Diplomarbeit

Genderspezifische Unterschiede in der in vivo Pharmakokinetik des Muskelrelaxans Cisatracurium

eingereicht von

Andreas Domke

Mat.Nr.: 0533867

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Physiologische Chemie

unter der Anleitung von

Univ. Prof. Dr. Karl Öttl

Graz, am …….. …….

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i
Danksagungen iv
Zusammenfassung v
Abstract vi
Glossar und Abkürzungen vii
Abbildungsverzeichnis viii
Tabellenverzeichnis ix
1 Einleitung 1
1.1 Einteilung und Verwendung von Muskelrelaxanzien 1
1.2 Geschichte der Muskelrelaxanzien 1
1.3 Wirkung peripherer Muskelrelaxanzien 2
1.4 Cisatracurium 4
1.4.1 Unterschiede zu Atracurium 4
1.4.2 Abbau 4
1.4.3 Bedeutung der Isomerie 5
1.4.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede 7
1.5 Grundzüge der Pharmakokinetik 8
1.5.1 Begriffsklärung 8
1.5.2 Resorption, Verteilung und Elimination 8
1.5.3 Modelle und wichtige Begriffe der Pharmakokinetik 9
2 Material und Methoden 12
2.1 Vorbemerkung 12
2.2 PatientInnen 12
2.3 Anästhesie 13
2.4 Probengewinnung 14
2.5 Probenvorbereitung 15
2.6 Standardreihe 15
2.7 In vitro Versuche 15
2.8 High performance liquid chromatography (HPLC) 16
2.8.1 Grundlagen der HPLC 16
2.8.2 Anlage und Methode der HPLC 16
2.9 Konzentrationsbestimmung 19
2.10 Beschreibung der Pharmakokinetik 21
2.11 Statistische Analyse 24
2.11.1 Student t-Test 24

2.11.2 Varianzanalyse ... 25
2.11.3 Korrelationsanalyse ... 25
3 Ergebnisse – Resultate ... 27
3.1 PatientInnen ... 27
3.2 Gemessene Konzentration ... 27
3.3 Pharmakokinetische Parameter ... 28
3.4 Korrelation Clearance und Gewicht ... 29
3.5 Einfluss des Alters auf die Clearance ... 31
3.6 Korrelation zwischen Alter, Größe, Gewicht und V_1 oder V_2 ... 31
3.7 In vitro Ergebnisse ... 34
4 Diskussion ... 35
4.1 Ziele der Arbeit ... 35
4.2 Zusammenfassung der in vitro Versuche ... 36
4.3 Zusammenfassung der in vivo Ergebnisse ... 37
4.4 Vergleichbarkeit und Aussagekraft ... 39
4.5 Bewertung des Modells und des benutzten Programms ... 41
4.6 Bewertung der Korrelationsanalysen ... 42
4.6.1 Clearance ... 42
4.6.2 V_1 und V_2 ... 42
4.7 Vor der nächsten Studie ... 43
4.7.1 Modellvergleiche ... 43
4.7.2 Korrelationsanalysen ... 43
4.7.3 Halbwertszeit ... 43
4.8 Zusammenfassung ... 43
5 Literaturverzeichnis ... 45

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am …… *Unterschrift*

Danksagungen

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Univ.Prof.Dr. Karl Öttl, der mit unglaublich viel Einsatz und Mühe diese Arbeit betreut hat und von dem ich viel gelernt habe.

Für die Organisation der Proben danke ich Priv.-Doz.Dr. Ashraf Dahaba.

Für die Hilfestellungen in statistischen Fragestellungen und in der pharmakokinetischen Modellerstellung danke ich Univ.Prof. Dr.Gilbert Reibenegger.

Im Labor haben mir Dipl.MTA Doris Payerl und Martina Brtnik sehr geholfen, wofür ich mich bedanken möchte.

Danke auch meiner Studienkollegin Victoria Lirscher für die super Zusammenarbeit.

Ein sehr großer Dank gehört meiner lieben Familie, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Meiner Freundin Lucia Vesely danke ich für die Tipps und Ratschläge beim Schreiben dieser Arbeit und dass sie immer für mich da ist. Mit ihr wird jeder Tag zu einem Besonderen.

Zusammenfassung

Cisatracurium ist eines von 10 Isomeren von Atracurium und findet als modernes, nebenwirkungsarmes und potentes Muskelrelaxans breite Anwendung in der Anästhesie. Es wird zum großen Teil organunabhängig eliminiert und eignet sich deshalb auch bei Älteren und bei PatientInnen mit Niereninsuffizienz zur Muskelralaxation. Studien, die sich mit der Pharmakokinetik von Cisatracurium beschäftigen, sind rar und zum Teil widersprüchlich.

Das Ziel dieser Arbeit war zu überprüfen, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pharmakokinetik von Cisatracurium gibt. Außerdem sollte der Einfluss verschiedener Parameter auf die Clearance und das zentrale Kompartiment überprüft werden.

Es wurden venös abgenommene Blutproben, die intraoperativ nach einem festen Zeitplan in Sarajevo/Bosnien und Herzegowina gewonnen wurden, von 39 PatientInnen analysiert. Mittels high performance liquid chromatography (HPLC) wurde die Cisatracuriumkonzentration bestimmt. Auf Grundlage der gemessenen Konzentrationen, und in Annahme eines Zwei-Kompartiment-Modells mit zentraler Elimination, erfolgte die computergestützte pharmakokinetische Modellerstellung mit der Scientist 3.0 Software. Berechnet wurden die Konstanten k_{01}, k_{12}, k_{21}, sowie das Volumen des zentralen Kompartiments V_1. Auf Grundlage dieser vier Werte konnten alle weiteren wichtigen pharmakokinetischen Parameter berechnet und überprüft werden, ob geschlechtsspezifische Unterschiede vorlägen. Außerdem wurde überprüft, ob bestimmte Parameter durch Alter, Gewicht oder Größe beeinflusst werden.

Zusätzlich wurden in vitro Versuche zum Abbau von Cisatracurium im Vollblut von 8 freiwilligen ProbandInnen durchgeführt. Der Konzentrationsverlauf wurde daraufhin mit dem der in vivo Proben verglichen.

Es konnten im Einklang mit bereits vorhandener Literatur keine Unterschiede in der Pharmakokinetik von Cisatracurium zwischen Frauen und Männern festgestellt werden. Nicht bestätigen ließen sich Beobachtungen aus anderen Arbeiten, dass die Clearance durch Alter und oder Übergewicht beeinflusst wird. Im Einklang mit bereits vorhandener Literatur konnte diese Arbeit bestätigen, dass es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Pharmakokinetik von Cisatracurium gibt, was vor allem mit der organ unabhängigen Elimination erklärt wird, die bei beiden Geschlechtern gleich abläuft. Darüber hinaus wurden Beobachtungen aus anderen Arbeiten hinsichtlich Faktoren, die die Clearance beeinflussen, nicht bestätigt. Das wird darauf zurückgeführt, dass die Arbeiten zum Teil mit sehr kleinen PatientInnenzahlen gearbeitet haben und deren Ergebnisse kritisch zu hinterfragen sind.

Abstract

Cisatracurium, one of the ten isomers of atracurium, is a modern and potent neuromuscular blocking drug with little side effects and is widely used in anaesthesiology. It mainly undergoes organ independent elimination and is therefore also very useful for elderlies and patients suffering renal insufficiency. Studies concerning the pharmacokinetics of cisatracurium are rare and in parts contradictory.

The aim of this work was to describe the pharmacokinetics of Cisatracurium and identify possible gender related differences. Furthermore the impact of certain parameters, namely weight, height and age, on the clearance and the volume of the central compartment V_1 were to be analysed. For this purpose venous blood samples, taken intraoperative at certain time points from 39 patients in Sarajevo/Bosnia-Herzegovina, were analysed. Concentration of cisatracurium in the samples was measured using high performance liquid chromatography (HPLC). Based on the measured cisatracurium concentrations pharmacokinetic modelling was performed with Scientist 3.0 Software assuming a two compartment model with central elimination only. Constants k_{01},k_{12},k_{21} and the volume of the central compartment V_1 were used to calculate all relevant pharmacokinetic parameters. All parameters were analysed statistically concerning gender specific differences and if weight, age and height influences clearance or V_1. In vitro experiments concerning the degradation of cisatracurium in whole blood samples of 8 voluntary test persons were performed in the laboratory of the institute. The curve of the degradation was compared to the one obtained from the in vivo samples.

This work is in accordance with previous publications and showed that there are no differences in the pharmacokinetics of cisatracurium between men and women, which is mainly explained by organ independent elimination that is equal in both sex. Furthermore it was not possible to confirm findings of other studies, which could be explained by a to small amount of patients in other studies.

Glossar und Abkürzungen

HPLC	high performance liquid chromatography
AUC	Area under the curve
BMI	Bodymaßindex
Cl	Clearance
ED	effektive Dosis
k_{10}, k_{12}, k_{21}, k_{20}	Eliminationskonstanten
k_{eo}	Wirkortequilibrationskonstante
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
V_1 oder Vc	zentrales Verteilungsvolumen
V_{dss}	Verteilungsvolumen im steady state
V_p oder V_2	peripheres Verteilungsvolumen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Suxamethonium, ein depolarisierendes Muskelrelaxans(Quelle: (9)) 3
Abbildung 2 Rocuronium, ein nicht depolarisierendes Muskelrelaxans (Quelle: (9)) 3
Abbildung 3 Cisatracurium (Quelle: (11)) 4
Abbildung 4 Hofmann Elimination (Quelle: (13)) 5
Abbildung 5 HPLC Anlage 17
Abbildung 6 Typisches Chromatogram einer HPLC Messung mit bekannter Cisatracuriumkonzentration (2000ng/ml) 19
Abbildung 7 Beispiel einer Standardgeraden zur Berechnung unbekannter Konzentrationen 21
Abbildung 8 Verwendetes 2-Kompartiment-Modell 23
Abbildung 9 mittels Scientist erstellte Kurve, basierend auf den gemessenen Cisatracurium Konzentrationen 23
Abbildung 10 Abbau von Cisatracurium bei Männern und Frauen im Vergleich 28
Abbildung 11 Korrelation Clearance/kg und Körpergewicht 30
Abbildung 12 Korrelation Clearance/kg und BMI 30
Abbildung 13 Korrelation zwischen der Clearance/kg und dem Alter 31
Abbildung 14 Korrelation zwischen V_1 und dem Gewicht 32
Abbildung 15 Korrelation zwischen V_2 und dem Gewicht 32
Abbildung 16 Korrelation zwischen V_1 und der Größe 32
Abbildung 17 Korrelation zwischen V_2 und der Größe 33
Abbildung 18 Korrelation zwischen V_1 und dem Alter 33
Abbildung 19 Korrelation zwischen V_2 und dem Alter 33
Abbildung 20 Zeitlicher Verlauf des Cisatracuriumsabbaus in vitro und in vivo 34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Formeln zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter (Quelle: (32)).... 24

Tabelle 2 PatientInneneigenschaften: Mittelwerte (SD) 27

Tabelle 3 Gemessene Konzentrationen in $ng \cdot ml^{-1}$; Mittelwerte (SD)..... 28

Tabelle 4 Vergleich pharmakokinetischer Parameter; mit * gekennzeichnete Werte beziehen sich nur auf die Kontrollgruppe bestehend aus jeweils 10 Männern und Frauen 29

Tabelle 5 Vergleich der Mittelwerte der Clearance/kg bei Normal- (BMI<25) und Übergewichtigen (BMI>25) 31

Tabelle 6 Vergleich der Konstanten k_{10}, k_{12}, k_{21} mit zwei anderen Arbeiten. 37

Tabelle 7 Vergleich der angegebenen Clearance von Cisatracurium in verschiedenen Arbeiten. 38

1 Einleitung

1.1 Einteilung und Verwendung von Muskelrelaxanzien

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der genderspezifischen Pharmakokinetik von Cisatracurium. Cisatracurium gehört zur Gruppe der Muskelrelaxanzien, die ganz allgemein in der Lage sind, den Tonus der Skelettmuskulatur zu senken(1). Sie werden nach dem Ort ihrer Wirkung in zentrale und periphere Muskelrelaxanzien unterschieden. Die peripheren Muskelrelaxanzien werden darüber hinaus in depolarisierende, mit intrinsischer Aktivität, und nicht depolarisierende, ohne intrinsische Aktivität unterschieden. Cisatracurium gehört zu letzteren. Bei maximaler Wirkung führen Muskelrelaxanzien zur vollständigen Erschlaffung der quergestreiften Muskulatur und werden deshalb nur dort eingesetzt, wo die Möglichkeit der künstlichen Beatmung gegeben ist. Sie finden besonders breite Anwendung in der Anästhesie und Intensivmedizin, wo sie zur vereinfachten Intubation, zur maschinellen Beatmung, und zur Relaxation bei großen chirurgischen Eingriffen bei denen eine Erschlaffung der Muskulatur notwendig ist, eingesetzt werden.

