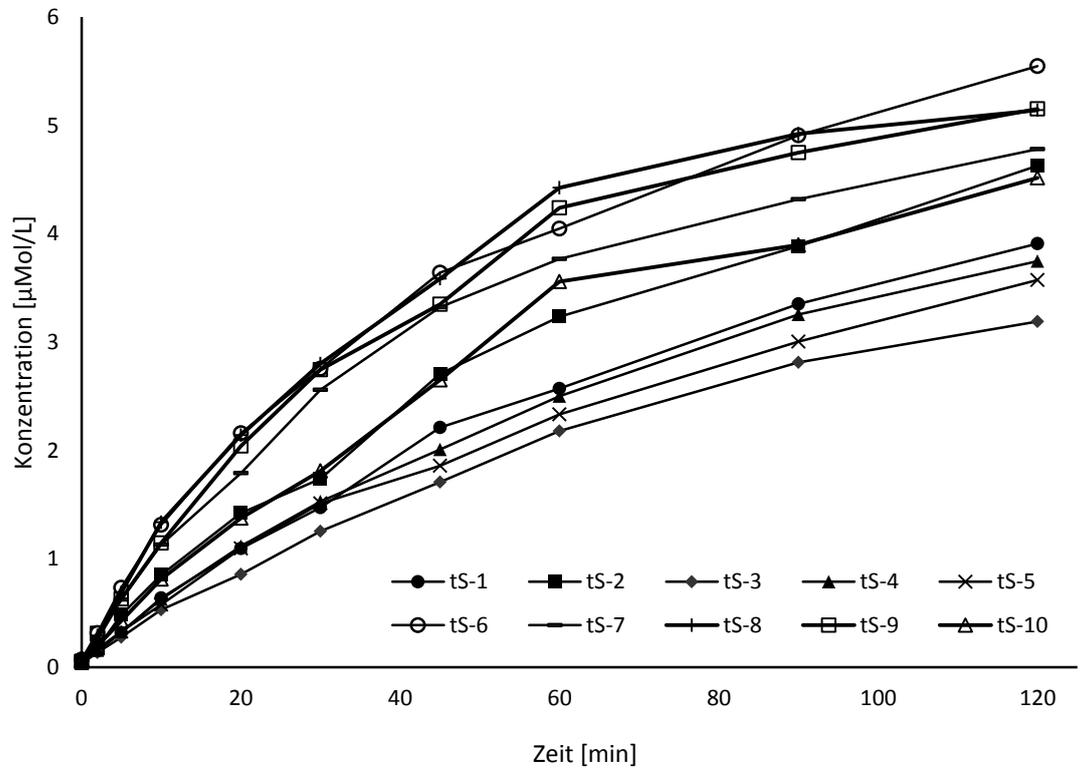


Abbildung 23: *trans*-Säure – Einzelmessungen der heterozygoten Seren ( $n = 10$ )



#### 3.2.2.2.2 Alkohol

Die Metabolisierung zum Alkoholmetaboliten erfolgt, wie auch bei Einsatz von Normalserum, fast ausschließlich in das trans-Isomer: Von  $8,55 \pm 1,43 \mu\text{Mol/L}$  (108,63%) Gesamtalkohol entfallen  $8,48 \pm 1,41 \mu\text{Mol/L}$  (107,73%) auf das trans-Isomer, nur  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{Mol/L}$  (0,89%) finden sich – mit einem statistischen Unterscheid zum Spontanzerfall – als cis-Alkohol wieder. Analog zu Kapitel 3.2.2.2.1 zeigt Abbildung 24 in Einzelmessungen die Konzentrationsverläufe des cis-Alkohol, Abbildung 25 die des trans-Alkohol bei Einsatz heterozygoter Seren.

Abbildung 24: *cis*-Alkohol – Einzelmessungen der heterozygoten Seren ( $n = 10$ )

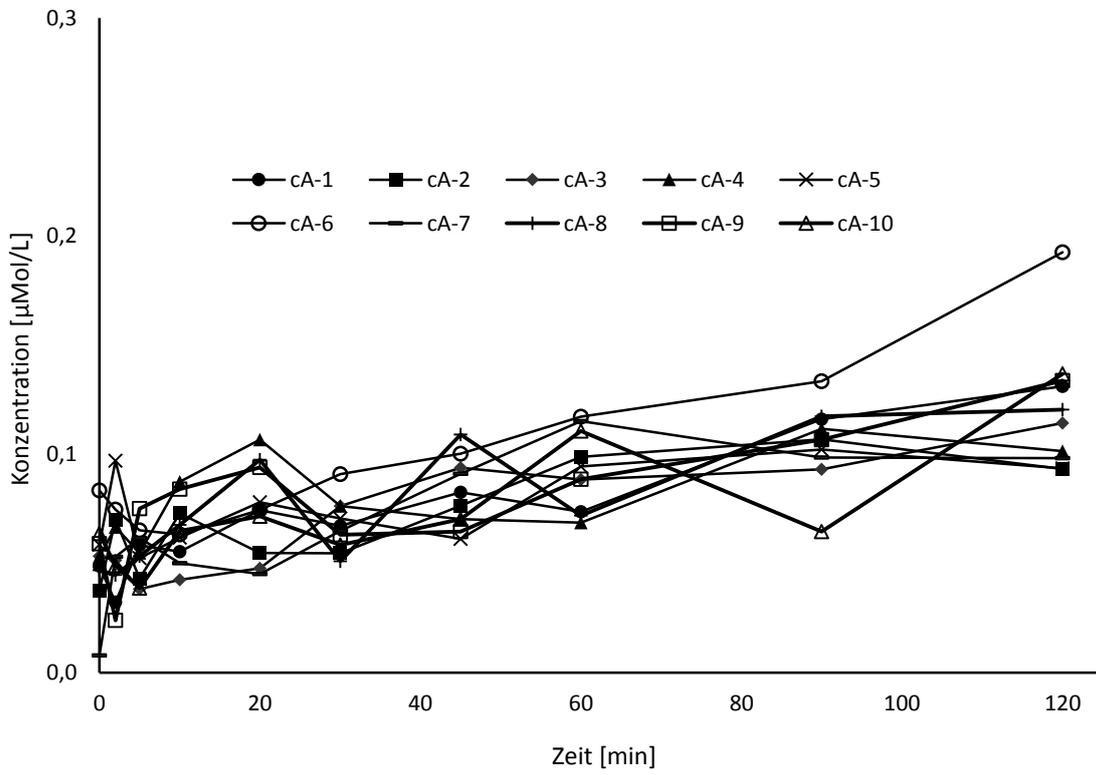
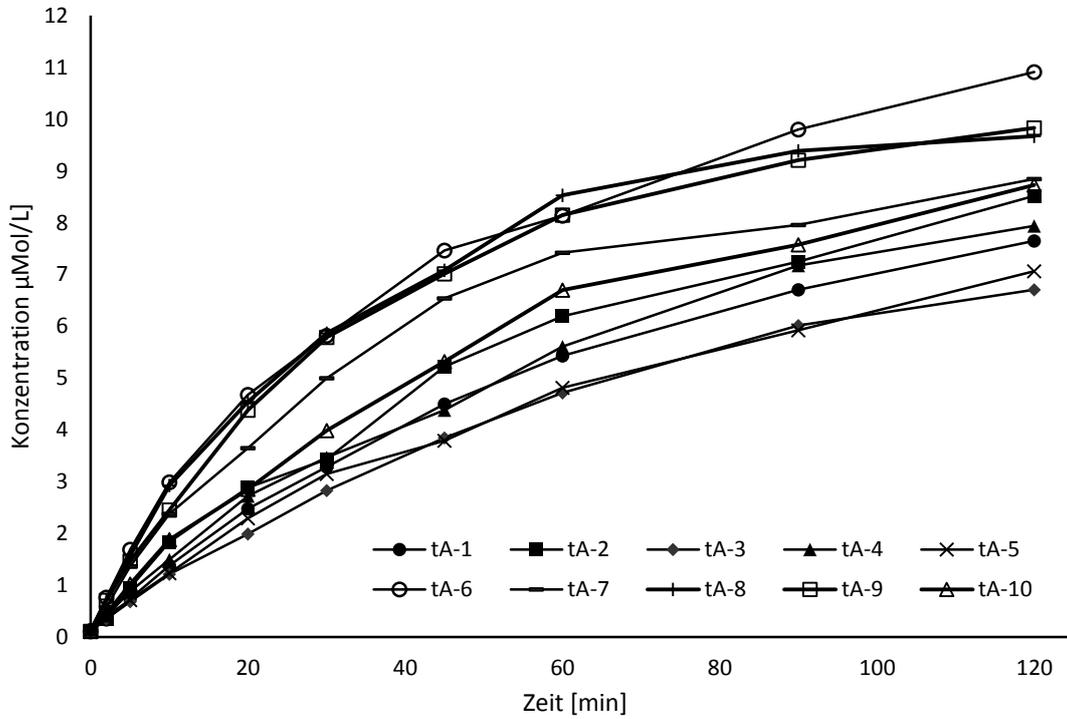


Abbildung 25: *trans*-Alkohol – Einzelmessungen der heterozygoten Seren ( $n = 10$ )

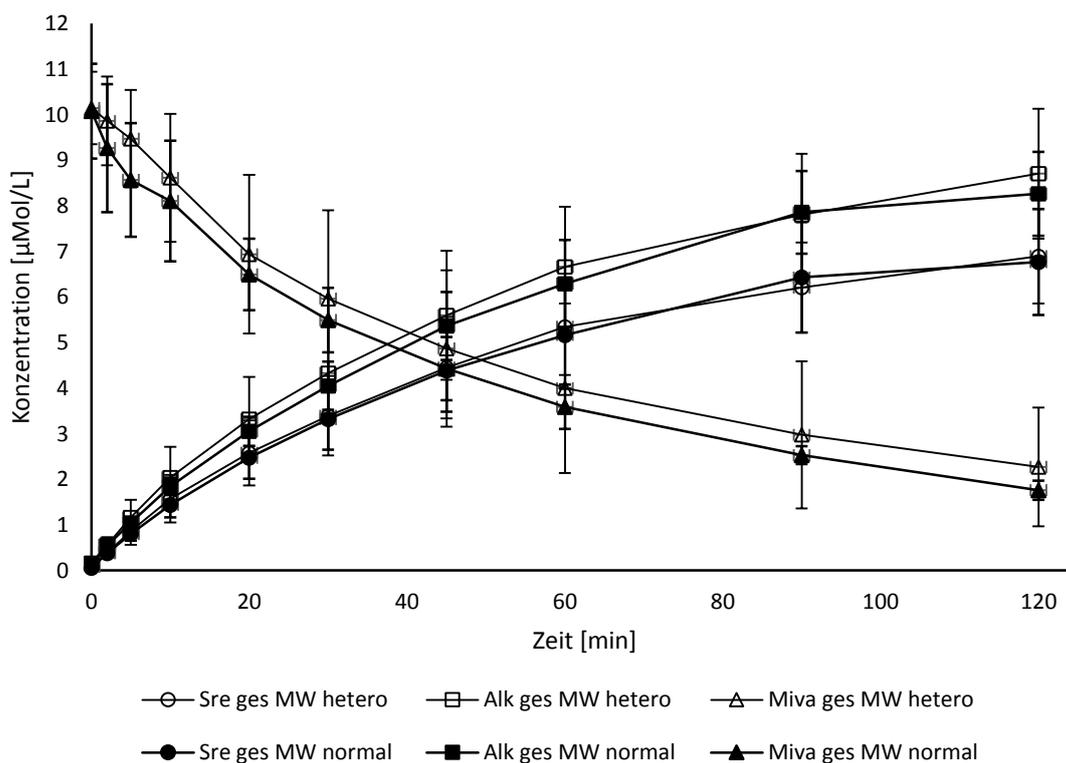


### 3.2.3 Gegenüberstellung: Atypische Seren vs. Normalserum

Wie die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen konnten, setzen die fünf analysierten homozygoten Seren innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 120 Minuten keine relevanten Substratmengen um. Sowohl der gemessene Substratabbau, als auch die Mivacurium-Halbwertszeiten und die entstandenen Metabolitmengen unterscheiden sich nicht statistisch signifikant von den Werten eines Mivacurium-Spontanzersfalls.

Die Messergebnisse bei Einsatz heterozygoter Seren weisen eine andere Richtung. Wie Abbildung 26 anhand der Konzentrationsverläufe von Substrat und Metaboliten grafisch nahelegt, entsprechen in dieser Studie die Metabolisierungsverläufe unter Einsatz von heterozygoten Seren denen bei Verwendung eines Normalserums.

Abbildung 26: Metabolisierungsverläufe des Substrats Mivacurium (Miva ges) und seines Alkohol-(Alk ges) und Säure-(Sre ges) Metaboliten – heterozygote Seren (n = 10) versus Normalserum (n = 7); dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung



### 3.2.3.1 Umsatz und Umsatzkapazität

Beim Vergleich der absolut umgesetzten Mivacuriummengen lässt sich kein statistisch bedeutsamer Unterschied zwischen den untersuchten heterozygoten Seren und Normalserum nachweisen: Weder setzen die heterozygoten Seren insgesamt signifikant weniger Mivacurium um als ein reguläre Pseudocholinesterase enthaltendes Serum, noch kommt es zu einer deutlichen Bevorzugung oder Benachteiligung eines der Substrat-Isomere (Tabelle 20).

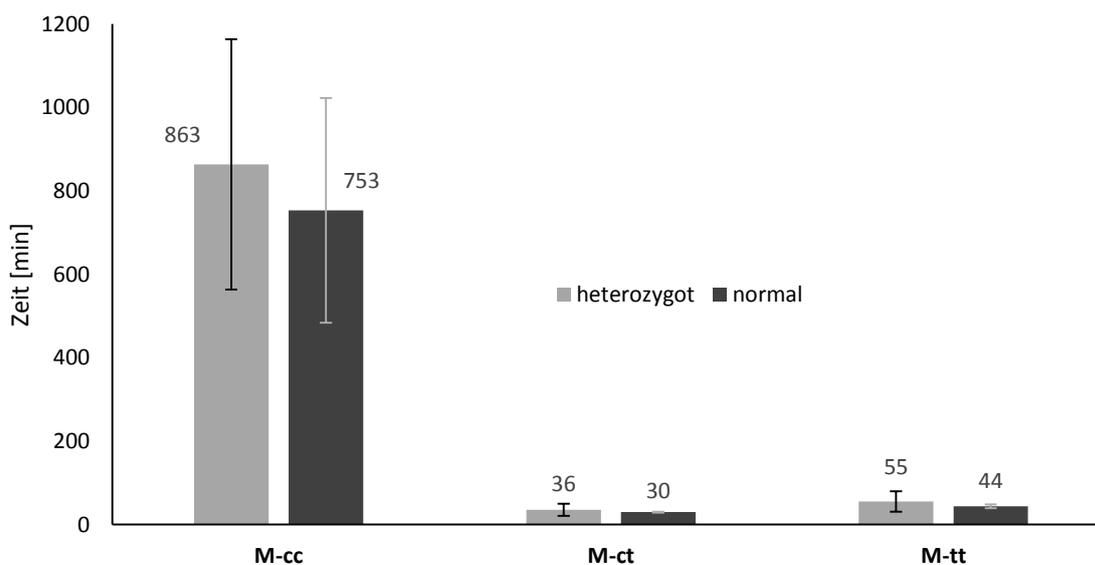
Tabelle 20: Mivacurium-Umsatz absolut und prozentual (bezogen auf die eingesetzte Substratmenge) sowie die daraus abgeleitete PChE-Kapazität im Vergleich – Normalserum versus heterozygote Seren

	M_Umsatz absolut $\mu\text{Mol/L}$				M_Umsatz prozentual %		Ums_Kap_PChE [ $\mu\text{Mol/L}$ ]/U/min	
	hetero	S.D.	normal	S.D.	hetero	normal	hetero	normal
<b>M-cc</b>	0,04	0,03	0,09	0,04	7,3	12,6	9,2095E-06	1,8653E-05
<b>M-ct</b>	3,06	0,33	3,22	0,33	89,1	93,9	0,00064	0,00067
<b>M-tt</b>	4,77	0,85	5,00	0,57	78,1	84,3	0,00099	0,00104
<b>M-ges</b>	<b>7,87</b>	<b>1,18</b>	<b>8,32</b>	<b>0,90</b>	<b>77,6</b>	<b>82,5</b>	<b>0,00164</b>	<b>0,00173</b>

### 3.2.3.2 Halbwertszeiten

Der Vergleich der Halbwertszeiten der Mivacurium-Isomere erbringt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Verwendung von Normalserum und dem Einsatz heterozygoter Seren mit  $p = 0,379$  für M-cc,  $p = 0,494$  für M-ct und  $p = 0,558$  für M-tt.