1.2 Geschichte der Muskelrelaxanzien

Der Prototyp der nicht depolarisierenden Muskelrelaxanzien ist jahrhundertealt und vielen als Curare bekannt. Curare ist ein pflanzliches Gift und wurde von den indigenen Völkern Südamerikas seit langem zur Jagd verwendet. Weil es enteral nicht resorbiert wird, konnten die Tiere direkt nach der Jagd verzehrt werden. Curare erregte seit jeher das Interesse der Wissenschaftler und wurde schon von Alexander von Humboldt nach Europa gebracht. Während langwieriger Forschungsbemühungen, an denen Generationen von Wissenschaftlern beteiligt waren, wurde entdeckt, dass der Hauptwirkstoff im Curare das Alkaloid D-Tubocurarin ist, welches als kompetitiver Antagonist an den postsynaptischen nicotinergen Acetylcholinrezeptoren des neuromuskulären Spaltes wirkt. Während Curare also schon lange zur Jagd genutzt wurde, wurde es in einer reineren Form erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts als Zusatz zu Anästhetika verwendet, weil man vermutete, dass es chirurgische Interventionen erleichtern würde. Regelmäßig medizinisch vor allem in der Chirurgie genutzt werden Muskelrelaxanzien aber erst seit den vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts, nachdem man D-Tubocurarin als Hauptwirkstoff identifiziert und isoliert hatte(2,3). Seitdem wurden aus den einstmals sehr nebenwirkungsreichen Muskelrelaxanzien immer potentere, hoch spezifische und mit deutlich weniger Nebenwirkungen behaftete Muskelrelaxanzien entwickelt, von denen heute mit Ausnahme

des depolarisierenden Muskelrelaxans Suxamethonium vor allem die nicht depolarisierenden Muskelrelaxanzien zum Einsatz kommen(2). Außerdem werden sie zur Behandlung von Vergiftungen (Strychnin) oder bestimmten Erkrankungen (Tetanus) eingesetzt(3).
Zu den neueren Entwicklungen zählte auch das seit Anfang der achtziger Jahre verwendete Atracurium, das in weiterer Folge vor etwa 15 Jahren durch das Cisatracurium abgelöst wurde(4). Cisatracurium ist dabei keine Neuentwicklung, sondern eines der 10 vorkommenden Isomere des Atracuriums. Es weist deutlich weniger systemische Nebenwirkungen auf und ist 3,5-4-mal potenter(1,5,6).

1.3 Wirkung peripherer Muskelrelaxanzien

Die Paralyse der Skelettmuskulatur durch die peripheren Muskelrelaxanzien findet an den postsynaptischen nicotinergen Acetylcholinrezeptoren der muskulären Endplatte statt. Die muskuläre Erregung wird normalerweise durch, vom motorischen Axon freigesetztes, Acetylcholin ausgelöst. Das Acetylcholin diffundiert durch den Spaltraum zwischen Nerv und Muskel und aktiviert die nicotinergen Acetylcholinrezeptoren, die einen Kationenkanal öffnen, was zu einem Natrium Einstrom in die Zelle führt, der die Depolarisation und Kontraktion der Muskelzelle auslöst(3,7). Periphere Muskelrelaxanzien greifen in diesen Vorgang ein und blockieren die postsynaptischen nicotinergen Acetylcholinrezeptoren auf der muskulären Endplatte. Sie blockieren also die Erregungsübertragung vom Nerv auf den Muskel.
Dabei wirken die depolarisierenden Muskelrelaxanzien, wie das einzige heutzutage noch verwendete Suxamethoniumchlorid, dem Acetylcholin entsprechend als Agonisten am Rezeptor, verweilen aber im Gegensatz zum Acetylcholin, das binnen weniger Millisekunden von der Cholinesterase abgebaut wird, länger am Rezeptor und führen zu einer Dauerdepolarisation der Muskelzelle. Dieser Vorgang führt zu Beginn der Wirkung zu einer einmaligen muskulären Kontraktion, und darauf folgend zu einer muskulären Paralyse, da eine Repolarisation, und damit eine erneute Aktivierung der Muskelzelle im Falle einer Dauerdepolarisation, unmöglich wird. Diese Wirkung setzt sehr schnell ein und dauert nur wenige Minuten. Gerade aufgrund der schnellen Wirkung wird es immer noch zur notfallsmäßigen Intubation zum Beispiel bei Unfällen eingesetzt, obwohl die Nebenwirkungen, die vor allem durch die intrinsische Aktivität, also die Auslösung einer Muskelkontratktion, bedingt sind, zahlreich sind. Zu ihnen zählen im einfachsten Fall muskelkaterartige Schmerzen, aber auch Kreislaufveränderungen, massiver Anstieg der Serum-Kalium Konzentration und Augendruckerhöhungen sind möglich(1,8).

Bei den nicht depolarisierenden Muskelrelaxanzien kommen vor allem das Cisatracurium aus der Atracurium- und das Rocuronium aus der Vecuroniumgruppe zum Einsatz. Cisatracurium zählt dabei zu den Benzylisochinolin-Derivaten und das Rocuronium, das einen sehr schnellen Wirkungseintritt hat, zu den Aminosteroid-Muskelrelaxanzien(3). Nicht depolarisierende Muskelrelaxanzien wirken ebenfalls an den Acetylcholinrezeptoren, allerdings als hochspezifische Antagonisten und ohne intrinsische Aktivität(3). Sie blockieren die Depolarisation der Muskelzelle und sorgen auf diesem Weg für eine muskuläre Paralyse, die allerdings nicht mit einer initialen Kontraktion, wie im Falle der depolarisierenden Muskelrelaxanzien, der Muskelzelle vergesellschaftet ist.
Die unterschiedliche Wirkungsweise wird damit erklärt, dass die Moleküle verschieden gebaut sind. Denn obwohl in beiden Gruppen die positiv geladenen Stickstoffatome für die neuromuskuläre Blockade verantwortlich gemacht werden, ist die Wirkung unterschiedlich. Die depolarisierenden Muskelrelaxanzien sind kleine Moleküle und die Substituenten des Stickstoffs sind Methylgruppen, also einfache Kohlenwasserstoffverbindungen(2). Sie weisen eine große Ähnlichkeit zum Acetylcholin auf(1). Die nicht depolarisierenden Muskelrelaxanzien sind starre und große Moleküle. Die einfachen Kohlenwasserstoffverbindungen sind durch Ringstrukturen und oder durch lange Ketten ersetzt(3).

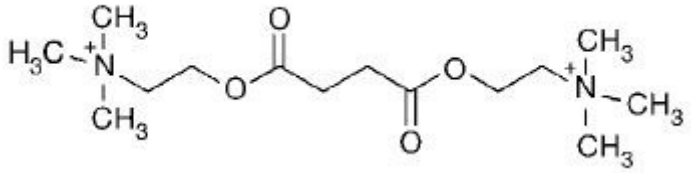

Abbildung 1 Suxamethonium, ein depolarisierendes Muskelrelaxans(Quelle: (9))

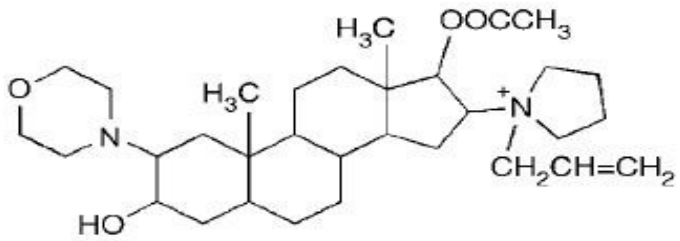

Abbildung 2 Rocuronium, ein nicht depolarisierendes Muskelrelaxans (Quelle: (9))

1.4 Cisatracurium

1.4.1 Unterschiede zu Atracurium

Cisatracurium ist das R,Cis-R´Cis Isomer des nicht depolarisierenden Muskelrelaxans Atracurium. Cisatracurium gehört zu den mittellang wirksamen, nicht depolarisierenden Muskelrelaxanzien und ist seit den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts im klinischen Einsatz. Cisatracurium ist drei bis viermal potenter als das Atracurium und kann deshalb niedriger dosiert werden. Cisatracurium bewirkt im Gegensatz zum Atracurium keine Histaminfreisetzung mit Symptomen wie Hautrötung, Tachykardien, erhöhtem Beatmungsdruck durch Kontraktion der Bronchialmuskulatur(10). Cisatracurium zeigt auch keine kardiovaskulären Nebenwirkungen(6) Die therapeutische Breite ist sehr groß und selbst ein Vielfaches der normalen Dosierung führte in Tierversuchen im Gegensatz zum Atracurium und allen anderen Isomeren zu keiner Histaminfreisetzung(4).

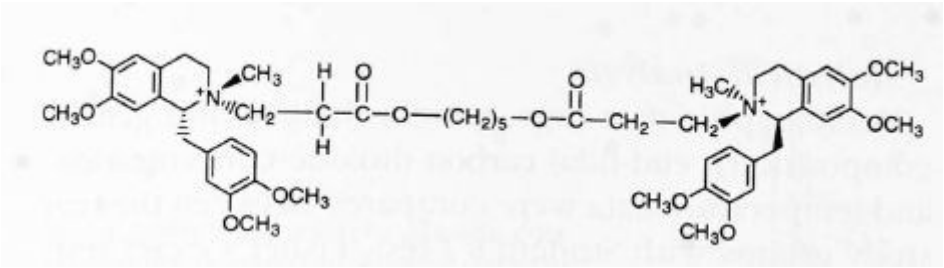

Abbildung 3 Cisatracurium (Quelle: (11))

1.4.2 Abbau

Cisatracurium ist ein polares und damit hydrophiles Molekül, das sich nach der intravenösen Applikation rasch im Plasma und im Interstitialraum verteilt. Der Abbau erfolgt auf verschiedenen Wegen, wobei der Hauptabbauweg organunabhängig ist. Nur 23% werden organabhängig über Leber und Niere abgebaut und 77% werden zu einem großen Teil über den sogenannten Hofmann Abbau eliminiert beziehungsweise zu einem kleinen Teil von unspezifischen Esterasen abgebaut(12). Hofmann, der Namensgeber des Reaktionsmechanismus, hat vor mehr als 150 Jahren entdeckt, dass quartäre Amine, die unter Anwesenheit von Natronlauge gekocht werden, in tertiäre Amine und Alkene gespalten werden. 100 Jahre später entdeckte man, dass dieser Vorgang auch bei physiologischem pH-Wert und bei Körpertemperatur stattfindet, und dass Atracurium auf diese Weise organunabhängig zu Laudanosin und zu einem monoquartären Acrylat abgebaut und inaktiviert wird (siehe Abbildung 4). In der Anwesenheit von Esterasen wird das monoquartäre Acrylat weiter abgebaut, bis am Ende unter Bildung eines weiteren Moleküls Laudanosin Acrylsäure und Pentandiol gebildet werden. So entstehen in vivo aus einem Mol Cisatracurium zwei Mol Laudanosin, 2 Mol Acrylsäure und 1Mol

Pentandiol(13). Dass die Hofmann Elimination der entscheidende Schritt in dem Abbau des Cisatracuriums ist, wird auch dadurch deutlich, dass zum einen der Abbau proportional zur Dosis steigt und damit einer Kinetik 1.Ordnung folgt. Zum anderen stimmt die in vivo Halbwertszeit mit der in vitro Halbwertszeit überein(11). Angenommen der limitierende Schritt wäre organ- beziehungsweise esterasenabhängig, wären die genannten Ergebnisse nicht möglich, weil der Abbau mit zunehmender Dosis gesättigt wäre. Außerdem wäre die in vitro Halbwertszeit im Vergeleich zur in vivo Halbwertszeit verlängert(13).

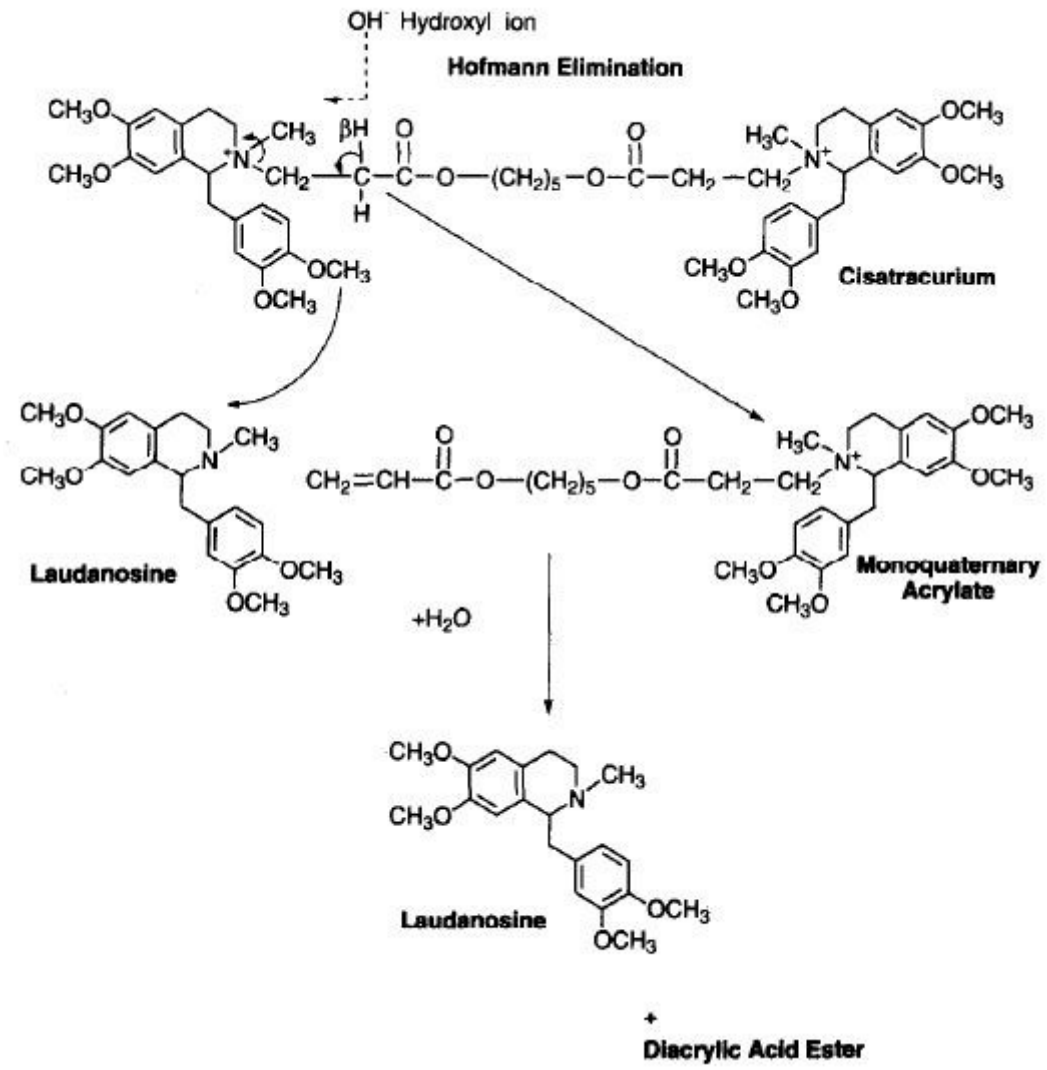

Abbildung 4 Hofmann Elimination (Quelle: (13))