Abbildung 27: Mittelwerte und Standardabweichungen der Halbwertszeiten heterozygoter Seren ( $n = 10$ ) im Vergleich mit Normalserum ( $n = 7$ )



### 3.2.3.3 Metabolitentstehung und Recovery

Im Vergleich der absolut entstandenen Metabolitmengen lässt sich statistisch kein Unterschied feststellen in Abhängigkeit von der Art der eingesetzten Pseudocholinesterase bzw. des Serums: Säure- und Alkoholmetabolit entstehen zu gleichen Anteilen bei Verwendung von Normalserum ebenso wie bei Einsatz heterozygoter Seren; auch die Verteilung auf cis- bzw. trans-Metabolite innerhalb der Metabolitracemate verhält sich gleichsinnig ohne statistisch belegbaren Unterschied (s. Abbildung 28 und Abbildung 29). Eine Ausnahme stellt die unter Einsatz heterozygoter Seren entstandene Absolutmenge an cis-Alkohol dar: Hier entsteht mit  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{Mol/L}$  signifikant ( $p = 0,0018$ ) mehr cis-Alkohol als bei Verwendung von Normalserum ( $0,03 \pm 0,02 \mu\text{Mol/L}$ ).

Abbildung 28: Absolutmengen (Mittelwert und Standardabweichung) des entstandenen Säuremetaboliten, aufgeschlüsselt nach cis- und trans-Isomeren – Normalserum ( $n = 7$ ) und heterozygote Seren ( $n = 10$ ) im Vergleich

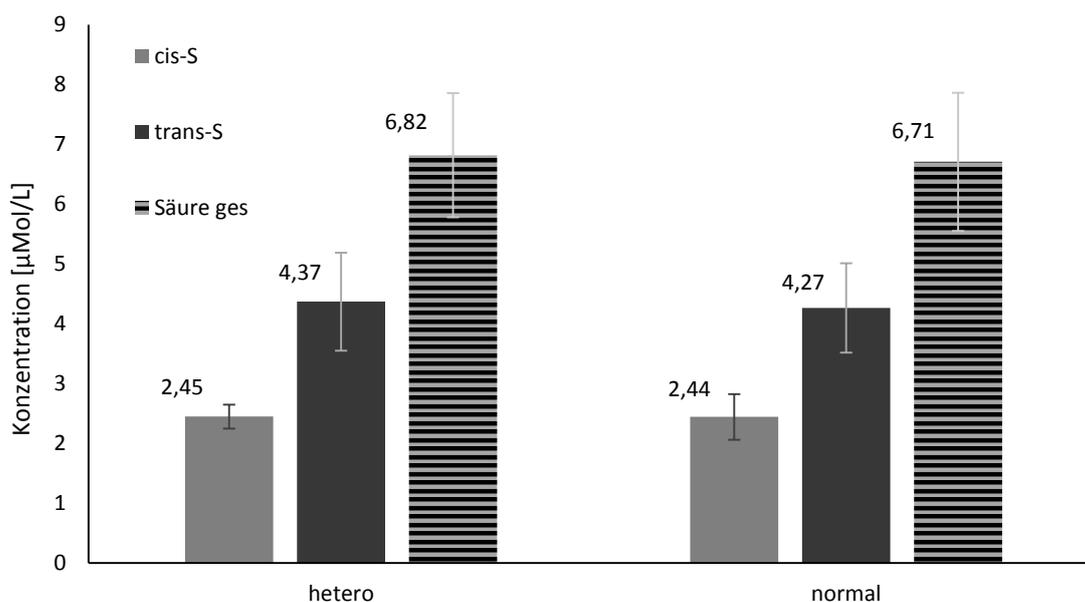
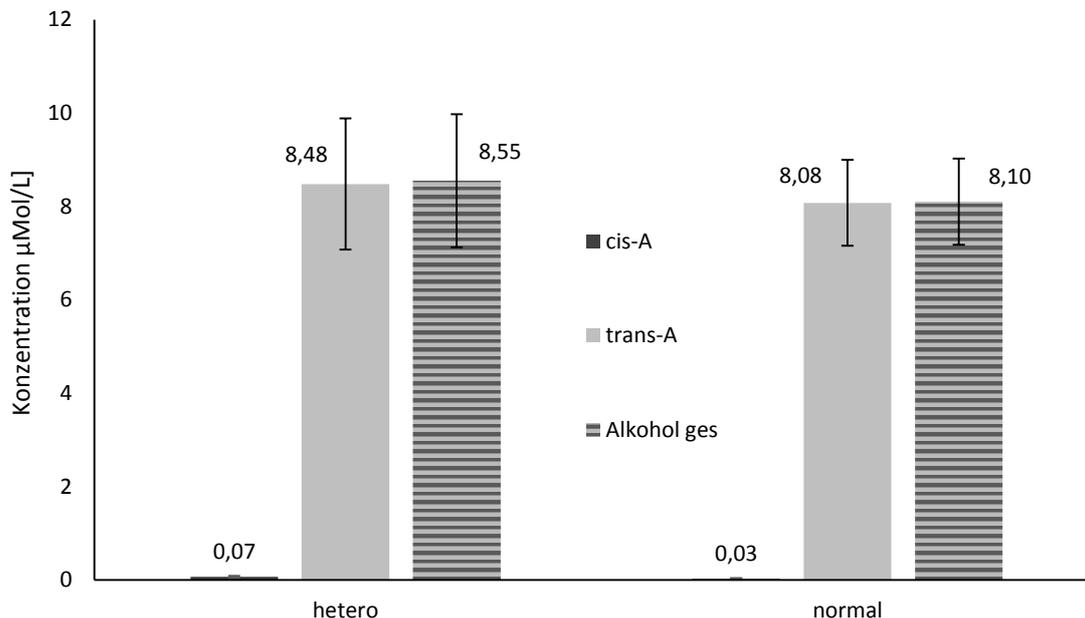


Abbildung 29: Absolutmengen (Mittelwert und Standardabweichung) des entstandenen Alkoholmetaboliten, aufgeschlüsselt nach cis- und trans-Isomeren – Normalserum (n = 7) und heterozygote Seren (n = 10) im Vergleich



Ähnlich ausgeglichen stellt sich die Wiederfindung dar: Bezogen auf die absolut umgesetzte Menge Substrat (Mivacurium) entstehen prozentual gesehen vergleichbare Mengen an Säure und Alkohol sowie an cis- und trans-konfigurierten Metabolit-Gruppen bei einer etwas höheren Gesamtwiederfindung unter Einsatz heterozygoter Seren (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Prozentuale Anteile der aus Mivacurium entstandenen Säure- und Alkoholmengen sowie Verteilung auf cis- bzw. trans-Gruppen – Normalserum versus heterozygote Seren

Normalserum				heterozygot			
Umsatz_M	8,32		µMol/L	Umsatz_M	7,87		µMol/L
umgesetzt zu (%)				umgesetzt zu (%)			
	cis	trans	Σ		cis	trans	Σ
<b>Sre</b>	29,4	51,3	<b>80,7</b>	<b>Sre</b>	31,1	55,5	<b>80,7</b>
<b>Alk</b>	0,3	97,1	<b>97,4</b>	<b>Alk</b>	0,9	107,7	<b>97,4</b>
<b>Σ</b>	<b>29,7</b>	<b>148,4</b>		<b>Σ</b>	<b>32,0</b>	<b>163,2</b>	
<b>Wiederfindung %</b>			<b>178,1</b>	<b>Wiederfindung %</b>			<b>195,3</b>

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende wesentliche Ergebnisse gefunden:

1. Mivacurium wird *in-vitro* durch Seren mit homozygot-atypischer Pseudocholinesterase nicht metabolisiert: Die Halbwertszeiten von Mivacurium und seinen Isomeren unterscheiden sich nicht signifikant von denen unter Spontanzerfall der Substanz.
2. Normale Pseudocholinesterase setzt auch *in-vitro* bevorzugt die trans-konfigurierten Mivacurium-Isomere um. Nach 120 Minuten sind 94% des initial gemessenen ct-Isomers und 84% des tt-Isomers abgebaut, während nur 13% des cc-Mivacurium metabolisiert werden.
3. Normalserum-PChE und Seren mit heterozygot-atypischer Pseudocholinesterase bauen Mivacurium *in-vitro* nach dem gleichen Muster ab, auch die prozentuale Verteilung der entstehenden Metabolite weist keinen signifikanten Unterschied auf.
4. Die Absenkung der Metabolisierungstemperatur von 37°C auf 27°C führt *in-vitro* bei Einsatz von Normalserum zu einer deutlichen Verlängerung der Halbwertszeiten aller Isomere etwa um den Faktor 3.

In einzelnen Punkten sind die erhobenen Daten unerwartet bzw. uneinheitlich, daher sollen im Folgenden Einzelheiten der Versuchsanordnung und der Daten beleuchtet und, sofern möglich, in Bezug gesetzt werden zu Bedingungen und Ergebnissen themenverwandter Studien anderer Untersucher. Schließlich werden Ansatzpunkt und Idee für weiterführende Untersuchungen genannt und entwickelt.

### 4.1 Methodik

#### 4.1.1 Seren

##### 4.1.1.1 Kategorisierung der Seren

Die Auswahl der atypischen Seren für diese Studie bzw. ihre Einordnung in die Kategorie *homozygot* oder *heterozygot* erfolgte ausschließlich anhand ihrer Dibucainzahlen. Abweichend von den Vorgaben nach Knedel und Böttger [48] wurden Seren für diese Studie mit einer Dibucainzahl von kleiner oder gleich 40 als homozygot eingestuft, solche mit

Dibucainzahlen zwischen 41 und 78 als heterozygot. Beobachtungen (mündliche Mitteilung R. Laubinger) im Rahmen der Screening-Studie von Laubinger [58] hatten die Vermutung nahegelegt, dass eine solchermaßen abgeänderte Eingruppierung das klinische Metabolisierungsverhalten der Seren besser wiedergibt. Auch unter Anwendung dieser weiter gefassten Grenzwerte erwies sich nachträglich in Anbetracht der Analyseergebnisse ein Serum als falsch eingestuft: Serum 8 B, mit einer Dibucainzahl von 41 nach obigen Kriterien formal den heterozygoten Seren zuzuordnen, muss aufgrund seines Metabolisierungsverhalten als homozygot-atypisch betrachtet werden.

#### **4.1.1.2 PChE-Konzentration**

Die Versuchsansätze der vorliegenden Studie sind mit einer PChE-Aktivität von lediglich 40 U/L versehen – einem Bruchteil der Aktivität eines undiluierten Normalserums. Die Wahl einer so geringen Enzymmenge erfolgte bewusst: Bei Voruntersuchungen mit PChE-Konzentrationen, die physiologischen Bedingungen entsprachen (5000 U/L), fand die Metabolisierung so schnell statt, dass nicht ausreichend Datenpunkte zur genauen Analyse der Abbaukinetik erhoben werden konnten.

Auf den Zusatz von Albumin zum Reaktionsansatz wurde verzichtet, um eine Beeinflussung der PChE-Funktion auszuschließen.

### **4.1.2 Analytik**

#### **4.1.2.1 HPLC - Methode**

Die Analyse der Proben erfolgte nach der von Biederbick [11] 1996 etablierten und veröffentlichten Methode. Andere bis dahin bekannte HPLC-Methoden [16, 55] erforderten relativ große Blutprobenvolumina und waren nicht geeignet zur Messung sowohl von Mivacurium als auch seiner Metabolite innerhalb eines einzigen Analyseschrittes.

Biederbick arbeitet mit einem Gradienten für die mobile Phase, um nach den vier verschiedenen Metabolisomeren auch die drei Substratisomere von der Säule ablösen zu können. Im Rahmen der Etablierung der Methode für die vorliegende Studie war es notwendig, statt mit einem Gradientensprung mit einer stufenweise Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase zu arbeiten, um eine saubere Trennung der Mivacurium-Peaks zu erhalten. Möglicherweise spielten spezifische Eigenschaften der jeweiligen Säule als stationäre Phase hier eine Rolle. So war festzustellen, dass neben der Art der

Packung der Säulen (identisches Füllmaterial gepackt durch verschiedene Säulenlieferanten) auch ein Wechsel herstellergleicher Säulen eine Veränderung des Chromatogrammbildes nach sich ziehen konnte.

Die etablierten Bestimmungsgrenzen der HPLC-Methode nach Biederbick wurden in dieser Studie nicht unterschritten. Eine Ausnahme stellen einzelne Bestimmungen des cis-Säuremetaboliten zum Zeitpunkt 0 Minuten dar: vereinzelt wurde dort die Bestimmungsgrenze von 0,011  $\mu\text{Mol/L}$  geringfügig unterschritten.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Normalserum

#### 4.2.1.1 Abbaumuster und Halbwertszeiten

*In-vitro* setzt normale Serum-Pseudocholinesterase in der vorliegenden Studie bevorzugt die trans-konfigurierten Mivacurium-Isomere um. Nach 120 Minuten sind bei einer Halbwertszeit von  $29,7 \pm 1,34$  Minuten 94% des initial gemessenen ct-Isomers und 84% des tt-Isomers (HWZ  $43,9 \pm 4,74$  Minuten) abgebaut; dabei wird Mivacurium-ct statistisch signifikant bevorzugt und schneller abgebaut als Mivacurium-tt. Nur 13% des cc-Mivacurium werden metabolisiert (HWZ  $752 \pm 269$  Minuten); der Verum-Abbau von M-cc unterscheidet sich während des Beobachtungszeitraumes nicht von dem des Spontanzerfalls.

Laurin [59] fand, ebenfalls *in-vitro*, demgegenüber einen nahezu kompletten Abbau beider trans-konfigurierten Isomere (cis-trans zu 98%; trans-trans zu 100%) innerhalb von etwa 4 Minuten, während cis-cis nach 120 Minuten noch zu 30% unmetabolisiert nachgewiesen werden konnte. Dieser ungleich schnellere Metabolismus von cis-trans und trans-trans ist in einem anderen Konzentrationsverhältnis von Serum bzw. Pseudocholinesterase auf der einen und Substrat auf der anderen Seite begründet: Laurin inkubierte die einzelnen Mivacurium-Isomere in einer Konzentration von  $4,37 \mu\text{Mol/L}$  (M-tt),  $2,43 \mu\text{Mol/L}$  (M-ct) und  $0,49 \mu\text{Mol/L}$  (M-cc) in *undiluiertem* Plasma. Über die genaue Aktivität der Pseudocholinesterase wird keine Angabe gemacht, es handelt sich um gesunde Probanden.

Die Versuchsansätze der vorliegenden Studie sind mit einer PChE-Aktivität von lediglich 40 U/L versehen – einem Bruchteil der Aktivität eines undiluierten Normalserums. Die

Konzentration des Substrats Mivacurium im Versuchsansatz ist auf 10  $\mu\text{Mol/L}$  eingestellt – entlang der Isomeranteile ergeben sich daraus Konzentrationen von 5,7  $\mu\text{Mol/L}$  für M-tt, 3,7  $\mu\text{Mol/L}$  für M-ct und 0,6  $\mu\text{Mol/L}$  für M-cc; insgesamt etwas höher als die von Laurin verwendeten Konzentrationen.