1.4.3 Bedeutung der Isomerie

Cisatracurium ist eines der 10 vorkommenden Stereo- und Spiegelbildisomeren des Atracuriums, hat eine mittellange Wirkdauer und zeigt einige Unterschiede, die erklären, warum man ein bestimmtes Isomer isoliert hat, das nun fast ausschließlich verwendet wird. Isomerie bezeichnet das Phänomen, dass Moleküle mit gleicher Summenformel, also mit der gleichen Anzahl von Atomen und Ladungen, unterschiedliche Struktur und damit

unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften haben(10). Bei Einfachbindungen besteht freie Drehbarkeit der einzelnen Atome. Kommen allerdings Doppel- oder Dreifachbindungen hinzu, oder handelt es sich um Ringbindungen, ist diese freie Beweglichkeit aufgehoben und es entstehen Raum- oder Stereoisomere. Die Atome sind gleich verkettet, die Susbstituenten können allerdings auf der gleichen Seite, cis Form, oder auf der entgegengesetzten Seite einer Bindung stehen, trans-Form. Hierdurch ergeben sich unterschiedliche räumliche und energetische Beziehungen der Atome untereinander und es lässt sich sagen, dass cis-Isomere grundsätzlich energiereicher sind als trans-Isomere. Betrachtet man Moleküle mit Stickstoff (N) oder Kohlenstoff (C) Atomen, die vier verschiedene Substituenten haben und als chirale Zentren bezeichnet werden, so stellt man fest, dass Molekülpaare entstehen, die wie Spiegelbilder zueinander sind, sie sind Spiegelbildisomere oder Enantiomere(14).
Chemisch lassen sich Enantiomere nur unter gewissen Vorraussetzungen unterscheiden, sie sind jedoch in ihrer Reinform in der Lage, die Schwingungsebene linear polarisierten Lichtes um einen bestimmten Betrag, aber in verschiedene Richtungen abzulenken und können außerdem mit anderen chiralen Stoffen, zum Beispiel Enzymen und Rezeptoren, in unterschiedlicher Weise wechselwirken. Zur Charakterisierung der absoluten Konfiguration von Spiegelbildisomeren wird häufig das R/S System verwendet. Obwohl sich Spiegelbildisomere nur in ihrer Fähigkeit, in welche Richtung sie Licht ablenken können zu unterscheiden scheinen, gibt es Beispiele, in denen die eine Form biologisch aktiv ist und die andere Form entweder inaktiv oder auch eine andere Wirkung besitzt(14).
Auf Grundlage dieser theoretischen Anmerkungen lässt sich sagen, dass das Atracurium vier chirale Zentren besitzt und das Spiegelbildisomer 1R,2R,1'R,2'R mit der Cis Cis Stereoisomerkonfiguration das besagte Cisatracurium ist. Die Chiralitätszentren und die Lage der jeweiligen Substitueten ist in Abbildung 3 ersichtlich, wo Substituenten die in Richtung des Betrachters zeigen, schwarze Pfeile besitzen und Substituenten, die vom Betrachter wegzeigen, durch schwarz schraffierte Pfeile mit dem Chiralitätszentrum verbunden sind.
In verschiedenen Studien wurden die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Atracurium mit dem reinen Cisatracurium verglichen. Im Atracurium liegen die Stereoisomere in folgenden Anteilen vor: 50-55% Cis-Cis, 35-38 Cis-Trans und 6-7% Trans-Trans Isomere, die sich wiederum aus drei (Cis-Cis), vier (Cis-Trans) und drei (Trans-Trans) Spiegelbildisomeren zusammensetzen(4,15). Vergleicht man die Zeit bis zur maximalen Wirkung von Cisatracurium mit der des Atracuriums, stellt man fest, dass diese

beim Cisatracurium mit 3,4min deutlich länger als beim Atracurium ist (1,8min). Es genügen aber deutlich geringere Mengen von Cisatracurium für dieselbe Wirkung. So wurde in einer Studie mit 0,1µg·kg^{-1} Körpergewicht Cisatracurium dieselbe Wirkung gemessen wie mit 0,5µg·kg^{-1} Körpergewicht Atracurium(4). Es erscheint logisch, dass als Folge der niedrigeren Dosierung auch geringere Mengen der Abbauprodukte gemessen wurden. Zusätzlich wurde gemessen und in weiterer Folge berechnet, ob sich die Pharmakokinetik von Cisatracurium von den einzelnen Isomeren des Atracuriums unterscheidet. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass die Clearance des Cisatracuriums und der Cis-Cis Isomere im Atracurium deutlich niedriger war, als die der trans-trans und cis-trans Isomere. Es wurden keine Unterschiede in der Erholungszeit und im Erholungszeitindex gemessen(12).
Auch wenn diese Arbeit keine Aussagen über die Pharmakokinetik unterschiedliche Isomerformen machen kann, weil Cisatracurium ja schon die Reinform darstellt, ist und bleibt die Isomerie ein sehr wichtiges Thema und es war sehr wichtig, diese im Zusammenhang mit Cisatracurium näher zu beschreiben. Schon 1928 wurde ein Artikel mit dem Titel „Untersuchungen über die Ursachen der pharmakologischen Wirkungsunterschiede von optischen Isomeren“ publiziert(16). Aus neuester Vergangenheit finden sich Artikel die sich mit der Bedeutung der Stereoisomerie im Design und der Entwicklung neuer Medikamente gegen die Tuberkulose beschäftigen(17). Auch in der Anästhesiologie werden viele Medikamente wie Ketamin, Bupivacain, Ropivacain und eben Atracurium verwendet, die asymetrische Kohlenstoffe in ihrer Struktur besitzen(18). Aus dieser Zusammenstellung soll die Bedeutung der Isomerie in der Medizin deutlich werden, und dass heutzutage im Hinblick auf vielfach vorkommende Isomere und die sehr unterschiedlichen Wirkungen, die diese zum Teil besitzen, die genaue Strukturkenntnis neuer Medikamente unerlässlich ist.

1.4.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Verschiedene Arbeiten haben sich mit möglichen Geschlechtsunterschieden in der Wirkung von Muskelrelaxanzien beschäftigt. So wurde wiederholt festgestellt, dass bei Frauen sowohl die klinische Dauer als auch der Erholungsindex im Falle des Rocoroniums verlängert ist. Dieser Unterschied ließ sich beim Cisatracurium allerdings nicht finden (19,20). Eine weitere Studie hat festgestellt, dass Frauen und ältere Menschen signifikant sensitiver auf die Wirkung des Atracuriums sind, und sowohl die effektive Dosis geringer als auch die muskelrelaxierende Wirkung länger ist(21). Beim Cisatracurium wurden auch

in dieser Hinsicht bisher keine geschlechterspezifischen Unterschiede gefunden(22). Auch die Zugehörigkeit zu verschiedenen Rassen scheint keinen Einfluss auf die Pharmakodynamik zu haben, wie ein Vergleich zwischen Han Chinesen und Kaukasiern gezeigt hat(23).
In einer weiteren groß angelegten Studie zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Cisatracurium wurde zudem festgestellt, dass Gewicht, Geschlecht, renale Funktion und Typ der Anästhesie zwar wichtige Parameter der Pharmakokinetik signifikant beeinflussen, diese aber keine klinische Signifikanz besitzen. Im Genauen haben Schmith et al. in der klinischen Entwicklung Cisatracuriums mittels eines PK/PD Approach herausgefunden, dass Adipositas die Clearance (Cl) verringert und dass das zentrale Verteilungsvolumen (V_c) durch höheres Alter und im Besonderen durch Inhaltionsanästhetika vergrößert wird. Letztere erhöhen, wie auch Adipositas und weibliches Geschlecht, die Wirkortequilibrationskonstante k_{e0} und verringern die EC_{50}. Eine Kreatinin Clearance von unter $70ml \cdot min^{-1}$, als Marker einer Niereninsuffizienz, verringerte ebenfalls die k_{e0} (24).

1.5 Grundzüge der Pharmakokinetik

1.5.1 Begriffsklärung

Da sich diese Arbeit mit der Pharmakokinetik Cisatracuriums beschäftigt, ist es wichtig zu verstehen was Pharmakokinetik genau bedeutet, und welche Parameter man nutzen kann, um diese zu beschreiben. Die Pharmakokinetik beschäftigt sich mit dem, was im Organismus im zeitlichen Verlauf gesehen mit dem Pharmakon passiert und steht damit im Gegensatz zur Pharmakodynamik, die sich mit der Wirkung eines Pharmakons auf den Organismus beschäftigt. Zur Pharmakokinetik gehört also die Beschreibung der Resorption, der Verteilung in den verschieden Räumen des Körpers, der Abbau und die Elimination eines Stoffes aus dem Körper. Unter besonderer Beachtung des Cisatracuriums sollen diese Schritte beschrieben werden.

1.5.2 Resorption, Verteilung und Elimination

Die Resorption beschreibt den Weg, wie das Pharmakon in den Körper gelangt. Dies ist je nach Eigenschaft des Stoffes über verschiedenste Organe oder Systeme, wie zum Beispiel Darm, Haut oder Lunge, möglich. Im Falle des Cisatracuriums ist die Resorption über den Darm oder die Lunge allerdings nicht möglich und wäre auch nicht praktikabel, da der Wirkungseintritt direkt intravenös applizierter Medikamente viel schneller und gezielter erfolgt. So wird Cisatracurium generell intravenös verabreicht und ist somit zu 100% im Plasma verfügbar. Bei der Verteilung von Stoffen sind drei Räume von Wichtigkeit, das

Plasma (circa 4% der Gesamtkörpermasse), der Interstitial- (20%) und der Intrazellulärraum(50%)(3). Hinzu kommt ein Fettanteil von etwa 15% (25). Die genannten Anteile der einzelnen Räume an der Gesamtkörpermasse stellen nur ungefähre Werte dar und variieren sowohl zwischen Männern und Frauen als auch zwischen Jüngeren und Älteren. So ist bei Frauen der Fettanteil höher und der Gesamtwasseranteil niedriger und auch bei Älteren steigt der Fettanteil. Wie sich ein Stoff in den einzelnen Räumen verteilt, hängt entscheidend von seinen chemischen Eigenschaften und von der Bindung an Plasmaproteine ab. Im Falle des Cisatracuriums liegen etwa 62% frei und ungebunden im Plasma vor(9). Es handelt sich um einen polaren und damit hydrophilen Stoff, der nicht in Intrazellulärräume diffundiert, da die Passage der lipophilen Zellmembran eher für fettlösliche Stoffe oder für Pharmaka, die über spezielle Transporter in die Zelle gelangen, möglich ist. Man kann also davon ausgehen, dass nach Applikation Cisatracuriums vor allem eine Verteilung im Plasma und im Interstitialraum stattfindet. Wie bereits beschrieben, wird ein Großteil des Cisatracuriums organunabhängig inaktiviert und abgebaut. Die Kinetik folgt dabei einem Abbau 1.Ordnung, was bedeutet, dass der Abbau proportional zur Konzentration ist. In einer bestimmten Zeit wird also immer derselbe Anteil des Pharmakons abgebaut. Dieser Abbau lässt sich mittels einer Exponential Funktion darstellen und durch Logarithmieren erhält man eine Gerade(25). In einer früheren Studie ist ein biexponentieller Abbau des Cisatracuriums mit einem initial schnellerem Abfall der Konzentration dargestellt worden. Dies wird vor allem auf Verteilungsvorgänge vom Blut in das Gewebe zurückgeführt(12).