Eine direkte Vergleichbarkeit der Halbwertszeiten ist wegen dieses großen Unterschieds in der PChE-Aktivität nicht gegeben. Ebenso wie die aufgeführten *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien (s. Tabelle 22 und Tabelle 23) zeigt aber auch die vorliegende Studie eine kürzere Halbwertszeit für M-ct im Vergleich zu M-tt. Das unterstützt die Annahme, dass das cis-trans-Isomer möglicherweise aufgrund geringerer sterischer Hinderung [29, 36, 59] besser zugänglich ist für den Angriff der Pseudocholinesterase als das trans-trans konfigurierte Isomer und daher bevorzugt abgebaut wird. Dabei reichen die Unterschiede der Halbwertszeiten (M-ct vs. M-tt) von rund 5% *in-vivo* [60] bis zu etwa 20% *in-vitro* [101]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine um 32% kürzere Halbwertszeit für M-ct (29,7  $\pm$ 1,34 Minuten) im Vergleich zu M-tt (43,9  $\pm$ 4,74 Minuten) gefunden.

Tabelle 22: Aufstellung der in-vitro-Arbeiten – Halbwertszeiten, PChE-Aktivität (Akt. PChE), Substratkonzentrationen (Konz. Miva): Laurin [59]; Wiesner [101]; Lien [60] (personal communication); Cook [19]; \*\* nur Bestimmung der Racemat-Halbwertszeit

Autor	Laurin	Wiesner	Lien	eigene Arbeit	Cook 1989
<b>HWZ min.</b>			(pers. comm.)		**
tt	0,89	0,76	0,83	43,9	1. 3,1
ct	0,756	0,61	1,3	29,7	2. 5,6
cc	67,2	nicht bestimmt	276	752	3. 9,4 4. 17 5. 34,4
<b>Akt. PChE U/L</b>	keine Angabe (gesund)	5800	keine Angabe	40	1. 2900 2. 1490 3. 760 4. 440 5. 180
<b>Konz. Miva <math>\mu\text{Mol/L}</math></b>					
tt	4,37	18 $\mu\text{Mol}$ auf 4 ml?	keine Angabe	5,7	18 $\mu\text{mol/L}$
ct	2,43	18 $\mu\text{Mol}$ auf 4 ml?	keine Angabe	3,7	
cc	0,49	nicht bestimmt	keine Angabe	0,6	

Tabelle 23: Aufstellung der in-vivo-Arbeiten – Halbwertszeiten, PChE-Aktivität (Akt. PChE) und Substratkonzentrationen (Konz. Miva): Lacroix [56], Head-Rapson [40], Lien [60], Cook [20]

Autor	Lacroix	Head-Rapson	Lien	Cook 1992
<b>HWZ min.</b>				
tt	2,4	2,3	1,9	1,8
ct	2	2	1,8	1,4
cc	28,5	68	52,9	22
<b>Akt. PChE U/L</b>	keine Angaben (ASA I und II)	932 U/L (620-1370 normal)	13,9 U/L (8-18 normal)	keine Angaben (ASA I und II)
<b>Konz. Miva</b>	0,15 mg/kg Bolus	Infusion 15 $\mu\text{g/kg/min}$ , dann 7,5 $\mu\text{g/kg/min}$	Infusion 5 $\mu\text{g/kg/min}$ , dann 10 $\mu\text{g/kg/min}$	0,15 mg/kg Bolus

Die von Lien genannten *in-vitro*-Halbwertszeiten wurden nicht im Rahmen einer Studie veröffentlicht, sondern als Gesprächsmittelung zitiert. Warum die für Mivacurium-ct ermittelte Halbwertszeit von denen der anderen Studien so deutlich abweicht, bleibt unklar.

#### 4.2.1.2 Metabolitmuster und Recovery

Bislang bestand keine genaue Kenntnis darüber, nach welchem Muster die unterschiedlichen Mivacurium-Isomere metabolisiert werden, insbesondere war unklar, zu welchem Prozentsatz das ct-Isomer an seiner cis- bzw. trans-benachbarten Esterbindung angegriffen wird. Eine Spaltung an der cis-Endung führt zur Bildung von cis-Alkohol und trans-Säure – im umgekehrten Fall entstehen trans-Alkohol und cis-Säure. Klarheit herrschte lediglich darüber, dass die ct-Metabolisierung, wie auch die der beiden anderen Isomere, in zwei Schritten abläuft: Im ersten Schritt entstehen Säure *und* Alkohol, in einem zweiten, wesentlich langsameren Schritt, wird die dabei entstandene Säure ebenfalls zu Alkohol weiter metabolisiert.

V. Nigrovič (persönliche Mitteilung) stellte bereits gegen Mitte der 1990er Jahre Überlegungen zu einem Metabolisierungsmodell an. Dabei stellt er u.a. die beiden Möglichkeiten der Spaltung des ct-Isomers einander gegenüber und postuliert anhand eigener Untersuchungsergebnisse, dass die Pseudocholinesterase das Mivacurium-Molekül generell bevorzugt an der trans-konfigurierten Ester-Endung angreife und somit auch das ct-Isomer bevorzugt von seiner trans-Endung her gespalten werde. Das würde dazu führen, dass aus ct-Mivacurium zu gleichen Teilen trans-Alkohol und cis-Säure entsteht (und *nicht* cis-Alkohol und trans-Säure), wobei die cis-Säure im zweiten Schritt zu cis-Alkohol weiter metabolisiert wird. Unter Berücksichtigung der prozentualen Anteile der Mivacurium-Isomere am Racematgemisch und unter der Annahme, dass aus cc-Mivacurium zu gleichen Teilen cis-Säure und cis-Alkohol sowie aus tt-Mivacurium zu ebenfalls gleichen Teilen trans-Alkohol und trans-Säure werden, lassen sich die in Tabelle 24 und Tabelle 25 dargestellten Modellrechnungen A und B aufmachen. Vorausgesetzt wird dabei weiterhin, dass aus einem Molekül Substrat (Mivacurium) letztlich zwei Moleküle Metabolit entstehen; daraus ergibt sich eine rechnerische Recovery von 200%.

Tabelle 24: Modell A nach Nigrovič (Angabe der Isomeranteile am Mivacurium-Racemat in Prozent)

Modell A	tA	cA	tS	cS	Gesamt
ct	34%	34%	34%		
tt	60%	60%	60%		
cc	6%	6%		6%	
	60%	40%	94%	6%	200%
eigene Werte	97%	0,3%	51%	29%	178%

Tabelle 25: Modell B nach Nigrovič (Angabe der Isomeranteile am Mivacurium-Racemat in Prozent)

Modell B	tA	cA	tS	cS	Gesamt
ct	34%	34%		34%	
tt	60%	60%	60%		
cc	6%	6%		6%	
	94%	6%	60%	40%	200%
eigene Werte	97%	0,3%	51%	29%	178%

Die Gegenüberstellung dieser Modelle mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, als letzte Zeile in beiden Tabellen eingefügt, zeigt eine gute Übereinstimmung mit Rechenmodell B und unterstützt Nigrovičs These, dass das ct-Isomer bevorzugt, wenn nicht gar ausschließlich, von seiner trans-Endung her gespalten wird. Gleichzeitig wird deutlich, dass die in der vorliegenden Studie innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 120 Minuten erlangten Ergebnisse überwiegend den ersten der beiden Metabolisierungsschritte abbilden. Kleine Abweichungen von den Modellzahlen dürften u.a. in einer noch nicht vollständigen Aufspaltung der Substratmenge begründet sein: Nach 120 Minuten liegen 7% des ct- und 16% des tt-Isomers noch unverändert vor; M-cc wird quasi nicht metabolisiert. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass zumindest kleine Mengen des Säure-Metaboliten (insbesondere trans-Säure, s.u.) bereits den zweiten Metabolisierungsschritt durchlaufen haben und weiter zu Alkohol abgebaut worden sind.

Die Studie von Laurin [59], in der, im Gegensatz zur vorliegenden Studie, die drei *isolierten* Mivacurium-Isomere in Normalserum inkubiert werden, unterstützt diese Ergebnisse. Laurin konnte beweisend zeigen, dass *in-vitro* aus dem tt-Isomer zu gleichen Teilen trans-Säure und trans-Alkohol und aus dem cc-Isomer – wesentlich langsamer – zu gleichen Teilen cis-Säure und cis-Alkohol entstehen, während das isolierte ct-konfigurierte Isomer hingegen fast ausschließlich zu trans-Alkohol (cis-Alkohol <1%) und cis-Säure im Verhältnis von 1:1 abgebaut wird. Anders als in der vorliegenden Studie verfolgt Laurin den zweiten, deutlich langsameren Metabolisierungsschritt des entstandenen intermediären Säuremonoesters weiter zu Alkohol nicht innerhalb desselben Assays, sondern inkubiert ein *isoliertes* Säuremonoester-Racemat (26,3% cis-Säure, 66,3% trans-Säure) für eine Dauer von 420 Minuten und bildet damit den zweiten Metabolisierungsschritt unabhängig vom ersten ab. Dabei zeigt sich, dass die trans-Säure *in-vitro* relativ zügig zu trans-Alkohol gespalten wird, während die cis-Säure auch nach 420 Minuten fast unverändert vorliegt, die Weitermetabolisierung von cis-Säure zu cis-Alkohol also deutlich langsamer vor sich geht. Laurin geht davon aus, dass bei der vollständigen Metabolisierung von Mivacurium aus 100% Substrat letztlich 200% Alkohol-Metabolit entstehen – wobei sie Hinweise sieht, dass der enzymatische Abbau bei der *in-vivo*-Elimination des cis-Säure-Metaboliten möglicherweise nur eine geringe Rolle spielt.

Die von Nigrovič angestellten Überlegungen lassen sich mit Kenntnis der Studie von Laurin weiterführen und um den zweiten Metabolisierungsschritt ergänzen. Da Laurin *in-vitro* zeigen konnte, dass Mivacurium-ct (fast) ausschließlich zu cis-Säure und trans-Alkohol gespalten wird und auch die Metabolisierung des Säuremetaboliten isoliert weiterverfolgt hat, können nun Aussagen darüber getroffen werden, in welchem Verhältnis zueinander die beiden Endprodukte trans-Alkohol und cis-Alkohol zu Ende der vollständigen Mivacurium-Metabolisierung stehen. Tabelle 26 zeigt das um den zweiten Metabolisierungsschritt erweiterte Modell B, Tabelle 27 die analogen Berechnungen auf der Basis der Zahlen der vorliegenden Studie: Rein rechnerisch führt die vollständige Mivacurium-Metabolisierung zur Entstehung von 200% Alkoholmetabolit im Verhältnis von näherungsweise 3:1 zugunsten des trans-Alkohol.

Tabelle 26: Modell B nach Nigrovič, erweitert um den 2. Metabolisierungsschritt nach Laurin

**MODELL B**

2. Metabolisierungsschritt			tA	cA	
tS	60%		60%	6%	
	cS	40%		40%	
		$\Sigma$	154%	46%	200%

Anhand Tabelle 27 ist ersichtlich, dass in der vorliegenden Untersuchung die angenommenen Modellzahlen aus Tabelle 26 bei ausreichender Metabolisierungsdauer näherungsweise erreicht werden, wenn man in Betracht zieht, dass das eingesetzte Substrat nicht restlos, sondern innerhalb des Beobachtungszeitraums von 120 Minuten nur zu rund 83% umgesetzt wurde. Für den cis-Alkohol ergibt sich eine größere Diskrepanz, die u.a. in der von 200% abweichenden Gesamtwiederfindung begründet sein mag.

Tabelle 27: Modell B nach Nigrovič/Laurin mit den Zahlen der vorliegenden Studie

**vorliegende Studie**

2. Metabolisierungsschritt			tA	cA	
tS	51%		51%	0,3%	
	cS	29%		29%	
		$\Sigma$	148%	30%	178%

Insgesamt untermauern die Ergebnisse der vorliegenden Studie sowohl die Untersuchungen von Laurin als auch die Richtigkeit des von Nigrovič postulierten Modells bezüglich des ct-Metabolismus.

**4.2.1.3 Temperaturabhängigkeit**

Die Temperaturabhängigkeit enzymgesteuerter Stoffwechselfvorgänge ist bekannt: Eine Temperaturänderung kann sowohl zu einer Konformationsänderung des Enzyms als auch zu einer geringeren Enzymaktivität führen – beide Mechanismen können, einzeln oder gemeinsam, in einer geringeren Metabolisierungsrate des Substrats resultieren [100].

Eine Absenkung der Reaktionstemperatur von 37°C auf 27°C resultierte in der vorliegenden Studie statistisch signifikant in einer Verdreifachung der Mivacuriumhalbwertszeiten sowie in einem Rückgang des Mivacuriumgesamtumsatzes um 44%.

Rump [89] konnte in seiner *in-vivo*-Studie unter cardiopulmonalem Bypass (CPB) keinen Unterschied der PChE-Aktivität feststellen zwischen den Patienten, die sich unter Normothermie und denen, die sich unter Hypothermie (28°C) einer koronarchirurgischen Operation unterzogen. Beide Gruppen zeigten unter CPB eine Reduktion der Cholinesterase-Aktivität um 37%. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Ergebnis (42%) der Studie von Diefenbach [23]: Diefenbach untersuchte Veränderungen der PChE-Aktivität unter *normothermem* CPB.

Bei den unter Hypothermie, aber noch vor Beginn des CPB gewonnenen Blut-Proben konnte Rump keine Reduzierung der PChE-Aktivität feststellen; allerdings wurden die Aktivitätsmessungen bei 37°C durchgeführt. Rump schließt daraus, dass der unter CPB zu verzeichnende PChE-Aktivitätsrückgang überwiegend auf die mit dem CPB einhergehenden Verdünnungsprozesse zurückzuführen ist und es unter Hypothermie zu keiner *bleibenden* Aktivitätsverringering der Pseudocholinesterase kommt. Ein *passagerer* Aktivitätsrückgang unter Hypothermie hingegen kann nicht ausgeschlossen werden, da die Aktivitätsmessungen nicht unter Hypothermie durchgeführt wurden; auch Rump geht daher von einer zusätzlichen, temperaturbedingten Verringerung der PChE-Aktivität unter Hypothermie aus.

Gruber [35] konnte zeigen, dass Fluorid (10 µMol/L) *in-vitro* unter milder (34°C) und moderater (28°C) Hypothermie zu keiner Beeinträchtigung der Halbwertszeit von Mivacurium-ct und Mivacurium-tt führt, es in tiefer (18°C) Hypothermie unter Fluorid-Zusatz jedoch zu einer Zunahme der Halbwertszeit um 46% (M-ct) und 42% (M-tt) kommt im Vergleich zu Fluorid-freien Proben bei gleicher Temperatur. Eine isolierte Analyse der Halbwertszeit-Zunahmen unter Absenkung der Metabolisierungstemperatur ohne Fluoridzusatz legt der Untersucher nicht vor.

Die vorliegende Studie unterstützt die Annahme von Rump, dass auch die Aktivität des Enzyms Pseudocholinesterase temperaturabhängig ist und eine Absenkung der Metabolisierungstemperatur zu einem passageren Aktivitätsverlust des Enzyms führt.

## 4.2.2 Atypische Seren

### 4.2.2.1 Homozygote Seren

Wie klinische Beobachtungen [32, 57, 63] und die Ergebnisse klinischer Studien [79, 80] bereits erwarten ließen, setzten die fünf untersuchten, als homozygot-atypisch klassifizierten Patientenserum *in-vitro* keine relevanten Mengen an Mivacurium um. Die Halbwertszeiten von Mivacurium und seinen Isomeren unterscheiden sich statistisch nicht signifikant von denen unter Spontanzerfall der Substanz, ebenso wenig konnte ein bevorzugter Abbau eines der Mivacurium-Isomere beobachtet werden. Das korreliert mit der durch Cook [19] durchgeführten *in-vitro*-Untersuchung eines einzelnen homozygoten Serums (Dibucainzahl 25, PChE-Aktivität 1200 U/L). Weitere *in-vitro*-Studien zum Metabolisierungsverhalten homozygot-atypischer Seren liegen nicht vor.

Die Seren 8B (sekundär als homozygot-atypisch klassifiziert), 14B und 13B (beide homozygot-atypisch) (s. Tabelle 6, Kapitel 2.1.4.2) stammen von Patienten, die im klinisch-operativen Alltag der Universitätskliniken Köln durch eine deutlich prolongierte Muskelrelaxation nach Applikation von Mivacurium (oder Succinylcholin) im Rahmen einer Intubationsvollnarkose auffällig geworden waren. Um die Beweiskette endgültig schließen zu können, müsste eine genetische Typisierung u.a. mittels PCR [42, 43] zum eindeutigen Nachweis des Vorliegens einer homozygot-atypischen Pseudocholinesterase (genetische Nomenklatur: AA) bei diesen Patienten durchgeführt werden. Die niedrige PChE-Aktivität, die niedrigen Dibucainzahlen aller drei Seren, die fehlende Metabolisierung von Mivacurium innerhalb des Messzeitraumes von zwei Stunden sowie die damit einhergehenden extrem langen Halbwertszeiten könnten beispielsweise auch einem heterozygot-silenten und heterozygot-atypischen Genotypen (genetische Nomenklatur: AS) entsprechen [67, 80]: Nach La Du sind 20-25% der als homozygot-atypisch (AA) Klassifizierten tatsächlich Träger einer heterozygot-silenten (AS) Pseudocholinesterase [54]; diese Unterscheidung kann nur mit Hilfe einer DNA-Analyse getroffen werden.

Auffällig ist das oben erwähnte Serum 8B, ebenso wie das Serum 4B, noch unter einem anderen Aspekt. Serum 4B, nach den Referenzwerten von Knedel und Böttger [48] mit einer Dibucainzahl von 34 als heterozygot-atypisch einzustufen, wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der weitergefassten Kriterien bereits primär als homozygot-atypisch geführt. Serum 8B (Dibucainzahl 41) hingegen war auch nach den hier angewendeten

modifizierten Referenzwerten (heterozygot 40-78, homozygot unter 40) zunächst dem Pool der heterozygoten Seren zugeordnet worden. Beide Seren zeigten *in-vitro* ein *homozygotes* Metabolisierungsverhalten: Es kommt während 120 Minuten zu keinem vom Spontanzerfall abweichenden Mivacurium-Umsatz.

Obwohl in bis zu 89% der Fälle das Vorliegen einer heterozygot-atypischen Genvariante mit dem Vorliegen der häufigen K-Variante vergesellschaftet ist, kann nach Bartels [9] nicht davon ausgegangen werden, dass dies zu einer Augmentierung der Atypie und damit zu einer deutlicheren Abnahme der Metabolisierungsfähigkeit führt als bei Vorliegen der heterozygot-atypischen Variante allein – dieser Erklärungsansatz scheidet folglich zur Erhellung der beobachteten Diskrepanzen zwischen formaler Zugehörigkeit (Einordnung anhand der Dibucainzahl) und *in-vitro*-Metabolisierungsverhalten der beiden Seren aus.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit bietet ein von Rosenberg [87] dokumentierter Fallbericht: Eine nach konventioneller biochemischer Testung heterozygot-atypisch (UA) erscheinende Patientin zeigt nach Gabe von Mivacurium klinisch ein homozygot-atypisches Verhalten. Nach DNA-Analyse wird die Patientin als homozygot-atypisch (AA) eingestuft. Das Vorliegen einer heterozygot-silenten Konfiguration (AS) schließt die DNA-Analyse nach Meinung der Untersucher jedoch ebenfalls nicht aus, da nicht das gesamte PChE-Gen sequenziert wurde und eine auf einer Deletion beruhende silente Genkonfiguration hätte unentdeckt bleiben können.

#### **4.2.2.2 Heterozygote Seren**

##### **4.2.2.2.1 Abbaumuster und Halbwertszeiten**

In dieser *in-vitro*-Untersuchung konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Mivacurium-Abbaumuster normaler und heterozygoter Seren gefunden werden. Auch die Mivacuriumhalbwertszeiten unter Einsatz der heterozygoten Seren weisen im Vergleich zum Einsatz von Normalserum keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

Eine Ausnahme stellt die für M-cc gemessene Halbwertszeit dar: Die statistische Prüfung ergibt eine signifikant kürzere Halbwertszeit bei Einsatz des Verum im Vergleich zum Spontanzerfall – ein Unterschied, der sich bei der statistischen Prüfung der *Konzentrationsabsolutwerte* nicht reproduzieren lässt. Es bleibt an dieser Stelle unklar, ob diese Inkongruität in einer Messungenauigkeit begründet liegt, oder ob sich dahinter der Hinweis

auf eine bevorzugte Metabolisierung des cc-Isomers durch heterozygote Seren *in-vitro* verbergen könnte.

Weitere *in-vitro*-Arbeiten zur Pharmakodynamik von Mivacurium in Inkubation mit heterozygot-atypischen Patientenserien liegen nicht vor; in klinischen Beobachtungen sowie in *in-vivo*-Studien wird eine deutliche Verlängerung der Mivacuriumwirkung bei Patienten beschrieben, die bezüglich ihrer PChE-Merkmale heterozygot-atypisch sind.

In einer Studie mit 17 heterozygoten Merkmalsträgern fand Østergaard 1993 [79] eine signifikante Verlängerung aller Erholungsparameter der neuromuskulären Blockade nach einer Mivacurium-Bolusapplikation (0,2 mg/kg KG) im Vergleich zu phänotypisch normalen Patienten.

In einer weiteren Studie arbeitete Østergaard 2003 [82] mit kontinuierlicher Mivacuriumgabe per infusionem. Østergaard untersuchte 32 Patienten, die bezüglich ihrer PChE-Merkmale heterozygot-atypisch waren (Dibucainzahlen zwischen 47 und 70) und verglich ihre Ergebnisse mit denen normaler Merkmalsträger aus vorangegangenen Studien. Sie fand bei den heterozygot-atypischen Merkmalsträgern eine langsamere spontane Erholungsrate der neuromuskulären Blockade, eine um 30% geringere Clearance für ct und eine um 50% geringere für tt – im Gegensatz zu normalen Merkmalsträgern aber keinen Clearance-Unterschied zwischen den beiden Isomeren. Die Halbwertszeiten für M-ct und M-tt waren um das 2- bis 3-Fache verlängert; eine Korrelation zwischen der PChE-Aktivität und der Höhe der Infusionsrate bestand nicht, wohl aber eine Korrelation zwischen PChE-Aktivität und der Clearance des ct-Isomers – nicht jedoch für das tt-Isomer.

Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden *in-vitro*-Studie; die Gründe dafür mögen in einer zu kleinen Stichprobe letzterer liegen. Denkbar wäre auch, dass die Pseudocholinesterase *in-vivo* hemmenden Einflüssen ausgesetzt ist, die das *in-vitro*-Experiment nicht erfasst.

Darüber hinaus jedoch lassen die hohen Streubreiten (bis zu 57%) insbesondere bezüglich der nach 120 Minuten noch vorhandenen Mengen nicht umgesetzten Substrates vermuten, dass es möglicherweise Unterschiede in der Metabolisierungskapazität auch innerhalb der Gruppe der untersuchten heterozygoten Seren gibt. Im Folgenden sollen daher die heterozygot-atypischen Einzelseren einer genaueren Betrachtung unterzogen werden,

zumal auch hier drei der Seren von Spendern stammen, die klinisch durch deutlich verlängerte Relaxation bzw. die Notwendigkeit zur postoperativen Nachbeatmung auffällig geworden waren (6B, 9B und 12B, s. Tabelle 7, Kapitel 2.1.4.2).

Betrachtet man die für die 10 verschiedenen Seren bestimmten Halbwertszeiten, so fällt auf, dass die Seren 1B, 6B, 9B, 12B und 1349 der Liste (darunter die drei obengenannten von auffällig gewordenen Patienten) sowohl für M-ct als auch für tt deutlich über dem Mittelwert liegende Halbwertszeiten (s. Tabelle 19) aufweisen – mit einer Ausnahme: Die Halbwertszeiten des Serums 6B liegen mit 33 Minuten für M-ct und mit 54 Minuten für M-tt unterhalb des Mittelwerts. Mit Ausnahme des Serums 1B (50%) haben alle Seren eine Dibucainzahl zwischen 75% und 77%, ihre gemessene Gesamtaktivität reicht von hochnormal (Serum 1349; 5225 U/L) bis zu deutlich erniedrigt (Serum 12B; 1416 U/L). So wird deutlich, dass diese beobachteten Unterschiede und ihre klinische Auswirkung bezüglich einer verlängerten Muskelrelaxation nicht allein durch die Kenntnis von Dibucainzahl und PChE-Gesamtaktivität verlässlich vorhersagbar sind. Unterstützt wird diese Sichtweise von der statistischen Analyse: Weder zwischen gemessenen Mivacurium-Halbwertszeiten und Dibucainzahl der untersuchten heterozygoten Seren noch zwischen Mivacurium-Halbwertszeiten und der jeweiligen PChE-Aktivität besteht eine statistisch nachweisbare Abhängigkeit.

Ein Erklärungsansatz für dieses uneinheitliche Bild der Gruppe der heterozygoten Seren mag darin begründet liegen, dass das Serum jedes einzelnen heterozygot-atypischen Genträgers eine Mischung ganz unterschiedlicher Anteile an normaler und atypischer Pseudocholinesterase darstellt [67]. Möglicherweise führt das auch hier mit einer großen Variationsbreite zu einer individuellen Metabolisierungsfähigkeit jedes einzelnen Patienten-Serums: Østergaard beschrieb ebenfalls eine große interindividuelle Varianz muskulärer Erholungsparameter ihrer heterozygot-atypischen Probanden *in-vivo* [79].

Bezüglich der klinisch auffällig gewordenen Träger der Seren 6B, 9B und 12B muss ein besonderes Augenmerk auf die Tatsache gelegt werden, dass ein mit konventionellen biochemischen Methoden getestetes und als heterozygot-atypisch klassifiziertes Serum *in-vivo* dennoch eine hohe Mivacurium-Sensibilität zeigen kann [17, 87] – somit mag für diese Seren das Vorliegen weiterer Genveränderungen oder aber eine zusätzliche, erworbene Beeinträchtigung der PChE-Aktivität eine Rolle spielen.

#### 4.2.2.2.2 Metabolitmuster und Recovery

Mit Ausnahme einer statistisch signifikant höheren cis-Alkoholentstehung konnte die Untersuchung der zehn heterozygoten Seren dieser Arbeit keinen Unterschied im Muster der Metabolitentstehung im Vergleich zum Einsatz von Normalserum-PChE nachweisen. Abweichend von der Metabolisierung durch Normalserum entstand bei Einsatz heterozygoter Seren mit  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{Mol/L}$  (vs.  $0,03 \pm 0,02 \mu\text{Mol/L}$ ) mehr als die doppelte Menge an cis-Alkohol-Metabolit. Dies erscheint trotz der statistischen Signifikanz nicht wegweisend, da die Absolutmengen des gemessenen cis-Alkoholmetaboliten sehr gering sind und sich nahe der Bestimmungsgrenze von  $0,02 \mu\text{Mol/L}$  bewegen.

Die Aufschlüsselung der gemessenen Absolutwerte in prozentuale Anteile entstandener Säure- bzw. Alkoholmetabolite und in cis- bzw. transkonfigurierte Metabolite bei Einsatz normaler bzw. heterozygot-atypischer Pseudocholinesterase (Tabelle 21, Kapitel 3.2.3.3) ergibt ein einheitliches Bild: Es entstehen zu gleichen Anteilen Säure (80,7% vs. 80,7%) und Alkohol (97,4% vs. 97,4%); die jeweiligen Anteile an cis- bzw. trans-Metaboliten unterscheiden sich nur wenig, ebenso wie die prozentuale Summe der gesamten cis-konfigurierten (29,7% vs. 32%) Metabolitanteile. Der etwas größere Unterschied zwischen den Summen der entstandenen trans-konfigurierten Metabolite (148,4% vs. 163,2%) liegt möglicherweise in der unterschiedlich hohen Wiederfindung der beiden Serengruppen begründet. In jedem Falle aber ist das Mengen-Verhältnis der entstandenen cis- bzw. trans-Metabolite zueinander konstant und liegt in beiden Gruppen bei 1:5 zugunsten der trans-Konfiguration.

Andere Studien zu Metabolitmuster und Recovery bei Metabolisierung von Mivacurium durch heterozygot-atypische Seren liegen nicht vor.

### 4.3 Limitierung

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Studie insbesondere mit den Ergebnissen der *in-vivo*-Studie zu heterozygoten Seren von Østergaard [82] macht deutlich, dass eine Übertragung der *in-vitro*-Befunde auf den klinischen Alltag keinesfalls erfolgen kann: es muss bezweifelt werden, ob Merkmalsträger heterozygoter PChE-Eigenschaften, deren Seren *in-vitro* keinen Unterschied in ihrer Metabolisierungskapazität zu Normalseren auf-

weisen, auch *in vivo* eine reguläre Pharmakokinetik und -dynamik zeigen; *in-vitro*-Halbwertszeiten, Dibucainzahl und PChE-Aktivität reichen nicht aus, um das Verhalten einer heterozygot-atypischen Pseudocholinesterase *in-vivo* zuverlässig vorhersagen zu können.

## 4.4 Klinische Relevanz und Ausblick

### 4.4.1 Konsequenz im klinischen Alltag

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Feststellung der Dibucainzahl allein keine verlässliche Aussage darüber erlaubt, ob der Einsatz von Succinylcholin oder Mivacurium bei einem Patienten unbedenklich ist. Eines der 15 *in-vitro* untersuchten Patientenserum (Serum 8B) zeigte, obwohl formal (nach den Kriterien der vorliegenden Arbeit) anhand seiner Dibucainzahl von 41 den heterozygot-atypischen Seren zuzuordnen, innerhalb des Messzeitraumes von 120 Minuten keinerlei Substratumsatz – und somit ein „homozygot-atypisches“ Metabolisierungsverhalten. Ein weiteres Serum (4B; Dibucainzahl 34), in dieser Arbeit als homozygot geführt, nach gängigen Kriterien (Knedel/Böttger) jedoch als heterozygot einzustufen, zeigte innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 120 Minuten ebenfalls keinen Umsatz des Substrates Mivacurium. Weitere drei als heterozygot klassifizierte Seren (6B, 9B, 12B) zeigten zwar *in-vitro* keinen Unterschied zur Metabolisierungsfähigkeit des inkubierten Referenz-Normalserums – ihre Träger waren aber dennoch mit deutlich prolongierter Muskelrelaxation klinisch auffällig geworden.

Aufgrund dieser Beobachtung und der unter 4.2.2.1, 4.2.2.2 und 4.3 angestellten Überlegungen muss de facto empfohlen werden, bei allen Patienten, deren Dibucainzahl bekannt ist und unter 50 liegt, auf den Einsatz von Mivacurium und Succinylcholin zu verzichten, da mit dem Vorliegen einer PChE-Atypie von ausgeprägt klinischer Relevanz gerechnet werden muss. Es sollte sogar erwogen werden, bei *allen* aufgrund ihrer Dibucainzahl als *heterozygot-atypisch* detektierten Patienten auf diese beiden Relaxantien zu verzichten, da immer auch eine weitere klinisch relevante Mutation – insbesondere die der *silenten* Variante – vorliegen und zu einer noch deutlicheren Beeinträchtigung der PChE-Metabolisierungsfähigkeit *in-vivo* führen könnte [67, 87].