1.5.3 Modelle und wichtige Begriffe der Pharmakokinetik

Um Verteilungs- und Eliminationsvorgänge mathematisch beschreiben zu können und so Rückschlüsse auf das Verhalten eines Stoffes im Körper ziehen zu können, verwendet man in der Pharmakokinetik Modelle mit verschieden vielen Räumen beziehungsweise Kompartimenten. Über diese Modelle lässt sich beschreiben, wie sich ein Pharmakon wo und in welcher Geschwindigkeit verteilt und seine Wirkung entfalten kann und wiederum wie, wo und mit welcher Geschwindigkeit es abgebaut wird. Da sich in vivo praktisch nur die Verteilung im Blut und die Elimination über Harn und Stuhl wirklich messen lässt, sind die meisten Größen berechnete Werte, mit denen versucht wird, die wahre Verteilung bestmöglich wiederzugeben. Im Falle des Cisatracuriums hat sich in verschiedenen Studien gezeigt, dass die besten Ergebnisse erreicht werden, wenn von einem Zwei-Kompartiment-Modell ausgegangen wird(12,26–29). Das bedeutet, dass man davon ausgeht, dass sich Cisatracurium in einem zentralen und einem peripheren Kompartiment verteilt. Auf diese

Weise werden die rechnerischen mit den gemessenen Werten bestmöglich in Übereinstimmung gebracht. Man nimmt an, dass sich das Pharmakon nach intravenöser Applikation rasch im zentralen Kompartiment, V_1 oder V_c, also im Blut und in stark durchbluteten Organen und im weiteren Verlauf im peripheren Kompartiment, V_2 oder V_p, verteilt bis ein Fließgleichgewicht (steady state) zwischen V_1 und V_2 erreicht ist. Die Geschwindigkeit mit der diese Umverteilung stattfindet, wird durch die Geschwindigkeitskonstanten k_{12}, vom zentralen in das periphere Kompartiment, und k_{21}, vom peripheren zurück in das zentrale Kompartiment, beschrieben. Des Weiteren wird durch k_{10} beziehungsweise k_{el} die Elimination aus dem zentralen Kompartiment beschrieben(25). Mit dem scheinbaren Verteilungssvolumen, V_d, das das Verhältnis der Gesamtdosis des Pharmakons im Körper zur Konzentration im Plasma nach einer initialen intravenösen Applikation angibt, lässt sich die Dosis berechnen, die benötigt wird um eine bestimmte Konzentration im Plasma zu erreichen. Das scheinbare Verteilungsvolumen, angegeben in $l \cdot kg^{-1}$, kann bei einer Person von Pharmakon zu Pharmakon unterschiedlich sein, weil es entscheidend von den chemischen Eigenschaften des Medikamentes als auch vom Fett- und Wasseranteil der Person abhängt. So kann man erwarten, dass lipophile Medikamente ein größeres V_d bei Frauen haben, weil der Fettanteil höher ist und die initiale Dosis demnach höher sein müsste, um eine bestimmte Konzentration im Plasma zu erreichen(22). Im Falle des hydrophilen Cisatracuriums sollte man das Gegenteil erwarten können.

Es wird davon ausgegangen, dass sich, nach einer von Stoff zu Stoff unterschiedlichen Zeit, ein Fließgleichgewicht einstellt und die Konzentration im zentralen der im peripheren Kompartiment gleicht, so dass das Verteilungsvolumen im steady state, V_{dss}, die Summe aus V_1 und V_2 darstellt. Mit Cl wird die sogenannte Clearance eines Stoffes bezeichnet, also die Eliminierung eines Pharmakons aus dem Körper. Sie bezieht sich auf die ml Blut die pro Minute von einem Stoff „befreit“ werden und wird dementsprechend in $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$ angegeben. Die area under the curve (AUC), also die Fläche unter der Blutspiegel-Zeit-Kurve, ist von der aufgenommenen Arzneistoffmenge und der Gesamtclearance abhängig(3).

Die sogenannte Wirkortequilibrationskonstante k_{e0} wird als die Verbindung der Pharmakokinetik mit der Pharmakodynamik bezeichnet und ist eine mathematische Beschreibung der Verzögerung die zwischen der Verteilung eines Pharmakons im zentralen Kompartiment und dessen Erreichen eines gedachten Wirkortkompartiments auftritt. Ist k_{e0} groß findet sich ein schneller Ausgleich zwischen zentralen und

Wirkortkompartiment, die Wirkung setzt rasch ein(30). Die effektive Dosis (ED) ist die Dosis, bei der in einem bestimmten Prozentsatz, häufig 95% der behandelten PatientInnen eine Wirkung zu erwarten ist.

2 Material und Methoden

2.1 Vorbemerkung

Das durchgeführte Projekt zur Erstellung dieser Diplomarbeit wurde in Gemeinschaftsarbeit mit der Studentin Victoria Lirscher durchgeführt. Dabei war die spezifische Fragestellung unterschiedlich. Während ich mich vor allem mit der Pharmakokinetik von Cisatracurium beschäftigt habe, hat sich Victoria Lirscher vor allem mit Fragen der Pharmakodynamik befasst. Die angewandten Methoden und die untersuchten Proben waren aber die Gleichen. Daher überschneiden sich Teile des Methoden- und des Ergebnisteils.

2.2 PatientInnen

Ursprünglich war es geplant die Proben in den urologischen Operationssälen der Universitätsklinik Graz zu entnehmen, wovon aber letztendlich abgesehen wurde. Zwar gelang es, ein funktionierendes System zu etablieren, wozu gehört, dass der Operationssaal so gewählt wurde, dass der Weg zum nächsten Labor zu der weiteren Probenaufbereitung kurz war, am Tag der Probenentnahme ausreichend Eis zum Kühlen der Proben vorhanden war und die für die Operation verantwortlichen Anästhesisten und Anästhesistinnen informiert waren. Nur selten gab es ausreichend lange Operationen, in denen die PatientInnen den Einschlusskriterien entsprochen hätten und zudem ihr schriftliches Einverständnis gegeben hätten. Obwohl Victoria Lirscher und ich mit der Durchführung beschäftigt waren, mussten wir nach vielen Versuchen und sehr viel investierter Zeit feststellen, dass es in der uns zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich sein würde, die Proben in zahlenmäßig ausreichender Form zu erhalten.

Um trotzdem unsere Fragestellungen zu untersuchen, wurden Proben verwendet, die eigentlich für eine andere Fragestellung in Sarajevo abgenommen wurden. Das eigentliche Ziel der durchgeführten Abnahmen in Sarajevo war es, zu untersuchen ob es Unterschiede in der Pharmakokinetik Cisatracuriums zwischen hämodilutierten und nicht hämodilutierten PatientInnen gab. Das bedeutet, dass der Effekt der Blutverdünnung, Hämodilution, durch intravenös applizierte Flüssigkeit während der Operation untersucht werden sollte. Dafür wurden eine akute, normovolämische Hämodilutionsgruppe (ANH) und eine Kontrollgruppe gebildet, die etwa gleichgroß waren und jeweils in etwa gleich viele Männer und Frauen enthielten. Bevor man geschlechtsspezifische Fragestellungen bearbeiten konnte war es notwendig zu klären, ob es Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gibt und ob die Hämodilution unter Umständen die verschiedenen Geschlechter

unterschiedlich stark beeinflusst. Erst als zweiten Schritt und vorausgesetzt dem Fall, dass sich keine Unterschiede oder Interaktionen finden ließen, könnten beide Gruppen gemeinsam hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede untersucht werden.
Nach dem Vorliegen eines positiven Votums der zuständigen Ethikkommission, wurden die Proben intraoperativ in dem Sarajevo Medical University Clinical Centre abgenommen.
Einschlusskriterien waren ein American Society for Aneasthesiology Status von I-II, ein Alter zwischen 20 und 60 Jahren und eine ausgefüllte schriftliche Einverständniserklärung. Von der Studie ausgeschlossen wurden PatientInnen mit bekannten neuromuskulären Erkrankungen, einer Arthritis der kleinen Gelenke und PatientInnen die Medikamente nahmen, die im Verdacht stehen die neuromuskuläre Transmission zu beeinflussen. Die beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien entsprechen den von Dahaba et al. in einer anderen Studie verwendeten Kriterien(23). Bei den Operationen handelte es sich um Eingriffe der abdominellen und gynäkologischen Chirurgie.

2.3 Anästhesie

Die Anästhesie wurde ebenfalls wie bei Dahaba et al. beschrieben durchgeführt(23). Die Einleitung der Narkose erfolgte mit 1,5$\mu g \cdot kg^{-1}$ Fentanyl und 2-3$mg \cdot kg^{-1}$ Propofol bis der Blinzelreflex erlosch. Die Beatmung erfolgte über eine ProSeal Larynxmaske und mit einer Beatmungsluftsauerstoffkonzentration von 40%, um eine endtidale Kohlenstoffdioxidkonzentration von 25-35mmHg zu erhalten. Die Erhaltung der Narkose wurde intravenös mit 100-150$\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min$ Propofol und 0,1-0,3 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ Remifentanil durchgeführt. Die PatientInnen wurden mit einer Wärmungsmatratze vor Unterkühlung geschützt. Cisatracurium, hergestellt von GlaxoSmithKline (Middlesex, UK), wurde in einer Dosierung von 0,1$mg \cdot kg^{-1}$ verabreicht und der neuromuskuläre Block wurde mit einem Relaxometer Mechanomyograph (Department of Anaesthesiology, University of Groningen, Groningen, Niederlande) am Musculus Adductor pollicis monitorisiert und die Zeit bis zum totalen muskulären Block aufgezeichnet. Die Erholung von der neuromuskulären Blockade erfolgte spontan und ohne den Einsatz von Medikamenten, die diesen Vorgang beschleunigen.
Die PatientInnen wurden wie allgemein in der Anästhesie üblich monitorisiert. Im Genauen wurde die Herzaktion mittels Elektrokardiographie, die Ventilation mittels Kapnographie, die Temperatur, der mittlere arterielle Blutdruck mittels nichtinvasiver arterieller Blutdruckmessung und die kapilläre Sauerstoffsättigung mittels Oxymetrie dargestellt und überwacht.

2.4 Probengewinnung

Die Proben wurden in Sarajevo nach dem in Graz erstellten Protokoll abgenommen. Anschließend wurden die Proben zur Analyse nach Graz gebracht. Im Detail lief die Gewinnung folgendermaßen ab:

1. Vorbereitung
   - Patientenrekrutierung und Aufklärung
   - Polystyrolbox gefüllt mit Crushed-Ice
   - beschriftete 1,5ml Eppendorf Röhrchen, die in Graz vorbereitet wurden und 40µl 0,5molare Schwefelsäure und 10µl internen Standard (Verapamil $100\mu g \cdot ml^{-1}$) enthalten
   - eine auf 4°C gekühlte Zentrifuge steht bereit
   - für die venöse Blutabnahme stehen mit EDTA gefüllte 4ml Röhrchen bereit
2. Probengewinnung
   - ein permanenter venöser Zugang wird vorbereitet
   - die Injektion des Cisatracuriums ist der Startpunkt für die Zeit und die daraus resultierenden Blutabnahmen
   - Blutabnahmen werden nach 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten durchgeführt
   - direkt nach jeder Blutabnahme in die EDTA Röhrchen, werden diese leicht auf und ab gedreht und danach sofort auf Eis gelegt
   - nach jeweils 15; 30; 60; 90 und 120 Minuten werden die gesammelten Proben, die mindestens fünf Minuten auf Eis gelagert wurden, für 10 Minuten mit 2500g in der 4°C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert
   - 950µl des durch Zentrifugieren gewonnenen EDTA-Plasmas werden in die vorbereiteten Eppendorf Röhrchen pipettiert und wiederum auf Eis gelagert
   - wurden alle Proben dementsprechend vorbereitet, werden diese so schnell wie möglich bei -70°C tiefgefroren
3. Lagerung und Transport
   - die Lagerung der Proben erfolgte bei -70°C
   - auf Trockeneis gelagert werden die Proben nach Graz transportiert und bis zur Analyse bei -70°C gelagert

2.5 Probenvorbereitung

Die in Sarajevo gewonnenen Proben, die 950µl Plasma, 40µl 0,5molare Schwefelsäure und 1000ng internen Standard Verapamil (10µl, 100µg/ml) enthielten, wurden bis zur Messung bei -70°C gelagert. Vor der Messung wurden sie aufgetaut und 500 µl abpipettiert und in einem neuen Eppendorf Röhrchen mit 1 ml Acetonitril gemischt, gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 2400g zentrifugiert. Vom entstandenen Überstand wurde 1 ml entnommen und bei 30°C mittels eines Stickstoffstroms in einer Abzugsanlage verdampft. Der übrigbleibende feste Rest wurde in 500 µl Laufmittel gelöst und 50 µl davon wurden in das HPLC-System eingespritzt und analysiert.

2.6 Standardreihe

Vor Beginn jeder Messreihe wurde eine Standardreihe mit bekannten Cisatracuriumkonzentrationen in aqua destillata erstellt. Es wurden Lösungen von 1ml Menge, die 2000, 1000, 500 und 100ng Cisatracurium und jeweils 1000ng internen Standard Verapamil (10µl, 100µg/ml) enthielten, hergestellt und mittels high performance liquid chromatography (HPLC) gemessen. Das Peakhöhenverhältnis von Cisatracurium zu Verapamil wurde genutzt, um mit Microsoft Excel eine Regressionsgerade der gemessenen Werte zu erstellen, bei der jedem Verhältnis eine bestimmte Konzentration zugeordnet werden kann.