Sollte es dennoch zu einem durch Mivacurium verursachten verlängerten neuromuskulären Block kommen, kann dieser durch kompetitive Cholinesterase-Hemmer wie Neostig-

min, Pyridostigmin oder Edrophonium aufgehoben werden – Substanzen, die die Konzentration von Acetylcholin am Rezeptor erhöhen. Eine Antagonisierung kann in Ausnahmefällen bei stark verminderter Plasmacholinesterase-Aktivität oder homozygot-atypischer Plasmacholinesterase erwogen werden [32, 78, 81]. Eine durch Mivacurium bedingte 70-90%ige Hemmung der neuromuskulären Übertragung kann mit Neostigmin in einer Dosis von 0,02 bis 0,06 mg/kg Körpergewicht aufgehoben werden [31, 73, 90]. Eine hochdosierte Gabe von Cholinesterasehemmern oder Pseudocholinesterase bei *tiefer* neuromuskulärer Blockade erscheint allerdings dennoch nicht sinnvoll, da Neostigmin neben der Acetylcholinesterase ebenfalls die Plasmacholinesterase hemmt und auch Edrophonium nicht zu einer *schnellen* Antagonisierung der Mivacurium-induzierten neuromuskulären Blockade führt [76]. Eine weitere Möglichkeit zur Aufhebung der muskelrelaxierenden Wirkung von Mivacurium ist die Gabe von hochgereinigter humaner Pseudocholinesterase [75, 102], die aufgrund der Kostenintensität Patienten mit PChE-Atypien vorbehalten bleiben sollte [81]; die Verabreichung von Frischplasmen ist wegen der Infektionsgefahr nicht zu empfehlen.

Das risikoärmste Vorgehen bei prolongierter Mivacurium-Wirkung scheint bisher das Abwarten der Spontanerholung unter Analgosedierung und Beatmung zu sein.

## 4.4.2 Ausblick

### 4.4.2.1 Genotypisierung

Aufgrund der oben ausgeführten Beobachtungen erscheint die Erweiterung der erhobenen Parameter um die molekularbiologische Genotypisierung der Seren als notwendige Voraussetzung für weitere Untersuchungen zur Atypie von Pseudocholinesterasen *in-vitro*. Die zweifelsfreie Einordnung eines Serums als homo- oder heterozygot-atypisch kann nur mittels molekularbiologischer Genotypisierung gewährleistet werden [8, 43, 67]. Eine Korrelation des Genotyps mit biochemischen Unterscheidungskriterien wie Dibucainzahl, PChE-Aktivität und Substrathalbwertszeiten *in-vitro* könnte eine Ergänzung zu vorliegenden *in-vivo*-Studien darstellen.

#### 4.4.2.2 Einflüsse auf die PChE-Aktivität in vivo

Im Rahmen des Erlernens der Methodik zu dieser Studie wurde isolierte Pseudocholinesterase eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass isolierte humane Pseudocholinesterase gut ein Drittel mehr Substrat umzusetzen vermag als eine gleiche im menschlichen (Normal-)Serum befindliche Menge des Enzyms.

Dieser Nebenbefund ist vor dem Hintergrund bisheriger Überlegungen [59] interessant, die davon ausgehen, dass die in *in-vivo*-Studien beobachtete generell langsamere Mivacurium-Metabolisierung im Vergleich zu *in-vitro*-Studien durch Umverteilung des Substrats in andere Kompartimente bedingt ist. In der vorliegenden Studie ist dieser Faktor durch die Begrenzung auf ein einziges Kompartiment (Reaktionsgefäß) ausgeschlossen – dennoch zeigte isolierte humane Pseudocholinesterase eine um etwa 30% höhere Umsatzkapazität als eine equipotente Menge in menschlichem Serum befindliche Pseudocholinesterase unter gleichen Bedingungen.

Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass im Serum befindliche Stoffe (andere Proteine?) eine hemmende Wirkung auf die Funktion der Pseudocholinesterase ausüben und könnte Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung sein.

## 5 Zusammenfassung

Das Muskelrelaxans Mivacurium wird durch die im Serum befindliche Pseudocholinesterase (PChE) abgebaut. Neben einigen Erkrankungen kann auch das Vorliegen atypischer PChE zu einer FunktionseinbuÙe der PChE und damit zu einer verlängerten Wirkdauer des Pharmakons führen. Es hat klinische Fälle gegeben, in denen Patienten, die sich einer Vollnarkose unter Einsatz von Mivacurium unterzogen, ein verzögertes Aufwachverhalten aufgrund eines Relaxansüberhang mit der Notwendigkeit zur Nachbeatmung zeigten. Laborchemische Untersuchungen (u.a. Dibucainzahl) des Serums der betroffenen Patienten wiesen sie als Träger einer atypischen PChE aus.

### Fragestellung

Folgt der Abbau der Mivacurium-Isomere durch Seren mit normalen PChE-Merkmalen *in-vitro* dem gleichem Abbaumuster wie *in-vivo*? Wird Mivacurium durch atypische PChE enthaltende Seren auch *in-vitro* langsamer umgesetzt und lassen sich dabei Unterschiede zwischen homo- und heterozygoten Seren beobachten? Sind Unterschiede im Abbaumuster von Mivacurium und den entstehenden Metaboliten bei Einsatz von atypischen Seren im Vergleich zu Seren normaler PChE-Merkmalsträger zu beobachten? Wie wirkt sich die Absenkung der Metabolisierungstemperatur auf den enzymatischen Abbau von Mivacurium *in-vitro* aus?

### Methoden

Die einer PChE-Aktivität von 40 U/L entsprechende Menge 5 homozygoter und 10 heterozygoter Seren von entweder klinisch durch Relaxansüberhang auffällig gewordenen oder laborchemisch im Rahmen einer Screening-Studie anhand ihrer Dibucainzahl als Träger atypischer PChE ausgewiesener Patienten wurden jeweils einer auf eine Mivacurium-Konzentration von 10 µMol/L eingestellten Pufferlösung zugegeben und bei 37°C inkubiert. Dabei wurden über einen Zeitraum von 120 Minuten zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen und die PChE durch Zugabe eines Enzyminhibitors inaktiviert. Parallel dazu wurde in einem Reaktionsansatz ohne Zugabe von PChE der Spontanzerfall von Mivacurium erfasst. Nach Aufbereitung der Proben wurde das Substanzgemisch mittels der HPLC-Methode nach Biederbick analysiert und die Konzentrationen aller Isomere einzeln bestimmt. Mivacurium ist ein Gemisch dreier Struktur-Isomere (cis-cis, cis-trans und trans-trans), seine Metabolite, eine Säure und ein Alkohol, liegen ebenfalls als

cis- und trans-Isomere vor. Die Konzentrationen dieser 7 verschiedenen Substanzen wurden gemessen und basierend auf den ermittelten Substratkonzentrationen die Halbwertszeiten von Mivacurium und seinen Isomeren mit Hilfe der Software TOPFIT® 2.0 bestimmt. Als Referenz diente Probandenserum eines Patienten mit normaler Dibucainzahl. Verglichen wurden die Konzentrationsverläufe und Halbwertszeiten von Mivacurium und seinen Isomeren sowie die Konzentrationsverläufe der Metabolite und ihren Isomeren bei 37°C in Abhängigkeit von der Provenienz der eingesetzten PChE: Normalserum oder atypische Seren (homo-/heterozygot). Versuchsansätze unter Einsatz isolierter humaner PChE dienten dem Erlernen der Methodik. Das Metabolisierungsverhalten von Normalserum wurde zusätzlich bei 27°C untersucht (Temperaturabhängigkeit).

### **Ergebnisse**

Auch *in vitro* setzt normale PChE bevorzugt die trans-konfigurierten Mivacurium-Isomere um. Nach 120 Minuten sind bei einer Halbwertszeit von  $29,7 \pm 1,34$  Minuten 94% des initial gemessenen ct-Isomers und 84% des tt-Isomers (HWZ  $43,9 \pm 4,74$  Minuten) abgebaut; dabei wird Mivacurium-ct statistisch signifikant schneller abgebaut als Mivacurium-tt. Nur 13% des cc-Mivacurium werden metabolisiert (HWZ  $752 \pm 269$  Minuten); der Verum-Abbau von M-cc unterscheidet sich während des Beobachtungszeitraumes nicht von dem des Spontanzerfalls.

Mivacurium wird durch Seren mit homozygot-atypischer PChE nicht metabolisiert: die Halbwertszeiten von Mivacurium und seiner Isomere unterscheiden sich nicht signifikant von denen unter Spontanzerfall der Substanz. In dieser *in-vitro*-Studie wiesen heterozygote Seren gegenüber Normalserum-PChE keine veränderte Metabolisierungscharakteristik auf; dabei bauen Normalserum-PChE und heterozygot-atypische PChE Mivacurium nach dem gleichen Muster ab. Auch die prozentuale Verteilung der entstehenden Metabolite zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Die Absenkung der Metabolisierungstemperatur von 37°C auf 27°C führt unter Einsatz von Normalserum-PChE zu einer annähernden Verdreifachung der Halbwertszeit der Mivacurium-Isomere und zu einem Rückgang des Gesamtmivacurium-Umsatzes um 44%.

**Schlussfolgerung**

*In-vitro* kommt es zu keinem Abbau von Mivacurium durch Patientenserum (n = 5) mit homozygot-atypischer PChE. Das unterstreicht die bekannte Gefährdung von Trägern einer homozygot-atypischen PChE, durch eine Vollnarkose unter Einsatz von Mivacurium einen Relaxansüberhang zu erleiden und über Stunden nachbeatmet werden zu müssen.

Bei den innerhalb dieser Studie untersuchten Trägern heterozygot-atypischer PChE ist im Mittel keine Veränderung des Metabolisierungsverhaltens von Mivacurium *in-vitro* zu beobachten. Dennoch erscheint es aufgrund der geringen Anzahl (n = 10) untersuchter Seren und der Ergebnisse klinischer Studien ratsam, auch bei Trägern heterozygot-atypischer PChE auf die Verwendung von Mivacurium im klinischen Alltag zu verzichten, insbesondere dann, wenn deren Dibucainzahl im unteren Bereich der Referenzspanne für heterozygote Seren liegt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abdulatif M, el-Sanabary M (1997) Blood flow and mivacurium-induced neuromuscular block at the orbicularis oculi and adductor pollicis muscles. *Br J Anaesth* 79:24-28
2. Agoston S, Vandebrom RH, Wierda JM (1992) Clinical pharmacokinetics of neuromuscular blocking drugs. *Clin Pharmacokinet* 22:94-115
3. Aktories K (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage, Urban & Fischer, München; S. 151.
4. Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ (1991) The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics* 11:452-454
5. Baird WL, Reid AM (1967) The neuromuscular blocking properties of a new steroid compound, pancuronium bromide. A pilot study in man. *Br J Anaesth* 39:775-780
6. Bang U, Viby-Mogensen J, Wiren JE, Skovgaard LT (1990) The effect of bambuterol (carbamylated terbutaline) on plasma cholinesterase activity and suxamethonium-induced neuromuscular blockade in genotypically normal patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 34:596-599
7. Baraka A (1995) Test dose for prediction of mivacurium sensitivity in the patient with atypical plasma cholinesterase. *Anesthesiology* 83:1371-1372
8. Barta C, Sasvari-Szekely M, Devai A, Kovacs E, Staub M, Enyedi P (2001) Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia. *Molecular genetics and metabolism* 74:484-488
9. Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, van der Spek AF, Rubinstein HM, Lubrano T, La Du BN (1992) DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *American journal of human genetics* 50:1086-1103
10. Bhargava D, Sharma J, Al-Abri R (2012) Plasma pseudo cholinesterase deficiency leading to seven hour apnoea in a child undergoing adeno-tonsillectomy. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 76:149-151
11. Biederbick W, Aydincioglu G, Diefenbach C, Theisohn M (1996) Stereoselective high-performance liquid chromatographic assay with fluorometric detection of the three isomers of mivacurium and their cis- and trans-alcohol and ester metabolites in human plasma. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 685:315-322

12. Bosak A, Gazic I, Vinkovic V, Kovarik Z (2008) Stereoselective inhibition of human, mouse, and horse cholinesterases by bambuterol enantiomers. *Chemico-biological interactions* 175:192-195
13. Bourne JG, Collier HO, Somers GF (1952) Succinylcholine (succinoylcholine), muscle-relaxant of short action. *Lancet* 1:1225-1229
14. Boutin D, Brodeur J (1970) An automated method for simultaneous determination of serum pseudocholinesterase activity, dibucaine number and fluoride number. *Clin Biochem* 3:245-254
15. Brandom BW, Woelfel SK, Cook DR, Weber S, Powers DM, Weakly JN (1989) Comparison of mivacurium and suxamethonium administered by bolus and infusion. *Br J Anaesth* 62:488-493
16. Brown AR, James CD, Welch RM, Harrelson JC (1992) Stereoselective high-performance liquid chromatographic assay with fluorometric detection for the isomers of mivacurium in human plasma. *J Chromatogr* 578:302-308
17. Cerf C, Mesguish M, Gabriel I, Amselem S, Duvaldestin P (2002) Screening patients with prolonged neuromuscular blockade after succinylcholine and mivacurium. *Anesth Analg* 94:461-466, table of contents
18. Clitherow JW, Mitchard M, Harper NJ (1963) The Possible Biological Function of Pseudocholinesterase. *Nature* 199:1000-1001
19. Cook DR, Stiller RL, Weakly JN, Chakravorti S, Brandom BW, Welch RM (1989) In vitro metabolism of mivacurium chloride (BW B1090U) and succinylcholine. *Anesth Analg* 68:452-456
20. Cook DR, Freeman JA, Lai AA, Kang Y, Stiller RL, Aggarwal S, Harrelson JC, Welch RM, Samara B (1992) Pharmacokinetics of mivacurium in normal patients and in those with hepatic or renal failure. *Br J Anaesth* 69:580-585
21. Cronnelly R, Fisher DM, Miller RD, Gencarelli P, Nguyen-Gruenke L, Castagnoli N, Jr. (1983) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vecuronium (ORG NC45) and pancuronium in anesthetized humans. *Anesthesiology* 58:405-408
22. Davies P, Landy M (1998) Suxamethonium and mivacurium sensitivity from pregnancy-induced plasma cholinesterase deficiency. *Anaesthesia* 53:1109-1111
23. Diefenbach C, Abel M, Rump AF, Grond S, Korb H, Buzello W (1995) Changes in plasma cholinesterase activity and mivacurium neuromuscular block in response to normothermic cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 80:1088-1091
24. Diefenbach C, Buzello W (1996) [New muscle relaxants]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* : AINS 31:2-8
25. Diefenbach C, Nigrovic V, Mellinghoff H, Buzello W (1997) [Muscle relaxants. New substances and neuromuscular monitoring]. *Der Anaesthetist* 46:3-13

26. Evans FT, Gray PW, Lehmann H, Silk E (1952) Sensitivity to succinylcholine in relation to serum-cholinesterase. *Lancet* 1:1229-1230
27. Fahey MR, Rupp SM, Fisher DM, Miller RD, Sharma M, Canfell C, Castagnoli K, Hennis PJ (1984) The pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium in patients with and without renal failure. *Anesthesiology* 61:699-702
28. Frampton JE, McTavish D (1993) Mivacurium. A review of its pharmacology and therapeutic potential in general anaesthesia. *Drugs* 45:1066-1089
29. Gazic I, Bosak A, Sinko G, Vinkovic V, Kovarik Z (2006) Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. *Analytical and bioanalytical chemistry* 385:1513-1519
30. Glaxo (2001) Glaxo Produktmonographie Mivacron®; GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, 80339 München.
31. Goldhill DR, Whitehead JP, Emmott RS, Griffith AP, Bracey BJ, Flynn PJ (1991) Neuromuscular and clinical effects of mivacurium chloride in healthy adult patients during nitrous oxide-enflurane anaesthesia. *Br J Anaesth* 67:289-295
32. Goudsouzian NG, d'Hollander AA, Viby-Mogensen J (1993) Prolonged neuromuscular block from mivacurium in two patients with cholinesterase deficiency. *Anesth Analg* 77:183-185
33. Graybiel AM, Ragsdale CW, Jr. (1982) Pseudocholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. *Nature* 299:439-442
34. Grim KJ, Arendt KW, Jacob AK, Rose CH, Keegan MT (2011) Urgent cesarean delivery and prolonged ventilatory support in a parturient with Fontan circulation and undiagnosed pseudocholinesterase deficiency. *International journal of obstetric anaesthesia* 20:184-188
35. Gruber M, Lindner R, Prasser C, Wiesner G (2002) The effect of fluoride and hypothermia on the in vitro metabolism of mivacurium. *Anesth Analg* 95:397-399, table of contents
36. Hanson KR (1976) Concepts and perspectives in enzyme stereochemistry. *Annu Rev Biochem* 45:307-330
37. Harris H, Whittaker M (1961) Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature* 191:496-498
38. Hazel B, Monier D (1971) Human serum cholinesterase: variations during pregnancy and post-partum. *Can Anaesth Soc J* 18:272-277
39. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM (1994) Pharmacokinetics of the three isomers of mivacurium and pharmacodynamics of the chiral mixture in hepatic cirrhosis. *Br J Anaesth* 73:613-618

40. Head-Rapson AG, Devlin JC, Parker CJ, Hunter JM (1995) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the three isomers of mivacurium in health, in end-stage renal failure and in patients with impaired renal function. *Br J Anaesth* 75:31-36
41. Hemmerling TM, Schurr C, Walter S, Dern S, Schmidt J, Braun GG (2000) A new method of monitoring the effect of muscle relaxants on laryngeal muscles using surface laryngeal electromyography. *Anesth Analg* 90:494-497
42. Iohom G, Fitzgerald D, Cunningham AJ (2004) Principles of pharmacogenetics--implications for the anaesthetist. *Br J Anaesth* 93:440-450
43. Jensen FS, Schwartz M, Viby-Mogensen J (1995) Identification of human plasma cholinesterase variants using molecular biological techniques. *Acta Anaesthesiol Scand* 39:142-149
44. Jensen FS, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J (1995) Identification of human plasma cholinesterase variants in 6,688 individuals using biochemical analysis. *Acta Anaesthesiol Scand* 39:157-162
45. Kalow W, Genest K (1957) A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol* 35:339-346
46. Kao YJ, Turner DR (1989) Prolongation of succinylcholine block by metoclopramide. *Anesthesiology* 70:905-908
47. Kim DW, Joshi GP, White PF, Johnson ER (1996) Interactions between mivacurium, rocuronium, and vecuronium during general anesthesia. *Anesth Analg* 83:818-822
48. Knedel M, Böttger R (1967) [A kinetic method for determination of the activity of pseudo-cholinesterase (acylcholine acyl-hydrolase 3.1.1.8.)]. *Klinische Wochenschrift* 45:325-327
49. Koseoglu V, Chiang J, Chan KW (1999) Acquired pseudo-cholinesterase deficiency after high-dose cyclophosphamide. *Bone marrow transplantation* 24:1367-1368
50. Kovarik Z, Radic Z, Grgas B, Skrinjaric-Spoljar M, Reiner E, Simeon-Rudolf V (1999) Amino acid residues involved in the interaction of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with the carbamates Ro 02-0683 and bambuterol, and with terbutaline. *Biochim Biophys Acta* 1433:261-271
51. Krasowski MD, McGehee DS, Moss J (1997) Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions. *Can J Anaesth* 44:525-534
52. Kutty KM (1980) Biological function of cholinesterase. *Clin Biochem* 13:239-243
53. La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Arpagaus M, Lockridge O (1991) Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cell Mol Neurobiol* 11:79-89

54. La Du BN (1995) Butyrylcholinesterase variants and the new methods of molecular biology. *Acta Anaesthesiol Scand*:139-141
55. Lacroix M, Tu TM, Donati F, Varin F (1995) High-performance liquid chromatographic assays with fluorometric detection for mivacurium isomers and their metabolites in human plasma. *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 663:297-307
56. Lacroix M, Donati F, Varin F (1997) Pharmacokinetics of mivacurium isomers and their metabolites in healthy volunteers after intravenous bolus administration. *Anesthesiology* 86:322-330
57. Laubinger R, Mellinghoff H (1998) [Postoperative apnea]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 33:280, 282-283
58. Laubinger R (2005) Häufigkeitsnachweis atypischer Pseudocholinesterasen in Seren von Blutspendern der Universität zu Köln; Dissertationsschrift, Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln
59. Laurin J, Donati F, Varin F (2002) Stereoselective in vitro degradation pattern of mivacurium in human plasma. *Br J Anaesth* 89:832-838
60. Lien CA, Schmith VD, Embree PB, Belmont MR, Wargin WA, Savarese JJ (1994) The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the stereoisomers of mivacurium in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 80:1296-1302
61. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL (1987) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 262:549-557
62. Lowry DW, Mirakhur RK, Carroll MT, McCarthy GJ, Hughes DA, O'Hare RA (1999) Potency and time course of mivacurium block during sevoflurane, isoflurane and intravenous anesthesia. *Can J Anaesth* 46:29-33
63. Maddineni VR, Mirakhur RK (1993) Prolonged neuromuscular block following mivacurium. *Anesthesiology* 78:1181-1184
64. Maddineni VR, Mirakhur RK, McCoy EP, Sharpe TD (1994) Neuromuscular and haemodynamic effects of mivacurium in elderly and young adult patients. *Br J Anaesth* 73:608-612
65. Maehr BS (1991) Autonomic and neuromuscular effects of mivacurium and isomers in cats. *Anesthesiology* 75
66. Mayer M, Doenicke A, Nebauer AE, Rosenberger C, Lorenz W, Peter K (1993) [Pharmacodynamics and clinical adverse effects of mivacurium. The effect of oral premedication with H1/H2 antagonists]. *Der Anaesthetist* 42:592-596

67. McGuire MC, Nogueira CP, Bartels CF, Lightstone H, Hajra A, Van der Spek AF, Lockridge O, La Du BN (1989) Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:953-957
68. Mendel B, Rudney H (1943) Studies on cholinesterase: 1. Cholinesterase and pseudo-cholinesterase. *The Biochemical journal* 37:59-63
69. Mezincesco MD, Ghetie S (1974) [The metabolic function of butylcholinesterase (author's transl)]. *Biochim Biophys Acta* 350:54-60
70. Mikami LR, Wieseler S, Souza RL, Schopfer LM, Nachon F, Lockridge O, Chautard-Freire-Maia EA (2008) Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. *Pharmacogenetics and genomics* 18:213-218
71. Motamed C, Kirov K, Lieutaud T, Duvaldestin P (2000) The mechanism of pancuronium potentiation of mivacurium block: use of the isolated-arm technique. *Anesth Analg* 91:732-735
72. Müller TC, Rocha JB, Morsch VM, Neis RT, Schetinger MR (2002) Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochim Biophys Acta* 1587:92-98
73. Naguib M, Abdulatif M, al-Ghamdi A, Hamo I, Nouheid R (1993) Dose-response relationships for edrophonium and neostigmine antagonism of mivacurium-induced neuromuscular block. *Br J Anaesth* 71:709-714
74. Naguib M, Abdulatif M, al-Ghamdi A, Selim M, Seraj M, el-Sanbary M, Magboul MA (1994) Interactions between mivacurium and atracurium. *Br J Anaesth* 73:484-489
75. Naguib M, Daoud W, el-Gammal M, Ammar A, Turkistani A, Selim M, Altamimi W, Sohaibani MO (1995) Enzymatic antagonism of mivacurium-induced neuromuscular blockade by human plasma cholinesterase. *Anesthesiology* 83:694-701
76. Naguib M, Selim M, Bakhamees HS, Samarkandi AH, Turkistani A (1996) Enzymatic versus pharmacologic antagonism of profound mivacurium-induced neuromuscular blockade. *Anesthesiology* 84:1051-1059
77. Nelson TC, Burritt MF (1986) Pesticide poisoning, succinylcholine-induced apnea, and pseudocholinesterase. *Mayo Clinic proceedings* 61:750-752
78. Østergaard D, Jensen FS, Jensen E, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J (1992) Influence of plasma cholinesterase activity on recovery from mivacurium-induced neuromuscular blockade in phenotypically normal patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 36:702-706

79. Østergaard D, Jensen FS, Jensen E, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J (1993) Mivacurium-induced neuromuscular blockade in patients with atypical plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiol Scand* 37:314-318
80. Østergaard D, Jensen FS, Skovgaard LT, Viby-Mogensen J (1995) Dose-response relationship for mivacurium in patients with phenotypically abnormal plasma cholinesterase activity. *Acta Anaesthesiol Scand* 39:1016-1018
81. Østergaard D, Jensen FS, Viby-Mogensen J (1995) Reversal of intense mivacurium block with human plasma cholinesterase in patients with atypical plasma cholinesterase. *Anesthesiology* 82:1295-1298
82. Østergaard D, Viby-Mogensen J, Rasmussen SN, Gatke MR, Pedersen NA, Skovgaard LT (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium in patients phenotypically heterozygous for the usual and atypical plasma cholinesterase variants (UA). *Acta Anaesthesiol Scand* 47:1219-1225
83. Payne JP, Hughes R (1981) Evaluation of atracurium in anaesthetized man. *Br J Anaesth* 53:45-54
84. Pearson KS, From RP, Choi WW, Abou-Donia M, Sokoll MD (1990) Neuromuscular and cardiovascular effects of mivacurium chloride (BW B109OU) during nitrous oxide-narcotic, nitrous oxide-halothane and nitrous oxide-isoflurane anesthesia in surgical patients. *Middle East journal of anesthesiology* 10:469-478
85. Petersen RS, Bailey PL, Kalameghan R, Ashwood ER (1993) Prolonged neuromuscular block after mivacurium. *Anesth Analg* 76:194-196
86. Ramirez JG, Sprung J, Keegan MT, Hall BA, Bourke DL (2005) Neostigmine-induced prolonged neuromuscular blockade in a patient with atypical pseudocholinesterase. *Journal of clinical anesthesia* 17:221-224
87. Rosenberg MK, Lebenbom-Mansour M (1997) Markedly prolonged paralysis after mivacurium in a patient apparently heterozygous for the atypical and usual pseudocholinesterase alleles by conventional biochemical testing. *Anesth Analg* 84:457-460
88. Rossaint R (2004) *Die Anästhesiologie*. 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg; S. 331.
89. Rump AF, Schierholz J, Biederbick W, Theisohn M, Diefenbach C, Abel M, Borner U, Buzello W, Klaus W (1999) Pseudocholinesterase-activity reduction during cardiopulmonary bypass: the role of dilutional processes and pharmacological agents. *General pharmacology* 32:65-69
90. Savarese JJ, Ali HH, Basta SJ, Embree PB, Scott RP, Sunder N, Weakly JN, Wastila WB, el-Sayad HA (1988) The clinical neuromuscular pharmacology of mivacurium chloride (BW B1090U). A short-acting nondepolarizing ester neuromuscular blocking drug. *Anesthesiology* 68:723-732

91. Savarese JJ, Ali HH, Basta SJ, Scott RP, Embree PB, Wastila WB, Abou-Donia MM, Gelb C (1989) The cardiovascular effects of mivacurium chloride (BW B1090U) in patients receiving nitrous oxide-opiate-barbiturate anesthesia. *Anesthesiology* 70:386-394
92. Savarese JJ, Lien CA, Belmont MR, Wastila WB (1997) [The clinical pharmacology of new benzylisoquinoline-diester compounds, with special consideration of cisatracurium and mivacurium]. *Der Anaesthesist* 46:840-849
93. Sener EB, Ustun E, Kocamanoglu S, Tur A (2002) Prolonged apnea following succinylcholine administration in undiagnosed acute organophosphate poisoning. *Acta Anaesthesiol Scand* 46:1046-1048
94. Soreq H, Zamir R, Zevin-Sonkin D, Zakut H (1987) Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Human genetics* 77:325-328
95. Sprung J, Castellani WJ, Srinivasan V, Udayashankar S (1998) The effects of donepezil and neostigmine in a patient with unusual pseudocholinesterase activity. *Anesth Analg* 87:1203-1205
96. Sunew KY, Hicks RG (1978) Effects of neostigmine and pyridostigmine on duration of succinylcholine action and pseudocholinesterase activity. *Anesthesiology* 49:188-191
97. Svensmark O (1965) Molecular Properties of Cholinesterases. *Acta Physiol Scand Suppl*:SUPPL:245:241-274
98. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Kharazi H, Tavilani H, Aminiani M, Kiani A, Vaisi-Raygani A, Pourmotabbed T (2007) Determination of butyrylcholinesterase (BChE) phenotypes to predict the risk of prolonged apnea in persons receiving succinylcholine in the healthy population of western Iran. *Clin Biochem* 40:629-633
99. Valentino RJ, Lockridge O, Eckerson HW, La Du BN (1981) Prediction of drug sensitivity in individuals with atypical serum cholinesterase based on in vitro biochemical studies. *Biochem Pharmacol* 30:1643-1649
100. van den Broek MP, Groenendaal F, Egberts AC, Rademaker CM (2010) Effects of hypothermia on pharmacokinetics and pharmacodynamics: a systematic review of preclinical and clinical studies. *Clin Pharmacokinet* 49:277-294
101. Wiesner G, Gruber M, Keyl C, Schneider A, Drescher J, Hobbhahn J (2001) In vitro effects of fluoride on pseudocholinesterase activity and the metabolism of the cis-trans and trans-trans isomers of mivacurium. *Anesthesiology* 95:806-807
102. Yang HS, Goudsouzian N, Martyn JA (1996) Pseudocholinesterase-mediated hydrolysis is superior to neostigmine for reversal of mivacurium-induced paralysis in vitro. *Anesthesiology* 84:936-944

- 
103. Zencirci B (2009) Pseudocholinesterase enzyme deficiency: a case series and review of the literature. *Cases journal* 2:9148
  104. Zsigmond EK, Downs JR (1971) Plasma cholinesterase activity in newborns and infants. *Can Anaesth Soc J* 18:278-285

## 7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

### Poster-Präsentation

9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Pharmakologie und Therapie 1999, Wuppertal:

„In-vitro-Metabolisierung von Mivacurium durch lösliche humane Cholinesterase und durch Humanserum mit normaler und atypischer Pseudocholinesterase-Aktivität“

S. Breuckmann, M. Theisohn, C. Müller, G. Joseph, U. Börner, R. Laubinger, C. Diefenbach, W. Buzello, W. Klaus; Institut für Pharmakologie und Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität zu Köln

### Freier Vortrag

Deutscher Anästhesie-Kongress 2000, München:

„In-vitro-Metabolisierung von Mivacurium durch Seren mit normaler und atypischer Pseudocholinesterase-Aktivität“

S. Breuckmann, C. Müller, G. Joseph, R. Laubinger, M. Theisohn, C. Diefenbach, U. Börner, W. Klaus, W. Buzello; Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin und Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln

## 8 Anhang

### 8.1 Diagramme zur Linearität

Abbildung 30: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von cis-Säure zwischen 0,04 und 2  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Messdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9983$