2.7 In vitro Versuche

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden zudem in vitro Versuche mit Blutproben von acht freiwilligen Studienkollegen durchgeführt. Es handelte sich hierbei um 5 Frauen und 3 Männer. Nach vorher erklärtem Einverständnis wurde jedem/er Probanden/in circa 15ml Blut entnommen und 11,88ml davon mit 120µL Cisatracurium (100µg/mL) versetzt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Direkt nach Hinzufügen des Cisatracuriums, sowie nach 5, 10, 20, 33, 60, 90 und 120 min wurden jeweils 1300µl Blut entnommen, auf Eis gestellt und dann 5min bei 2500g und 4°C zentrifugiert. Vom entstandenen Überstand wurden 470µl entnommenen und in vorher vorbereitete Eppendorf Röhrchen, die 10µl internen Standard (Verapamil 50µg/ml) und 20µl 0,5M Schwefelsäure enthielten, gegeben. Von dieser Mischung wurden 400µl zu einem weiteren Eppendorf Röhrchen mit 800µl Acetonitril gegeben und weitere 5min bei 2500g und 4°C zentrifugiert. Vom entstandenen Überstand wurden 400µl entnommen und bei 30°C mittels eines Stickstoffluftstrom in einer Abzugsanlage verdampft. Der übrigbleibende feste Rest wurde in 1ml aqua destillata plus 40µl 0,5M schweflige Säure gelöst und 50 µl davon wurden in das HPLC-System

eingespritzt und analysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wiederum nach vorheriger Erstellung einer Standardreihe über eine in Microsoft Excel erstellte Standardgerade.
Die durchgeführten in vitro Versuche erfolgten vor allem mit dem Ziel die angewandte Methodik der HPLC kennenzulernen und außerdem die Arbeit im Labor, die exakte Dokumentation der durchgeführten Schritte und den Umgang mit biologischen Materialien zu üben. Des Weiteren sollte versucht werden die Ergebnisse mit den Ergebnissen der in vivo Studie zu vergleichen.

2.8 High performance liquid chromatography (HPLC)

2.8.1 Grundlagen der HPLC

Die HPLC habe ich während später beschriebener Versuche zum in vitro Abbau von Cisatracurium theoretisch kennengelernt und selbst angewendet. Im Allgemeinen zielen alle Methoden der Chromatographie darauf ab, Substanzgemische in einzelne Komponenten aufzutrennen, zu detektieren und wenn möglich zu quantifizieren. Allen Methoden gemein ist, dass sich das Substanzgemisch in einer mobilen Phase befindet, die mit einer ortsfesten, stationären Phase in Verbindung gebracht wird. Die einzelnen Substanzen interagieren unterschiedlich mit den beiden Phasen, die gegeneinander bewegt werden und werden so voneinander getrennt. So wird zum Beispiel ein polarer Stoff, der sich in einer unpolaren mobilen Phase befindet, die sich über eine polare stationären Phase bewegt, weniger weit bewegen als ein unpolarer Stoff und so von diesem getrennt werden. Eine Trennung von verschieden großen Molekülen oder verschiedenen Ionen ist ebenfalls möglich.

2.8.2 Anlage und Methode der HPLC

Die HPLC Analyse ist eine Weiterentwicklung der Säulenchromatographie, die den Vorteil hat, dass das Granulat, welches als stationäre Phase dient und in einer Säule vorliegt, sehr fein ist und auf diese Weise eine feinere und genauere Trennung möglich wird, als es in der normalen Säulenchromatographie der Fall ist(31). Farenc et al. haben 1999 eine Methode zur gleichzeitigen Detektion von Atracurium und dem Abbauprodukt Laudanosin beschrieben, die im Hinblick auf Präzision, Genauigkeit, Selektivität und Grenzen der Nachweisbarkeit überprüft und validiert wurde(32). Wir haben die Methode in modifizierter Form so wie von Faranc et al. beschrieben durchgeführt. Die Anlage wurde wie in Abbildung 5 ersichtlich betrieben. Die einzelnen Elemente sind numeriert: man sieht das Gefäß mit dem Laufmittel [1], die Pumpanlage [2], der Probengeber [3], die

Säule im dazugehörigen Wärmeschrank [4], den Fluoreszenzdetektor [5] und die Abwassersammlung [6].

Abbildung 5 verwendete HPLC Anlage

Genau bestand die Anlage aus der Pumpanlage ESA 582 solvent delivery system (Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz, Österreich), die die mobile Phase mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 400µl/min durch das System gepumpt hat. Der Probengeber Triathlon (Firma Spark) hat jeweils 50µl der zu analysierenden Proben automatisch in das System eingebracht. Die Säule war eine ACE-3 RP-18 Säule, die 150mm lang und 3mm breit war und mit Partikeln von 3µm Größe gefüllt war. Sie wurde während der Messungen auf 50°C erwärmt, um den Druck im System kleinstmöglich zu halten, weil es durch die kleine Granulatgröße wie bei der HPLC üblich zu hohen

Widerständen innerhalb des Systems kam, was zu einem hohen aufzubringenden Druck seitens des Pumpsystems führte(31).
In unserem Fall war eine isokratische Trennung der einzelnen Substanzen möglich, was bedeutet, dass die Trennung unter Verwendung eines einzigen Lösungsmittelgemisches möglich war. Bei der diesem Gemisch, der sogenannten mobilen Phase handelte es sich um eine Mischung von Acetonitril, Methanol und 0,04M KH_2PO_4 Puffer im Verhältnis 400:43:500(V/V/V), die auf einen pH=5,0 eingestellt wurde. Alle Reagenzien für das Laufmittel wurden von der Firma Roth bezogen. Das Lösungsmittel muss verschiedene Kriterien erfüllen um für die HPLC in Frage zu kommen. Es darf natürlich nicht mit den nachzuweisenden Substanzen reagieren und einen nicht zu geringen Siedepunkt haben. Es sollte zudem möglichst gering viskös sein, damit es rasch die Säule passieren kann und der Druck im System möglichst gering bleibt. Außerdem sollte es in dem Fluoreszenzdetektor nicht detektierbar sein. Es muss frei von Partikeln und Gasblasen sein, damit die Säule nicht verstopft und wird deshalb vor der Verwendung filtriert(33). Außerdem sollte die Toxizität möglichst gering sein. Für unsere Verwendung hat sich die beschriebene Mischung als am besten geeignet gezeigt. Im Vorfeld wurden auch Versuche unternommen, wie sich Veränderungen im Lösungsmittelverhältnis auswirken, was in erster Linie dadurch quantifiziert werden kann, wie gut die einzelnen Substanzen voneinander getrennt werden und wie sich die Kurvenform darstellt.
Die getrennten Stoffe mussten im weiteren Verlauf nachgewiesen werden, wofür in unserem Fall die Fluoreszenzspektroskopie verwendet wurde. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass Stoffe, die durch sichtbares oder ultraviolettes Licht energetisch angeregt wurden, diese Energie binnen sehr kurzer Zeit in einer anderen Wellenlänge wieder abgeben(31). Regt man also Stoffe in einer bestimmten Form an, so ist es möglich deren abgegebene Energie zu detektieren und damit deren Vorkommen nachzuweisen. Über die Intensität des Signals lässt sich zudem eine quantitative Analyse durchführen. In unserem Fall wurde der Hitachi F-1050 Detector verwendet, dessen Wellenlänge der Anregung auf 240nm und die gemessene emitierte Wellenlänge auf 320nm eingestellt wurde. Die Zuordnung der Peaks erfolgte dabei durch die Chromatographie der authentischen Standards. Aus diesem Grund wurde in vorausgehenden Experimenten mit jeweils nur einer Substanz festgestellt, nach welcher Zeit nach der Einspritzung die jeweilige Substanz zu erwarten ist.
Der Detektor gibt die gemessene Fluoreszenz in Form einer Spannung ab, die computergestützt mit der speziellen EZ Chrom Elite Software (VWR, Vienna, Austria)

aufgezeichnet und graphisch dargestellt wurde. Ein typisches Ergebnis ist in Abbildung 6 zu sehen. In diesem Fall wurde eine Probe bekannter Cisatracuriumkonzentration (2000ng·ml^{-1}) analysiert. Die gemessene Spannung des Signals, in Volt, wurde auf der Y-Achse, und die Zeit wurde auf der X-Achse graphisch dargestellt. Man erkennt zunächst nach drei bis fünf Minuten, die in Plasma typischerweise gemessenen Kurven, die auf verschiedenste im Plasma physiologisch vorkommenden Substanzen hindeuten und in unseren Messungen zu vernachlässigen waren. Klar von diesen getrennt folgt nach circa 7½ Minuten der Peak, der dem Cisatracurium entspricht und bereits vom Computer als solches erkannt und mit Atracurium beschriftet wurde. Nach etwas mehr als 13 Minuten folgt dann die Kurve, die dem internen Standard Verapamil entspricht und mit IS automatisiert beschriftet wurde. Die Quantifizierung wurde über das Peakhöhenverhältnis von Cisatracurium und Verapamil durchgeführt und wird im Folgenden bei den Konzentrationsberechnungen genauer beschrieben werden.

Zusammengefasst stellte die HPLC uns eine zuverlässige und ausreichend validierte Methode dar, die nach der sorgfältigen Probenvorbereitung innerhalb von etwa 15 Minuten eine Probe analysiert hat und damit in der Lage war, relativ rasch eine Substanzquantifizierung durchzuführen.

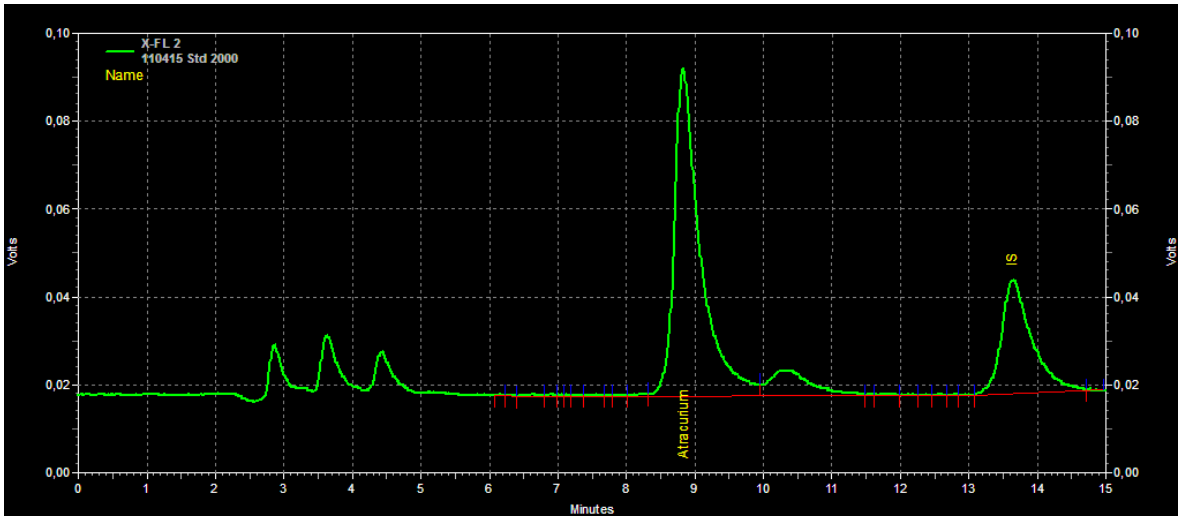

Abbildung 6 Typisches Chromatogram einer HPLC Messung mit bekannter Cisatracuriumkonzentration (2000ng/ml)

2.9 Konzentrationsbestimmung

Die Berechnungen zur Konzentrationsbestimmung wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Für quantitative Konzentrationsangaben wurde eine externe Standardkurve aus dem Peakhöhenverhältnis der Chromatogramme bekannter Cisatracuriumkonzentrationen und dem internen Standard Verapamil in wässeriger Lösung verwendet. So mussten zu Beginn eines jeden Labortages Lösungen von Cisatracurium in

den Konzentrationen 2000, 1000, 500 und 100 ng/ml und jeweils 10µl vom internen Standard Verapamil ($100 \mu g \cdot ml^{-1}$) in aqua destillata vorbereitet werden und mittels HPLC analysiert werden. So haben wir Chromatogramme erhalten, von denen wir wussten, welche Konzentration einem bestimmten Peakhöhenverhältnis entspricht. Als nächstes wurde mittels Microsoft Excel , nach Durchmessen der wässerigen Standardreihe, das Verhältnis der Höhe der Kurve des Cisatracuriums und des Internen Standards berechnet. Anschließend wurde es in ein Diagramm, welches die Konzentration des Cisatracuriums auf der Y Achse und dem dementsprechenden Verhältnis der beiden Kurvenhöhen auf der X Achse enthielt, eingetragen. Dieses ist in Abbildung 7 ersichtlich. Im Programm Excel wurde dazu die Ausgleichsgerade berechnet und sowohl die Gleichung dieser Geraden als auch das Bestimmtheitsmaß r^2 angezeigt. In der Gleichung $y(x)=k \cdot x+d$ stellt k die Steigung der Geraden und d den Punkt wo sie die y Achse schneidet, dar. Mit dieser Gleichung weist man jedem y Wert, was in unserem Fall das Peakhöhenverhältnis ist, einen definitiven Wert auf der X Achse zu, was hier die Konzentration ist. Diese Gerade wird auch als Trendlinie oder lineare Regression bezeichnet, die den gemessenen Werten, in unserem Fall das Peakhöhenverhältnis zur Konzentration, möglichst genau entspricht. Der Bereich der Standardgeraden sollte in dem Bereich der zu erwartenden unbekannten Konzentrationen liegen und sehr kleine und sehr große bekannte Konzentrationen enthalten, weil man so sicherstellt, dass alle zu erwartenden Konzentrationen zuverlässig und genau berechnet werden können.