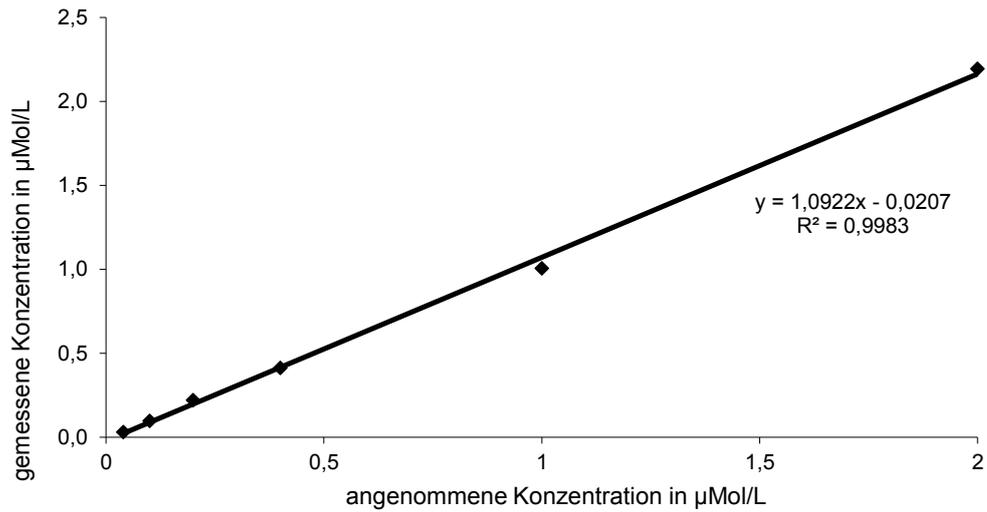


Abbildung 31: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von trans-Säure zwischen 0,16 und 8  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9993$

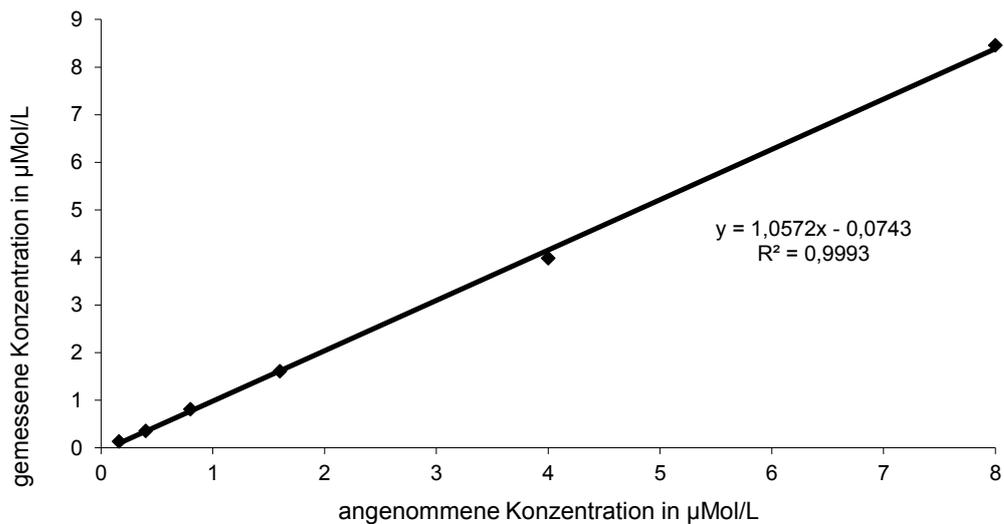


Abbildung 32: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von *cis*-Alkohol zwischen 0,042 und 2,1  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Messdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9984$

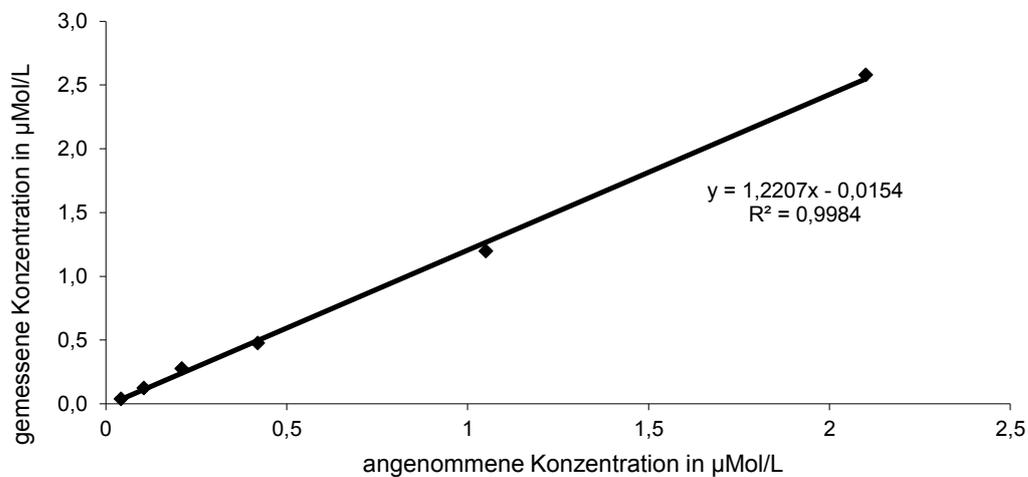


Abbildung 33: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von *trans*-Alkohol zwischen 0,158 und 7,9  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9985$

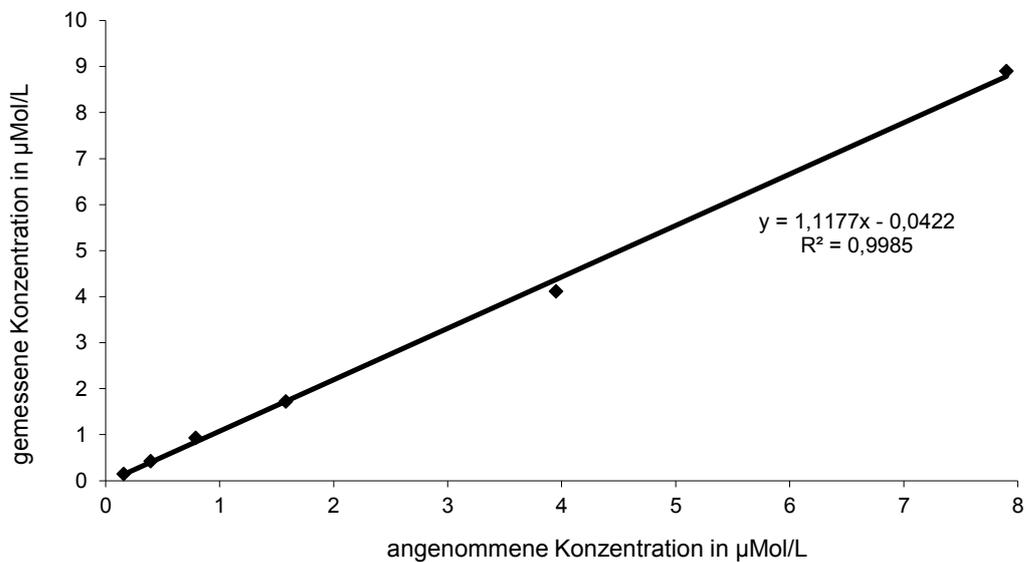


Abbildung 34: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von Mivacurium-cc zwischen 0,012 und 0,6  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9981$

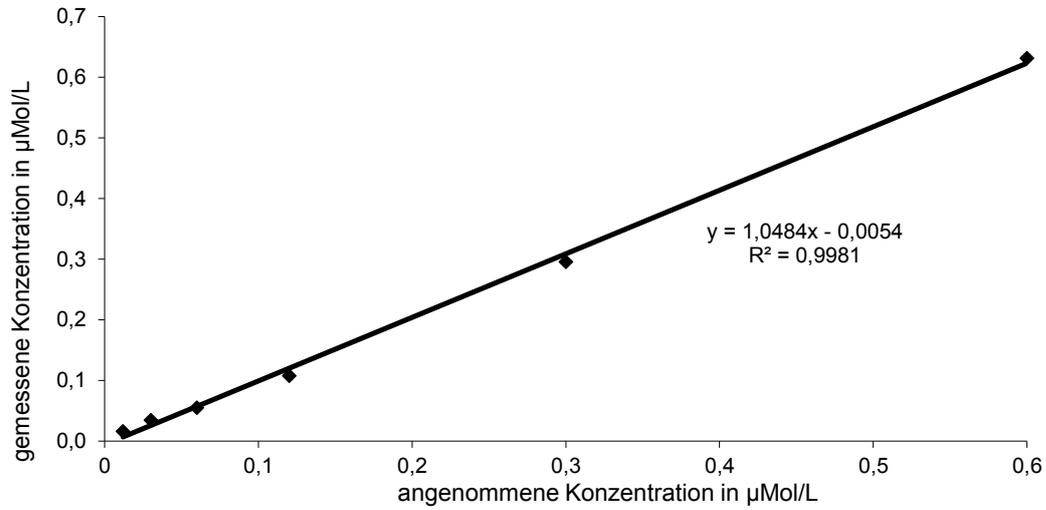


Abbildung 35: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von Mivacurium-ct zwischen 0,068 und 3,4  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9982$

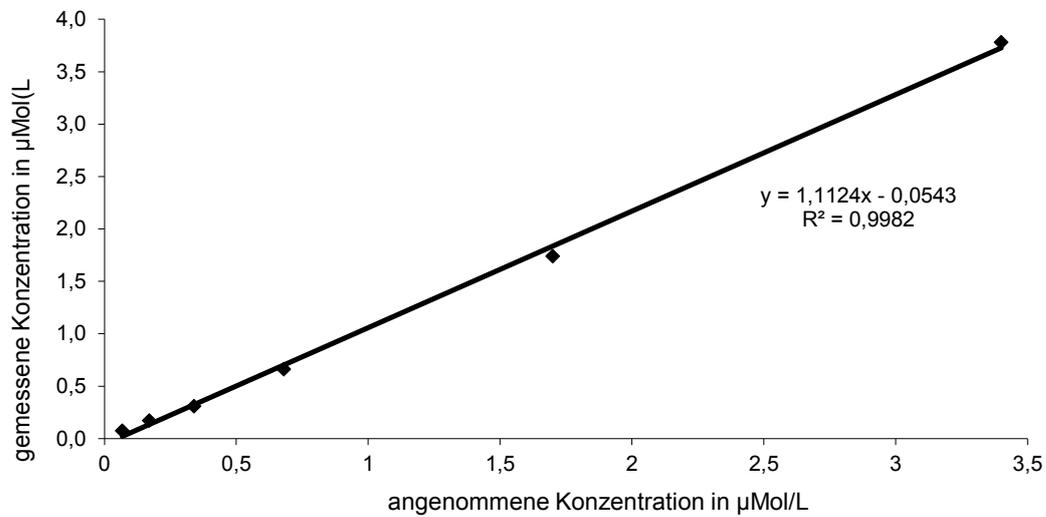
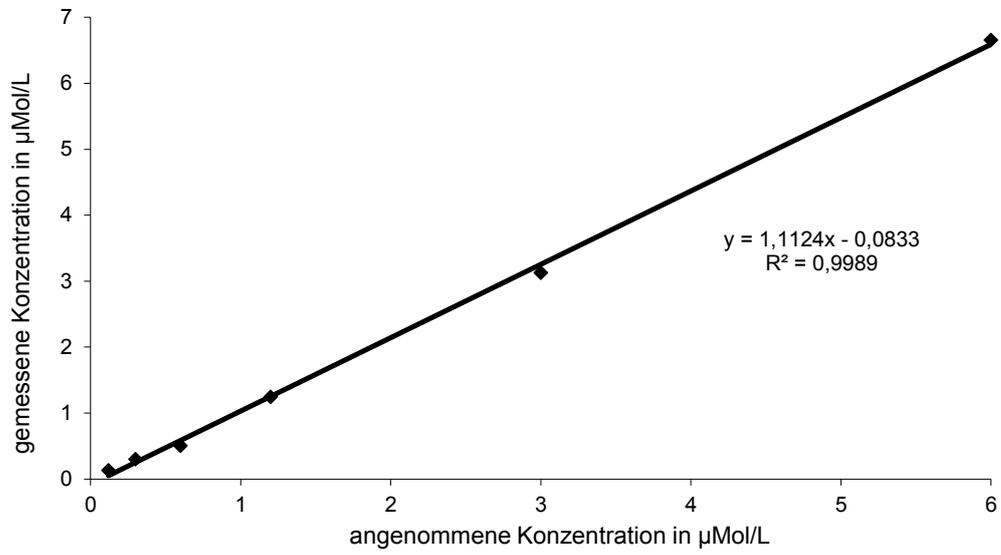


Abbildung 36: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von Mivacurium-*tt* zwischen 0,12 und 6  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9989$



## 8.2 Tabellen zur Intra-Assay-Variabilität

Tabelle 28: Intra-Assay-Variabilität der Mivacurium-Isomere bei 1 µMol/L Substanzgesamtconzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten.

<b>Mivacurium 1 µmol/l</b>	Peakfläche ISTD d-Tubocurarin	Peakfläche <b>M-cc</b> (0,06 µmol/L)	Peakfläche <b>M-ct</b> (0,34 µmol/L)	Peakfläche <b>M-tt</b> (0,6 µmol/L)	Quotient M-cc/ISTD	Quotient M-ct/ISTD	Quotient M-tt/ISTD
1	6160973	163754	1236760	2234268	0,027	0,201	0,363
2	6144540	152326	1100154	2070093	0,025	0,179	0,337
3	6325400	197103	1307151	2460758	0,031	0,207	0,389
4	5846668	152354	1106020	2029556	0,026	0,189	0,347
5	6212635	175307	1226233	2273060	0,028	0,197	0,366
6	6248546	159084	1141886	2146312	0,025	0,183	0,343
7	5744991	167725	1167703	2294150	0,029	0,203	0,399
<b>Mittelwert</b>					<b>0,027</b>	<b>0,194</b>	<b>0,363</b>
<b>S.D.</b>					<b>0,002</b>	<b>0,011</b>	<b>0,024</b>
<b>S.D.%</b>					<b>8,32</b>	<b>5,47</b>	<b>6,47</b>

Tabelle 29: Intra-Assay-Variabilität der Mivacurium-Isomere bei 10 µMol/L Substanzgesamtconzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten.

<b>Mivacurium 10 µmol/l</b>	Peakfläche ISTD d-Tubocurarin	Peakfläche <b>M-cc</b> (0,6 µmol/L)	Peakfläche <b>M-ct</b> (3,4 µmol/L)	Peakfläche <b>M-tt</b> (6 µmol/L)	Quotient M-cc/ISTD	Quotient M-ct/ISTD	Quotient M-tt/ISTD
1	6301408	2070849	14061778	24722362	0,329	2,232	3,923
2	6432857	2085764	13813018	25082444	0,324	2,147	3,899
3	5919792	2054572	13709336	24926818	0,347	2,316	4,211
4	6261944	2083022	13676586	25451968	0,333	2,184	4,065
5	5926981	1971372	14185282	24493138	0,333	2,393	4,132
6	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert
7	6232368	1946984	13341925	25286178	0,312	2,141	4,057
<b>Mittelwert</b>					<b>0,330</b>	<b>2,235</b>	<b>4,048</b>
<b>S.D.</b>					<b>0,011</b>	<b>0,101</b>	<b>0,120</b>
<b>S.D.%</b>					<b>3,46</b>	<b>4,51</b>	<b>2,96</b>

Tabelle 30: Intra-Assay-Variabilität des Säuremetaboliten bei 1 µMol/L Substanzgesamtconzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten.

Säuremetabolit 1 µmol/l	Peakfläche ISTD d-Tubocurarin	Peakfläche Sre-cis (0,2 µmol/L)	Peakfläche Sre-trans (0,8 µmol/L)	Quotient Sre cis/ISTD	Quotient Sre tr/ISTD
1	6160973	451200	1560618	0,073	0,253
2	6144540	451006	1564124	0,073	0,255
3	6325400	460233	1574964	0,073	0,249
4	5846668	444172	1547175	0,076	0,265
5	6212635	455750	1559869	0,073	0,251
6	6248546	462083	1532244	0,074	0,245
7	5744991	456573	1536937	0,079	0,268
<b>Mittelwert</b>				<b>0,075</b>	<b>0,255</b>
<b>S.D.</b>				<b>0,002</b>	<b>0,008</b>
<b>S.D.%</b>				<b>3,20</b>	<b>3,20</b>

Tabelle 31: Intra-Assay-Variabilität des Säuremetaboliten bei 10 µMol/L Substanzgesamtconzentration; dargestellt sind je-weils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten.

Säuremetabolit 10 µmol/l	Peakfläche ISTD d-Tubocurarin	Peakfläche Sre-cis (2 µmol/L)	Peakfläche Sre-trans (8 µmol/L)	Quotient Sre cis/ISTD	Quotient Sre tr/ISTD
1	6301408	4178091	15061050	0,663	2,390
2	6432857	4027760	15251130	0,626	2,371
3	5919792	3989101	15209838	0,674	2,569
4	6261944	4056226	15399499	0,648	2,459
5	5926981	3993073	15232797	0,674	2,570
6	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert
7	6232368	3822330	14616355	0,613	2,345
<b>Mittelwert</b>				<b>0,650</b>	<b>2,451</b>
<b>S.D.</b>				<b>0,025</b>	<b>0,100</b>
<b>S.D.%</b>				<b>3,91</b>	<b>4,06</b>

Tabelle 32: Intra-Assay-Variabilität des Alkoholmetaboliten bei 1  $\mu\text{Mol/L}$  Substanzgesamtconzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten.

Alkoholmetabolit 1 $\mu\text{mol/l}$	Peakfläche ISTD d-Tubocurarin	Peakfläche Alk-cis (0,21 $\mu\text{mol/L}$ )	Peakfläche Alk-trans (0,79 $\mu\text{mol/L}$ )	Quotient Alk-cis/ISTD	Quotient Alk-tr/ISTD
1	6160973	723109	2282463	0,117	0,370
2	6144540	667922	2248796	0,109	0,366
3	6325400	703841	2390600	0,111	0,378
4	5846668	646590	2207910	0,111	0,378
5	6212635	645660	2203170	0,104	0,355
6	6248546	646518	2291915	0,103	0,367
7	5744991	643286	2232768	0,112	0,389
<b>Mittelwert</b>				<b>0,110</b>	<b>0,372</b>
<b>S.D.</b>				<b>0,005</b>	<b>0,011</b>
<b>S.D.%</b>				<b>4,41</b>	<b>2,93</b>

Tabelle 33: Intra-Assay-Variabilität des Alkoholmetaboliten bei 10  $\mu\text{Mol/L}$  Substanzgesamtconzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten.

Alkoholmetabolit 10 $\mu\text{mol/l}$	Peakfläche ISTD d-Tubocurarin	Peakfläche Alk-cis (2,1 $\mu\text{mol/L}$ )	Peakfläche Alk-trans (7,9 $\mu\text{mol/L}$ )	Quotient Alk-cis/ISTD	Quotient Alk-tr/ISTD
1	6301408	6792165	21769590	1,078	3,455
2	6432857	6991939	22067908	1,087	3,430
3	5919792	6865856	22030774	1,160	3,722
4	6261944	6991188	22256252	1,116	3,554
5	5926981	6861154	22007434	1,158	3,713
6	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert	kein Wert
7	6232368	6674721	21336324	1,071	3,423
<b>Mittelwert</b>				<b>1,112</b>	<b>3,550</b>
<b>S.D.</b>				<b>0,040</b>	<b>0,138</b>
<b>S.D.%</b>				<b>3,57</b>	<b>3,89</b>

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	1: Strukturformel Mivacurium (eigene Darstellung).....	4
Abbildung	2: Modell der Metabolisierung von Mivacurium (eigene Darstellung) – der Angriff der Pseudocholinesterase (PChE) erfolgt zweizeitig an den beiden Esterbindungen .....	5
Abbildung	3: Beispiel-Chromatogramm einer Serumprobe mit Darstellung der Peaks aller analysierten Substrat- und Metabolit-Isomere sowie dem internen Standard (ISTD) .....	20
Abbildung	4: Konzentrationsverlauf von Mivacurium-tt bei Einsatz von Normalserum .....	26
Abbildung	5: Konzentrationsverlauf von Mivacurium-ct bei Einsatz von Normalserum .....	26
Abbildung	6: Konzentrationsverlauf von Mivacurium-cc bei Einsatz von Normalserum .....	27
Abbildung	7: Konzentrationsverlauf der cis-Säureentstehung bei Verwendung von Normalserum .....	29
Abbildung	8: Konzentrationsverlauf der trans-Säureentstehung bei Verwendung von Normalserum .....	29
Abbildung	9: Konzentrationsverlauf der cis-Alkoholentstehung unter Einsatz von Normalserum.....	31
Abbildung	10: Konzentrationsverlauf der trans-Alkoholentstehung unter Einsatz von Normalserum .....	31
Abbildung	11: Temperaturabhängigkeit des Mivacuriumabbaus – Summe der analysierten Mivacurium-Isomere bei 37°C versus 27°C; dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 7) .....	32
Abbildung	12: Säureentstehung bei 37°C und 27°C; Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung (n = 7).....	34
Abbildung	13: Alkoholentstehung bei 37°C und 27°C; Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung (n = 7).....	34
Abbildung	14: Prozentuale Verteilung von cis- und trans-Alkoholmetabolit bei Metabolisierung unter 37°C und 27°C .....	35
Abbildung	15: Prozentuale Verteilung von cis- und trans-Säuremetabolit bei Metabolisierung unter 37°C und 27°C .....	35
Abbildung	16: Einzelmessungen der homozygoten Seren (n = 5) – Abbau von Mivacurium-cc.....	37
Abbildung	17: Einzelmessungen der homozygoten Seren (n = 5) – Abbau von Mivacurium-ct.....	38
Abbildung	18: Einzelmessungen der homozygoten Seren (n = 5) – Abbau von Mivacurium-tt .....	38
Abbildung	19: Einzelmessungen der heterozygoten Seren (n = 10) – Konzentrationsverlauf Mivacurium-ct.....	40
Abbildung	20: Einzelmessungen der heterozygoten Seren (n = 10) – Konzentrationsverlauf Mivacurium-tt .....	40
Abbildung	21: Einzelmessungen der heterozygoten Seren (n = 10) – Konzentrationsverlauf Mivacurium-cc.....	41
Abbildung	22: cis-Säure – Einzelmessungen der heterozygoten Seren (n = 10).....	43
Abbildung	23: trans-Säure – Einzelmessungen der heterozygoten Seren (n = 10).....	43
Abbildung	24: cis-Alkohol – Einzelmessungen der heterozygoten Seren (n = 10) .....	45
Abbildung	25: trans-Alkohol – Einzelmessungen der heterozygoten Seren (n = 10).....	45
Abbildung	26: Metabolisierungsverläufe des Substrats Mivacurium (Miva ges) und seines Alkohol-(Alk ges) und Säure-(Sre ges) Metaboliten – heterozygote Seren (n = 10) versus Normalserum (n = 7); dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung.....	46
Abbildung	27: Mittelwerte und Standardabweichungen der Halbwertszeiten heterozygoter Seren (n = 10) im Vergleich mit Normalserum (n = 7).....	47
Abbildung	28: Absolutmengen (Mittelwert und Standardabweichung) des entstandenen Säuremetaboliten, aufgeschlüsselt nach cis- und trans-Isomeren – Normalserum (n = 7) und heterozygote Seren (n = 10) im Vergleich .....	48
Abbildung	29: Absolutmengen (Mittelwert und Standardabweichung) des entstandenen Alkoholmetaboliten, aufgeschlüsselt nach cis- und trans-Isomeren – Normalserum (n = 7) und heterozygote Seren (n = 10) im Vergleich .....	49
Abbildung	30: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von cis-Säure zwischen 0,04 und 2 µMol/L (Gesamtracemat 0,2 bis 10 µMol/L); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Messdaten, Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9983$ .....	81
Abbildung	31: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von trans-Säure zwischen 0,16 und 8 µMol/L (Gesamtracemat 0,2 bis 10 µMol/L); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9993$ .....	81
Abbildung	32: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von cis-Alkohol zwischen 0,042 und 2,1 µMol/L (Gesamtracemat 0,2 bis 10 µMol/L); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Messdaten, Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9984$ .....	82
Abbildung	33: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von trans-Alkohol zwischen 0,158 und 7,9 µMol/L (Gesamtracemat 0,2 bis 10 µMol/L); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9985$ .....	82

- 
- Abbildung 34: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von Mivacurium-cc zwischen 0,012 und 0,6  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9981$  ..... 83
- Abbildung 35: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von Mivacurium-ct zwischen 0,068 und 3,4  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9982$  ..... 83
- Abbildung 36: Darstellung der Linearität des Messverfahrens von Mivacurium-tt zwischen 0,12 und 6  $\mu\text{Mol/L}$  (Gesamtracemat 0,2 bis 10  $\mu\text{Mol/L}$ ); die Gleichung der Geraden ergab sich aus der Regressionsanalyse der Meßdaten, Korrelationskoeffizient  $R^2 = 0,9989$  ..... 84

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle	1: Mivacurium – chemische Daten .....	4
Tabelle	2: Pharmakokinetische Parameter der drei Isomere von Mivacurium im Literaturvergleich; Cl = Clearance, $T_{1/2}$ = Plasmahalbwertszeit, Vd = Verteilungsvolumen .....	6
Tabelle	3: häufigste genetische PChE-Varianten, ihre Bezeichnung und klinische Eigenschaften; [58] nach [53] .....	11
Tabelle	4: Bezeichnung, chemische Formeln und Herkunft der verwendeten Chemikalien .....	13
Tabelle	5: Bezeichnung und Herstellernamen der verwendeten Geräte .....	13
Tabelle	6: Liste der fünf untersuchten homozygote Seren .....	15
Tabelle	7: Liste der zehn untersuchten heterozygote Seren .....	16
Tabelle	8: Bestandteile und Einstellungen der HPLC-Apparatur .....	19
Tabelle	9: gewählte Einstellungen der HPLC-Hardware .....	19
Tabelle	10: Zusammensetzung der flüssigen Phase – Stammlösungen und Elutionen .....	19
Tabelle	11: Schema des verwendeten Gradienten .....	20
Tabelle	12: Inter-Assay-Variabilität von 1 $\mu\text{Mol/L}$ -Proben an sieben Bestimmungstagen – Mivacurium .....	22
Tabelle	13: Inter-Assay-Variabilität von 1 $\mu\text{Mol/L}$ -Proben an sieben Bestimmungstagen – Säuremetabolit .....	22
Tabelle	14: Inter-Assay-Variabilität von 1 $\mu\text{Mol/L}$ -Proben an sieben Bestimmungstagen – Alkoholmetabolit .....	22
Tabelle	15: Halbwertszeiten und Standardabweichung der Mivacurium-Isomere in Minuten bei 37°C und bei 27°C .....	33
Tabelle	16: Mivacurium-Umsatz und PChE-Umsatzkapazität im Temperaturvergleich 37°C versus 27°C (Eins. = Einsatz; Ums_Kap = Umsatzkapazität, bez. = bezogen) .....	33
Tabelle	17: Metabolitenstehung im Temperaturvergleich – Darstellung der prozentualen Anteile entstandener Säure – und Alkoholmetabolite sowie cis- und trans-Metabolite in Bezug zur absolut entstandenen Metabolitgesamtmenge .....	36
Tabelle	18: Halbwertszeiten in Minuten der Mivacurium-Isomere bei Einsatz von homozygoten Seren im Vergleich mit dem Spontanzfall (ohne Zugabe von Serum) .....	39
Tabelle	19: Halbwertszeiten aller untersuchten heterozygoten Seren (n = 10) .....	42
Tabelle	20: Mivacurium-Umsatz absolut und prozentual (bezogen auf die eingesetzte Substratmenge) sowie die daraus abgeleitete PChE-Kapazität im Vergleich – Normalserum versus heterozygote Seren .....	47
Tabelle	21: Prozentuale Anteile der aus Mivacurium entstandenen Säure- und Alkoholmengen sowie Verteilung auf cis- bzw. trans-Gruppen – Normalserum versus heterozygote Seren .....	49
Tabelle	22: Aufstellung der in-vitro-Arbeiten – Halbwertszeiten, PChE-Aktivität (Akt. PChE), Substratkonzentrationen (Konz. Miva): Laurin [59]; Wiesner [101]; Lien [60] (personal communication); Cook [19]; ** nur Bestimmung der Racemat-Halbwertszeit .....	54
Tabelle	23: Aufstellung der in-vivo-Arbeiten – Halbwertszeiten, PChE-Aktivität (Akt. PChE) und Substratkonzentrationen (Konz. Miva): Lacroix [56], Head-Rapson [40], Lien [60], Cook [20] .....	54
Tabelle	24: Modell A nach Nigrovič (Angabe der Isomeranteile am Mivacurium-Racemat in Prozent) .....	56
Tabelle	25: Modell B nach Nigrovič (Angabe der Isomeranteile am Mivacurium-Racemat in Prozent) .....	56
Tabelle	26: Modell B nach Nigrovič, erweitert um den 2. Metabolisierungsschritt nach Laurin .....	58
Tabelle	27: Modell B nach Nigrovič/Laurin mit den Zahlen der vorliegenden Studie .....	58
Tabelle	28: Intra-Assay-Variabilität der Mivacurium-Isomere bei 1 $\mu\text{Mol/L}$ Substanzgesamt-konzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten .....	85
Tabelle	29: Intra-Assay-Variabilität der Mivacurium-Isomere bei 10 $\mu\text{Mol/L}$ Substanzgesamt-konzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten .....	85
Tabelle	30: Intra-Assay-Variabilität des Säuremetaboliten bei 1 $\mu\text{Mol/L}$ Substanzgesamt-konzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten .....	86
Tabelle	31: Intra-Assay-Variabilität des Säuremetaboliten bei 10 $\mu\text{Mol/L}$ Substanzgesamt-konzentration; dargestellt sind je-weils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten .....	86
Tabelle	32: Intra-Assay-Variabilität des Alkoholmetaboliten bei 1 $\mu\text{Mol/L}$ Substanzgesamt-konzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechne-ten Flächenquotienten .....	87

---

Tabelle	33: Intra-Assay-Variabilität des Alkoholmetaboliten bei 10 µMol/L Substanzgesamtconzentration; dargestellt sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient der aus den ermittelten Peakflächen errechneten Flächenquotienten.....	87
---------	---	----



## 9 Lebenslauf

**Sarah Breuckmann**

geboren am 24. August 1968 in Solingen

### AUSBILDUNG

- 1979 - 1988            Heinrich-Heine-Gymnasium in Köln, *Allgemeine Hochschulreife*  
08/1988 – 07/1989    Au-pair in Paris, *Sprachschulabschluss des Institut Catholique*  
10/1989 – 10/1997    Studium der Humanmedizin Universität zu Köln, *Staatsexamen*

### BERUFLICHER WERDEGANG

- seit 12/1997            Experimentelle Dissertationsarbeit „*In-vitro-Metabolisierung von Mivacurium durch Seren mit normaler und atypischer Pseudocholinesterase*“
- 01/1998 - 08/1999    Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität zu Köln (ÄIP)
- 08/1999 - 02/2000    Stipendiatin der Graduiertenförderung des Landes NRW
- 03/2000 - 02/2001    Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität zu Köln
- 05/2001 - 09/2005    Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Charité Berlin CVK
- 10/2005 - 02/2009    Assistenzärztin Abteilung für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Ev. Waldkrankenhaus Berlin-Spandau
6. März 2007            Erwerb des Titels Fachärztin für Anästhesie und Intensivmedizin
- 11/2008                Arbeitsaufenthalt mit „Interplast“ in Chalsa (Darjeeling), Indien
- 03/2009 - 08/2010    Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin Krankenhaus MOL
- 01/2010 - 12/2010    Honorartätigkeit bei Brodel/Müller-Brodel im Bereich ambulante Anästhesie, Berlin
- seit 09/2010            Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Auguste-Viktoria-Klinikum Berlin
- seit 11/2011            Honorartätigkeit Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Krankenhaus MOL

Köln, den 9. September 2014