Nun könnte man die Rolle des Internen Standards hinterfragen, weil man ja auch annehmen könnte, dass die Kurvenhöhe des Cisatracuriums ausreichen würde die Konzentration zu berechnen. Der interne Standard sorgt allerdings dafür, dass Verluste während eventueller aufwendiger Probenvorbereitungen nicht ins Gewicht fallen. Denn wenn sowohl Verluste der zu analysierenden Substanz und des internen Standards auftreten, bleibt das Peakhöhenverhältnis gleich. Der interne Standard sollte deshalb möglichst früh zur Probe hinzugefügt werden, er sollte zudem in einem ähnlichen Konzentrationsbereich vorliegen und ein ähnliches Verhalten in der Analytik besitzen. Außerdem sollte der Peak im Chromatogram klar von der der Substanz getrennt sein und die Kurvenform ähnlich sein.

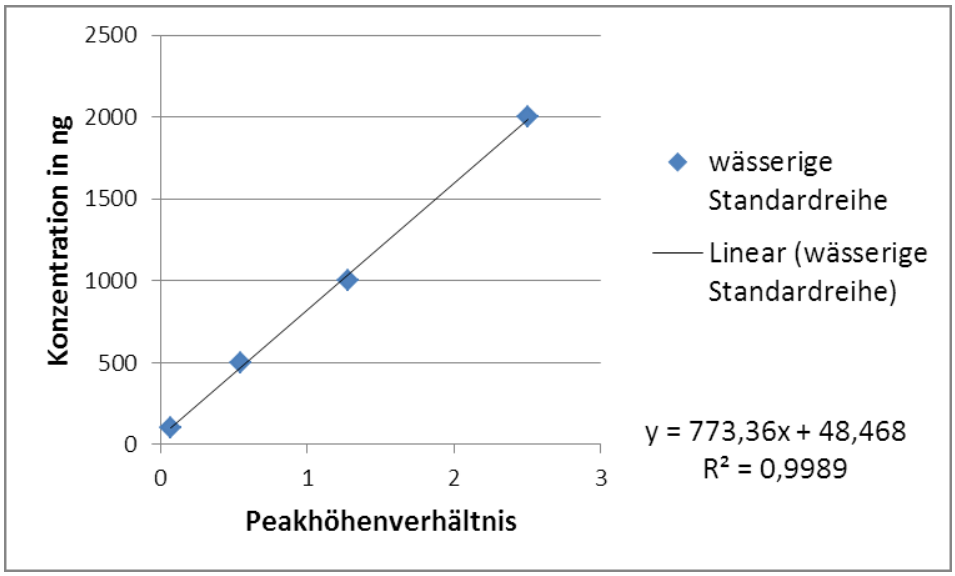

Abbildung 7 Beispiel einer Standardgeraden zur Berechnung unbekannter Konzentrationen

2.10 Beschreibung der Pharmakokinetik

Die Berechnungen zur Beschreibung der Pharmakokinetik wurden mit Scientist 3.0 (MicroMath Scientific Software Inc.) durchgeführt. Scientist ist ein sehr leistungsfähiges Programm zur Modellerstellung, Datenanalyse und für Ausgleichsrechnungen. Es ist auch dort in der Lage Daten in verschiedenste Arten von Modelle zu passen, wo es für andere Programme schwierig, beziehungsweise unmöglich ist. Die Modelle können aus nicht linearen algebraischen Gleichungen, Differentialgleichungen, Laplace-Transformationen, impliziten Funktionen, multivariaten Gleichungen und aus Kombinationen eben genannter bestehen. Es ist dabei möglich mit Scientist zu arbeiten ohne Programmierkenntnisse zu haben(34).

Im Gegensatz zu einfachen Fällen, wie bei der für die Standardreihe zuvor beschriebenen Erstellung der linearen Regression und der dazugehörigen analytischen Gleichung, ist es in pharmakokinetischen Modellen häufig nicht, oder nur sehr schwer möglich, die Differentialgleichung in eine analytisch zu integrieren. Das Besondere an Scientist ist, dass das Programm diesen Schritt umgeht und die Regressionskurve auf Basis der Differentialgleichung numerisch integriert. Es ist damit in der Lage eine Kurve zu erstellen, die den gemessenen Werten und dem pharmakokinetischen Modell bestmöglich gerecht wird, ohne eine analytische Gleichung der Kurve zu berechnen oder zu benötigen. Auf diese Weise wird wiederum jedem X-Wert ein Wert auf der Y Achse zugeordnet, ohne jedoch die Gleichung zur Berechnung zu besitzen.

Die Berechnungen wurden in der Annahme eines Zwei-Kompartiment-Modells durchgeführt, dass in Abbildung 8 graphisch dargestellt wurde. Man geht davon aus, dass das Medikament in das zentrale Kompartiment (V_1) appliziert wird und auch nur von dort

eliminiert (k_{01}) wird. Außerdem findet ein Austausch in das (k_{12}) und aus (k_{21}) dem peripheren Kompartiment (V_2) statt.
Die Grundlage der pharmakokinetischen Modellerstellung bildete numerische Integration der Differentialgleichung

$$d_{c1}/d_t = F(t) - k_{12} \cdot c_1 + k_{21} \cdot c_2 - k_{01} \cdot c_1.$$

Hierbei wird die Konzentration im zentralen Kompartiment (c_1) über der Zeit (t) durch die applizierte Dosis (F(t)), von der die Verschiebung in das periphere Kompartiment ($k_{12}*c_1$) sowie die Elimination ($k_{01}*c_1$) subtrahiert werden und die Verschiebung aus dem peripheren Kompartiment ($k_{21}*c_2$) addiert wird, berechnet. Ohne sich näher mit dem integrieren von Gleichungen zu beschäftigen, ist es vorstellbar, dass diese Gleichung sehr schwer zu lösen wäre. Scientist berechnet deshalb k_{01}, k_{21}, k_{12}, V_1 direkt über die gemessenen Werte der Probe. Außerdem liefert das Programm Konfidenzintervalle, die, wenn sie vertrauenswürdig sein sollen, verständlicherweise nicht die 0 einschließen sollten. Eine weitere Stärke des Programms ist, dass es alle Werte der Messungen zur Erstellung der Kurve nutzt. Abbildung 9 zeigt beispielhaft eine Kurve eines Probanden, die mit Scientist erstellt wurde. Ausgehend von diesen Parametern war es möglich, weitere in Tabelle 1 angeführte typische Parameter der Pharmakokinetik mit Microsoft Excel mit beschriebenen Formeln zu berechnen. Hierzu gehörten unter anderem die Halbwertszeiten, das Volumen von V_2 und die Clearance. Unterschieden wird dabei häufig zwischen den Werten in der Verteilungsphase, also der Zeit nach der Applikation des Medikaments und dessen Verteilung im Körper, und denen in der Eliminationsphase, also die Phase in der das Medikament abgebaut wird. A und B, sowie α und β sind dabei als beschreibende Konstanten der Kurve zu verstehen, die als Grundlage der Berechnung der Halbwertszeiten und der AUC dienen.
Zusammengefasst hat man über die berechneten Konstanten k_{01}, k_{21}, k_{12} und dem Volumen V_1 alle relevanten Parameter erhalten, um die Pharmakokinetik von Cisatracurium zu beschreiben und um genderspezifische Unterschiede in weiteren Schritten nachzuweisen. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass es sich dabei um Werte handelt, die berechnet wurden, um das pharmakokinetische Modell von Cisatracurium bestmöglich zu beschreiben und die von Medikament zu Medikament variieren würden. So ist zum Beispiel das Distributionsvolumen keine reale Größe, sondern von den Eigenschaften des applizierten Medikaments entscheidend abhängig.

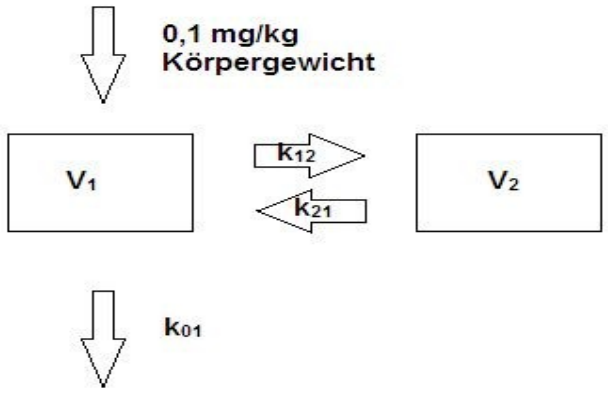

Abbildung 8 Verwendetes 2-Kompartiment-Modell

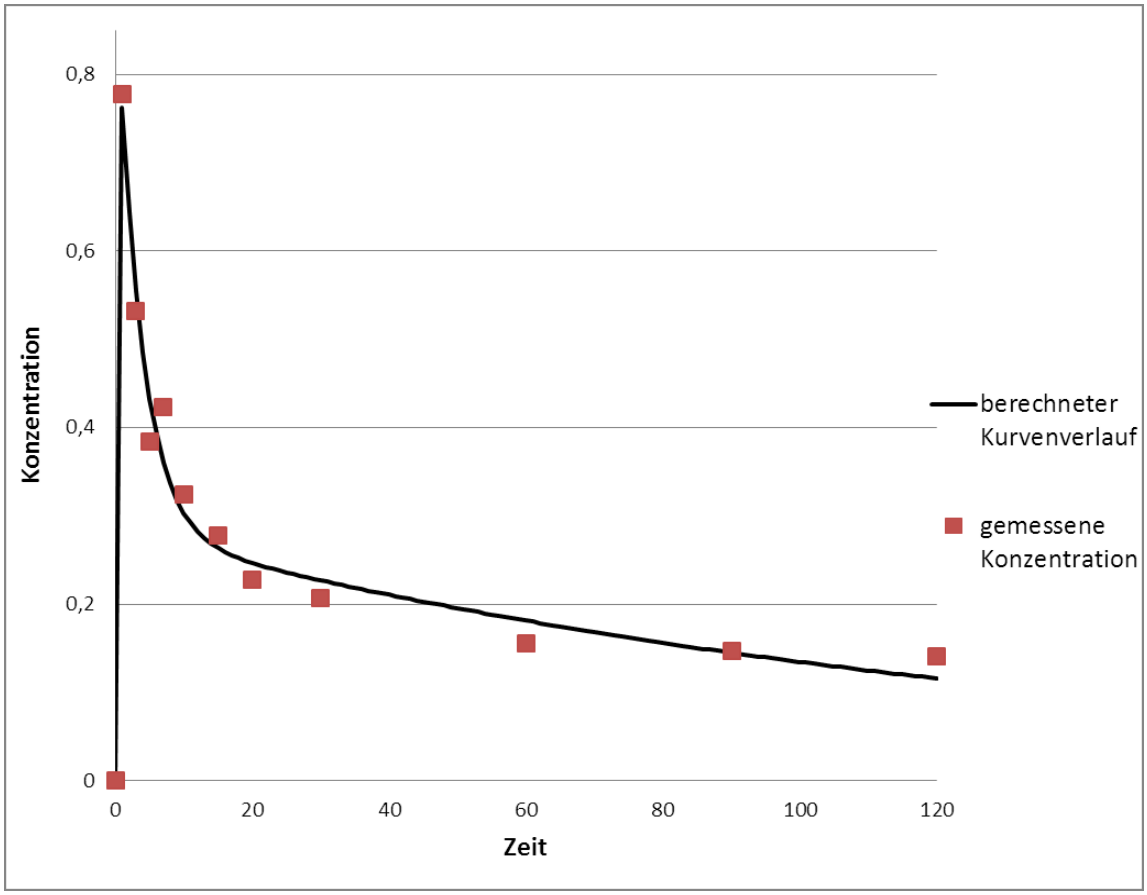

Abbildung 9 mittels Scientist erstellte Kurve, basierend auf den gemessenen Cisatracurium Konzentrationen

Parameter	zugrundeliegende Formel
Dosis	0,1·Körpergewicht
zentrale Clearance	$k_{01} \cdot V_1$
V_{dss} (Distributionsvolumen im steady state)	V_1+V_2
periphere Clearance	$k_{12} \cdot V_2$
α (Geschwindigkeitskonstante in der Verteilungsphase)	$0{,}5 \cdot \left[(k_{21} + k_{12} + k_{01}) + \sqrt{k_{21} + k_{12} + k_{01}{}^{2-4 \cdot k_{21} \cdot k_{01}}}\right]$
β (Geschwindigkeitskonstante in der Eliminationsphase)	$0{,}5 \cdot \left[(k_{21} + k_{12} + k_{01}) - \sqrt{k_{21} + k_{12} + k_{01}{}^{2-4 \cdot k_{21} \cdot k_{01}}}\right]$
A (Ordinatenabschnitt der Geraden für die α Phase)	$Dosis \cdot \frac{\alpha - k_{12}}{V_1 \cdot (\alpha - \beta)}$
B (Ordinatenabschnitt der Geraden für die ß Phase)	$Dosis \cdot \frac{k_{12} - \beta}{V_1 \cdot (\alpha - \beta)}$
$t_{1/2}$ α (Halbwertszeit in der Verteilungsphase)	$\frac{\ln(2)}{\alpha}$
$t_{1/2}$ ß (Halbwertszeit in der Eliminationsphase)	$\frac{\ln(2)}{ß}$
MRT (mittlere Verweildauer im Organismus)	$t_{1/2}$ ß · 0,63
Clearance	$zentrale\ Clearance + \left(\frac{periphere\ Clearance}{10}\right)$
AUC	$\left(\frac{A}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{B}{ß}\right)$

Tabelle 1Formeln zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter (Quelle: (35))

2.11 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen basierten auf drei Methoden: Varianzanalyse, Student t-Test und Korrelationsanalysen.

2.11.1 Student t-Test

T-Tests im Allgemeinen prüfen, ob Prüfgrößen einer t-Verteilung folgen. Diese ist Grundlage vieler statistischer Tests und ist definiert als Quotient aus Mittelwert und Standardabweichung unabhängig identisch verteilter Zufallsgrößen. Sie ähnelt der Normalverteilung, hat jedoch schwerere Flanken, in denen sich die Unsicherheit der Populationsstreuung darstellt, die umso größer ist, je kleiner der Stichprobenumfang ist(10). Der Student t-Test im Speziellen wurde von uns überall dort verwendet, wo zwei Mittelwerte miteinander verglichen werden sollten. Der klassische Student t-Test eignet sich dabei zum Lagevergleich zweier unabhängiger Stichproben, die an verschiedenen Personen beziehungsweise Objekten erhoben wurden, und prüft ob diese einer t-Verteilung

folgt. Will man also Proben auf t Verteilung prüfen, sind Mittelwert, Standardabweichung und der Stichprobenumfang notwendig.
Um festzustellen, ob sich die Mittelwerte signifikant unterscheiden, berechnet man das Signifikanzniveau p, dass sich aus dem berechneten t Wert, den Freiheitsgeraden (=Anzahl der ersten Stichprobe-Anzahl der zweiten Stichprobe -2) und den Seiten, in unseren Berechnungen zweiseitig, zusammensetzt. Das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert<0,05 festgelegt.
Der Student t-Test wurde in dieser Arbeit unter anderem zum einfachen Vergleich der pharmakokinetischen Parameter zwischen Männern und Frauen verwendet.

2.11.2 Varianzanalyse

Varianzanalysen waren dort notwendig, wo ein einfacher Vergleich der Mittelwerte nicht mehr ausreichte. Hierfür wurde STATA 11 verwendet. STATA 11 ist ein komplexes Programm für die Anwendung verschiedenster Arten von statistischen Modellen. Es inkludiert dabei die Datenverwaltung, statistische Analyse, graphische Darstellung, Simulation und die Programmierbarkeit durch den Benutzer(36). Die Varianzanalyse wurde vor allem dahingehend verwendet, um festzustellen, ob die Hämodilution einen unterschiedlichen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Frauen und Männern hat.
Ob also die einzelnen Gruppen, also hämodilutiert oder nicht hämodilutiert, und Mann oder Frau gegenseitig interagieren. Dieser Schritt sollte überprüfen ob es zulässig sei, unter außer Achtlassung der Hämodilution, Männer und Frauen miteinander zu vergleichen, also ob man die hämodilutierte und die Kontrollgruppe ohne Probleme zusammennehmen und auf genderspezifische Unterschiede hin untersuchen kann.

2.11.3 Korrelationsanalyse

Um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen zwei Parametern besteht, wurde wiederum Microsoft Excel verwendet. Hierfür wurden die zwei Parameter gegeneinander in einem Diagramm aufgetragen und eine Regressionsgerade, wie auch bei der Standardgerade, erstellt. Um einen linearen Zusammenhang dieser Werte festzustellen, wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 der Gerade angegeben. Einfach gesagt, setzt es die Abweichung der einzelnen Punkte von deren Mittelwert in Verhältnis zur Abweichung der einzelnen Punkte, zu deren theoretisch berechneten Werten beziehungsweise zur Trendlinie. Besteht ein hoher linearer Zusammenhang zwischen den realen Werten und der Trendlinie nähert sich $r^2=1$, besteht keiner nähert sich $r^2=0$(37).

Um festzustellen, ob die Korrelation signifikant ist, wurde das Signifikanzniveau p über den Pearson-Test berechnet und wiederum mit $p<0,05$ festgelegt.
Mit den Korrelationsanalysen wurde unter anderem untersucht, ob zwischen dem Gewicht der ProbandInnen und der Clearance von Cisatracurium ein Zusammenhang besteht.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 PatientInnen

Analysiert wurden Proben von 39 PatientInnen, 20 Frauen und 19 Männer mit den in Tabelle 2 zusammengefassten Eigenschaften Alter, Gewicht, Größe und Bodymaßindex (BMI). Signifikante Unterschiede lassen sich bezüglich Gewicht und Größe, nicht aber bei Alter und BMI finden. Das jeweilige Geschlechterverhältnis in der Hämodilutionsgruppe und in der Kontrollgruppe war ausgeglichen.

Bei einigen Parametern zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Hämodilutions- und der Kontrollgruppe. In diesen Fällen war es notwendig, nur die Werte der PatientInnen aus der Kontrollgruppe, also der nicht hämodilutierten Gruppe, zu verwenden. Diese Fälle sind gekennzeichnet und die ProbandInnenanzahl entsprechend etwa halb so groß, wobei das Geschlechterverhältnis immer noch ausgeglichen ist, und die Eigenschaften denen in Tabelle 2 angeführten entsprechen.

Eigenschaften	Frauen(n=20)	Männer (n=19)	p-Wert
Alter [y]	39,7(10,5)	41,8(11,1)	0,54
Gewicht [kg]	67,7(10,7)	82 (10,9)	p<0,01
Größe [cm]	166,8 (8,4)	180,9(5,9)	p<0,01
BMI [kg/m²]	24,4(3,7)	25(2,8)	0,54

Tabelle 2 PatientInneneigenschaften: Mittelwerte (SD)

3.2 Gemessene Konzentration

Tabelle 3 sowie Abbildung 10 geben die Konzentrationsmittelwerte der Proben numerisch und graphisch wieder. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten fanden sich in den nach 7 Minuten abgenommenen Proben. Die ebenfalls angegebene Standardabweichung (SD) nimmt von ±370 mit zunehmender Zeit bis auf ±20 ab.

Zeitpunkt der Abnahme [min]	Frauen (n=10)	Männer (n=10)	p-Wert
1	1355(324)	1498(340)	0,38
3	779(100)	857(157)	0,20
5	634(69)	697(88)	0,10
7	547(53)	605(63)	0,04
10	468(54)	512(54)	0,09
15	407(72)	421(40)	0,60
20	338(52)	374(28)	0,07
30	276(43)	298(20)	0,15
60	200(32)	207(15)	0,55
90	173(27)	182(13)	0,35
120	160(24)	168(18)	0,42

Tabelle 3 Gemessene Konzentrationen in $ng \cdot ml^{-1}$; Mittelwerte (SD)

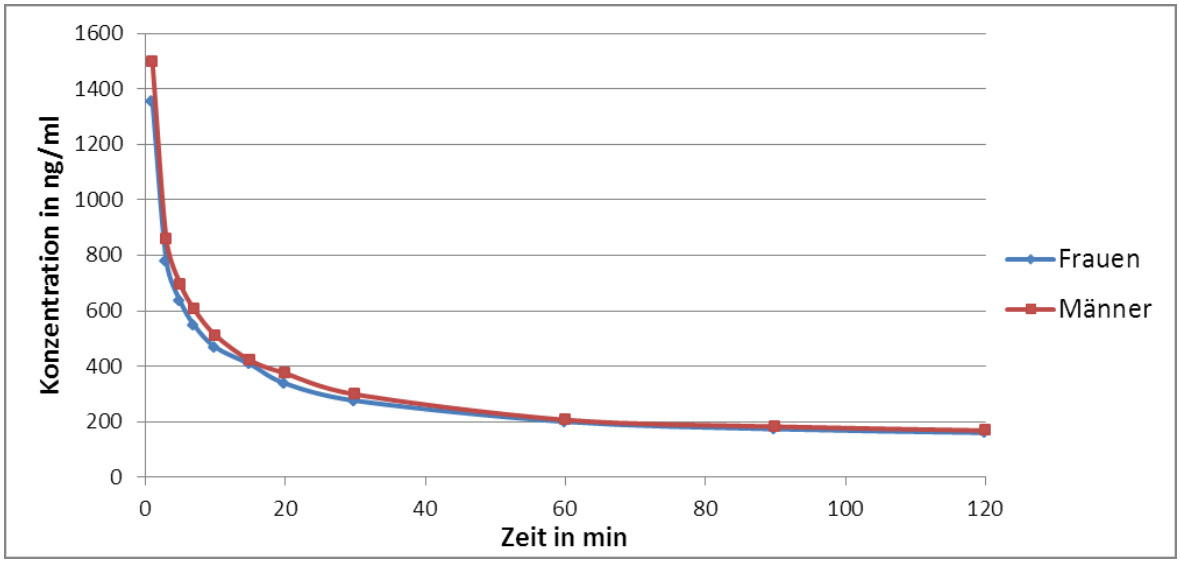

Abbildung 10 Abbau von Cisatracurium bei Männern und Frauen im Vergleich

3.3 Pharmakokinetische Parameter

In Tabelle 4 sind die pharmakokinetischen Parameter zusammengefasst. Die Grundlage bilden die mittels Scientist berechneten Konstanten k_{01}, k_{21}, k_{12}, sowie das Volumen des zentralen Kompartiments V_1. Alle weiteren Werte wurden mittels in Tabelle 1 zusammengefassten Formeln berechnet. Zahlreiche Parameter wurden durch die Hämodilution signifikant verändert, weshalb nur die Werte der Kontrollgruppe in den geschlechtsspezifischen Vergleich aufgenommen wurden. Signifikante Unterschiede ($p<0,05$) ließen sich bei keinem der angegebenen Parameter finden.

Pharmakokinetische Parameter	Frauen	Männer	p-Wert
k_{01} [min^{-1}]	0,04(0,04)	0,04(0,02)	0,60
k_{12} [min^{-1}]	0,25(0,19)	0,24(0,13)	0,79
k_{21} [min^{-1}]	0,11(0,04)	0,11(0,04)	0,78
V_1[l]*	4,3(2,0)	5,4(2,3)	0,29
V_1/kg [$ml \cdot kg^{-1}$]*	61(24)	63(23)	0,82
V_2 [l]*	9,1(2,3)	10,4(1,9)	0,21
V_2 /kg [$ml \cdot kg^{-1}$]*	131,6(23)	126,4(18)	0,58
V_{dss} [l]*	13,5(4)	15,7(3,7)	0,20
V_{dss} /kg [$ml \cdot kg^{-1}$]*	193(41)	190(31)	0,87
Clearance [$l \cdot min^{-1}$]	0,26(0,10)	0,30(0,07)	0,24
Clearance /kg [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]	3,9(1,2)	3,7(0,8)	0,60
Zentrale Clearance [$l \cdot min^{-1}$]	0,16(0,07)	0,18(0,02)	0,24
Zentrale Clearance/kg [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]	2,3(0,8)	2,2(0,4)	0,55
Periphere Clearance [$l \cdot min^{-1}$]*	0,9(0,2)	1,0(0,4)	0,59
Periphere Clearance/kg [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]*	13,5(2,9)	12,5(5,5)	0,64
$t_{1/2}$ α (min)*	2,1(1,0)	3,0(2,0)	0,23
$t_{1/2}$ β (min)*	64,9 (20)	63(27)	0,86
α [min^{-1}]*	0,43(0,27)	0,33(0,19)	0,35
β [min^{-1}]*	0,012(0,005)	0,013(0,006)	0,64
A [$\mu g\ l^{-1}$]*	4,5(3)	3,7(1,9)	0,48
B [$\mu g\ l^{-1}$]*	1,4 (0,2)	1,6(0,9)	0,36
AUC [$\mu g \cdot min^{-1} \cdot l^{-1}$]*	132(27)	139(28)	0,58
MRT (min)*	41(13)	40(17)	0,86

Tabelle 4 Vergleich pharmakokinetischer Parameter; mit * gekennzeichnete Werte beziehen sich nur auf die Kontrollgruppe bestehend aus jeweils 10 Männern und Frauen

3.4 Korrelation Clearance und Gewicht

Bei beiden Geschlechtern gemeinsam soll der Einfluss des Übergewichts auf die Clearance/kg untersucht werden. Weil die Clearance/kg Körpergewicht keine signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen zeigt, wurde davon ausgegangen, dass es möglich sei, Frauen und Männer als eine Gruppe zu betrachten. In den Abbildungen 11 und 12 wurden die Clearance/kg graphisch gegen das Körpergewicht und den BMI

aufgetragen und überprüft, ob ein signifikanter linearer Zusammenhang besteht. Die Bestimmtheitsmaße und die p-Werte sind in den Abbildungen angegeben und schließen einen signifikanten Zusammenhang aus. Weiters wurden die PatientInnen auf Grundlage der Annahme, dass ein BMI, der größer als 25 [$kg \cdot m^{-2}$] ist, bei Menschen im mittleren Lebensalter bedeutet, dass sie übergewichtig sind, in zwei Gruppen unterteilt: eine Gruppe mit allen PatientInnen mit einem BMI ≤ 25 und eine mit allen PatientInnen mit einem BMI > 25, und deren gemittelten Clearance/kg Körpergewichtswerte verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Zwar unterscheiden sich die BMI Werte in beiden Gruppen signifikant (p<0,0001), wohingegen sich die Clearance/kg Mittelwerte nicht signifikant (p>0,4) unterscheiden und nur geringfügig in der Gruppe mit BMI Werten größer als 25 abnehmen.

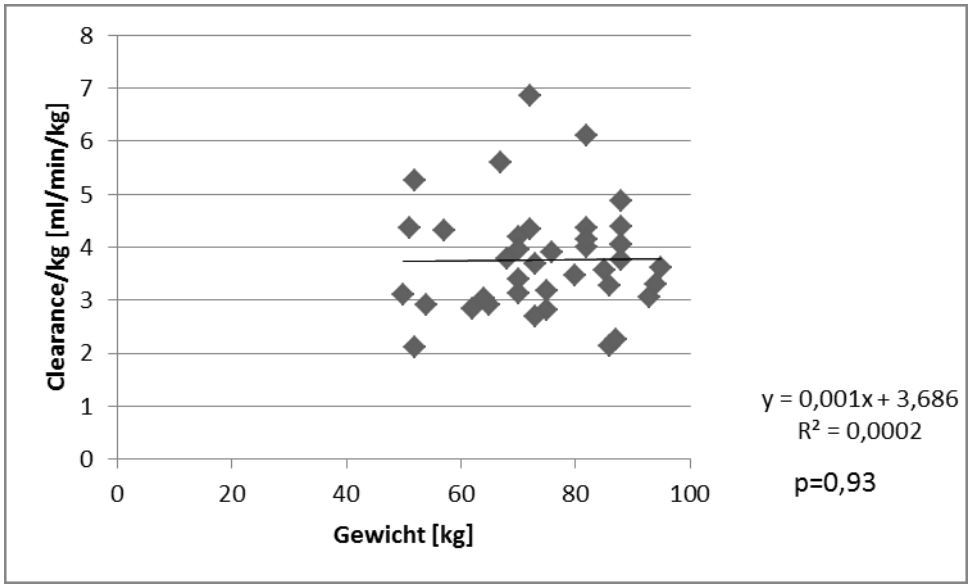

Abbildung 11 Korrelation Clearance/kg und Körpergewicht

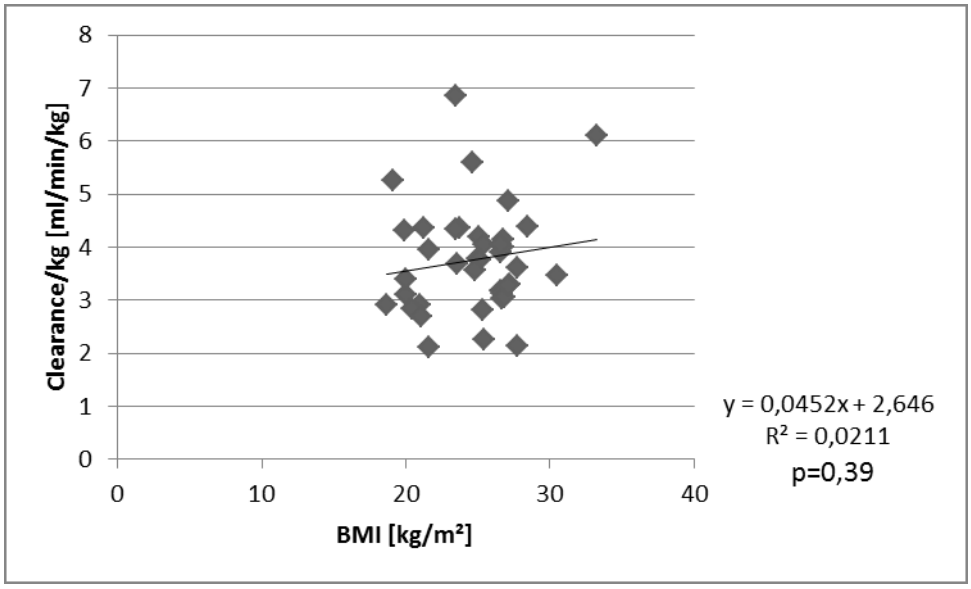

Abbildung 12 Korrelation Clearance/kg und BMI

	BMI<25 (n=18)	BMI>25 (n=21)	p
BMI[kg·m^{-2}]	21,9(2,0)	27,1(1,9)	0,0001
Clearance/kg KG (SD)[ml·kg^{-1}·min^{-1}]	3,9(1,2)	3,7(0,9)	0,48

Tabelle 5 Vergleich der Mittelwerte der Clearance/kg bei Normal- (BMI<25) und Übergewichtigen (BMI>25)

3.5 Einfluss des Alters auf die Clearance

Ebenfalls mittels Korrelationsanalyse wurde der Einfluss des Alters auf die Clearance/kg der 39 PatientInnen untersucht. Auch hier konnte kein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Der p- Wert, der mittels Pearson Test berechnet wurde ist in der Abbildung angegeben.

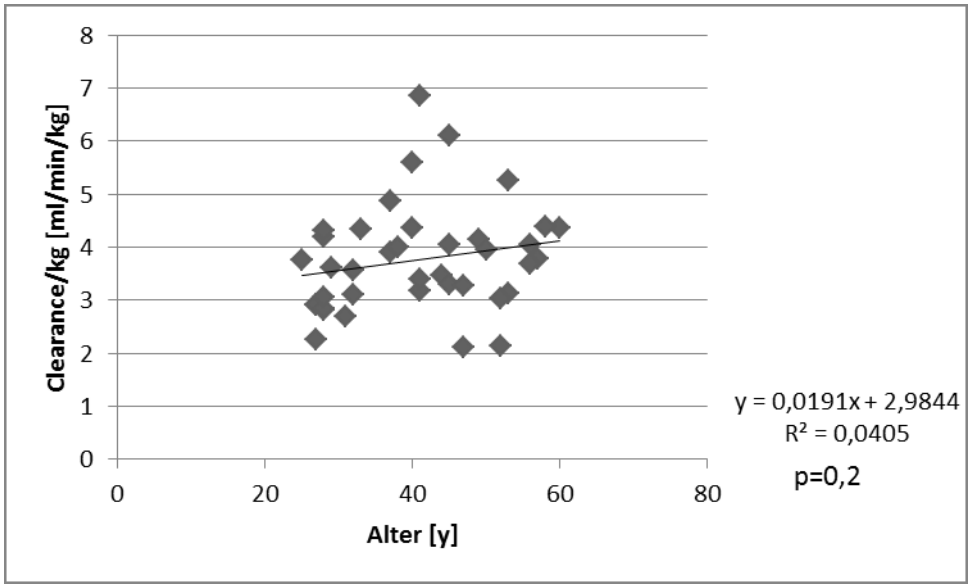

Abbildung 13 Korrelation zwischen der Clearance/kg und dem Alter

3.6 Korrelation zwischen Alter, Größe, Gewicht und V_1 oder V_2

Im weiteren Verlauf wurde geprüft ob Größe, Alter, Gewicht Einfluss auf die Größe des zentralen Kompartiments V_1/kg beziehungsweise auf das periphere Kompartiment V_2/kg haben. Dies geschah wiederum mittels Korrelationsanalysen unter den 20 PatientInnen der Kontrollgruppe. Die mit dem Pearson Test berechneten p-Werte sind in den Abbildungen angegeben und zeigten in keinem der Fälle signifikante Korrelationen.

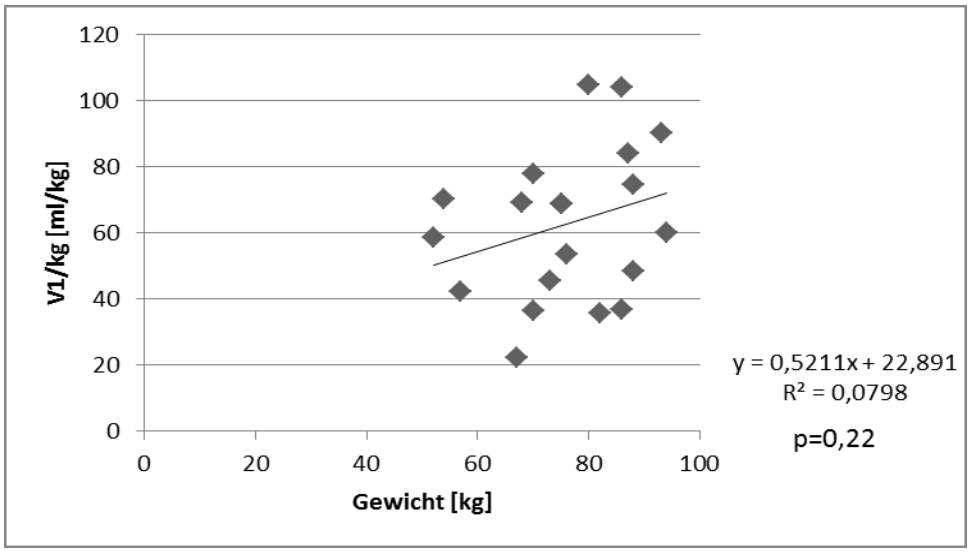

Abbildung 14 Korrelation zwischen V_1 und dem Gewicht

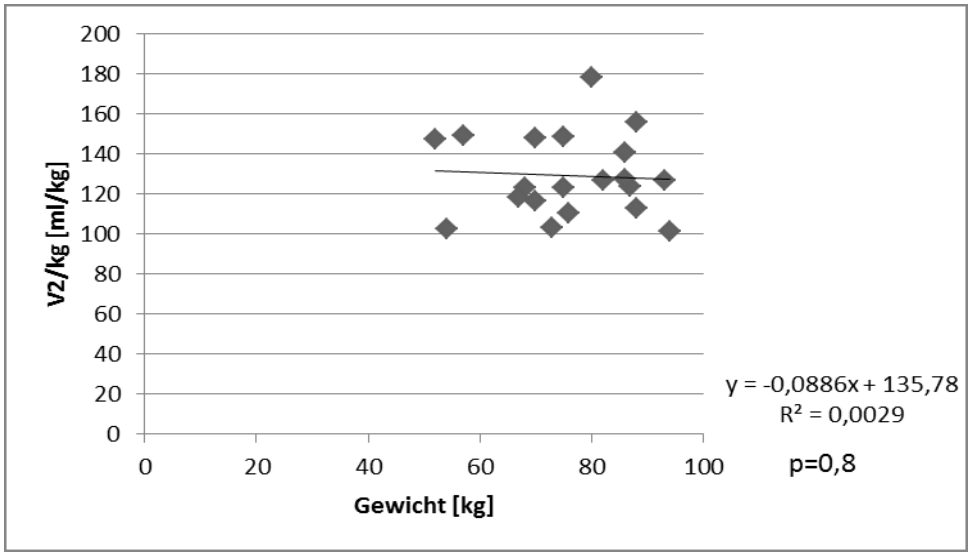

Abbildung 15 Korrelation zwischen V_2 und dem Gewicht

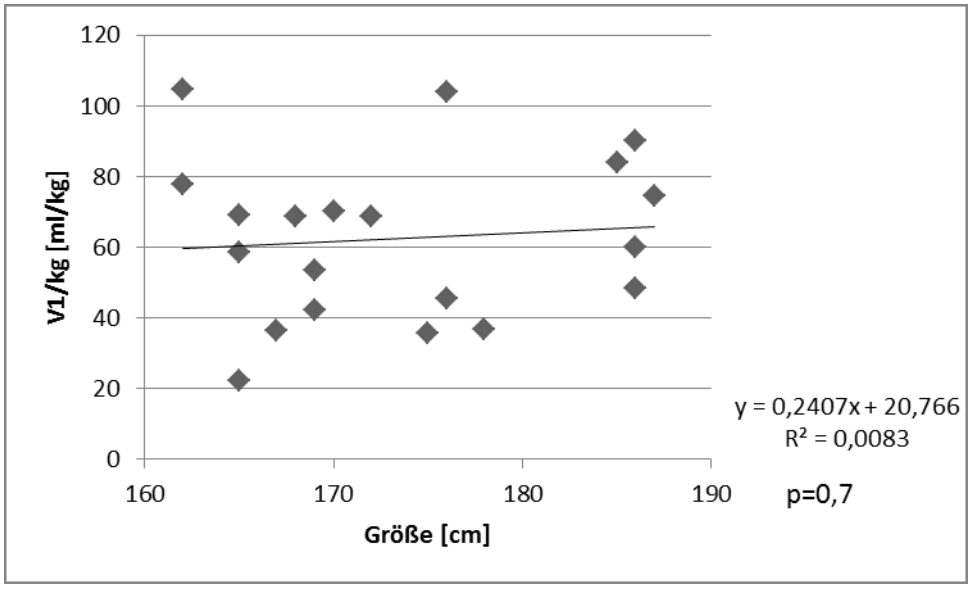

Abbildung 16 Korrelation zwischen V_1 und der Größe

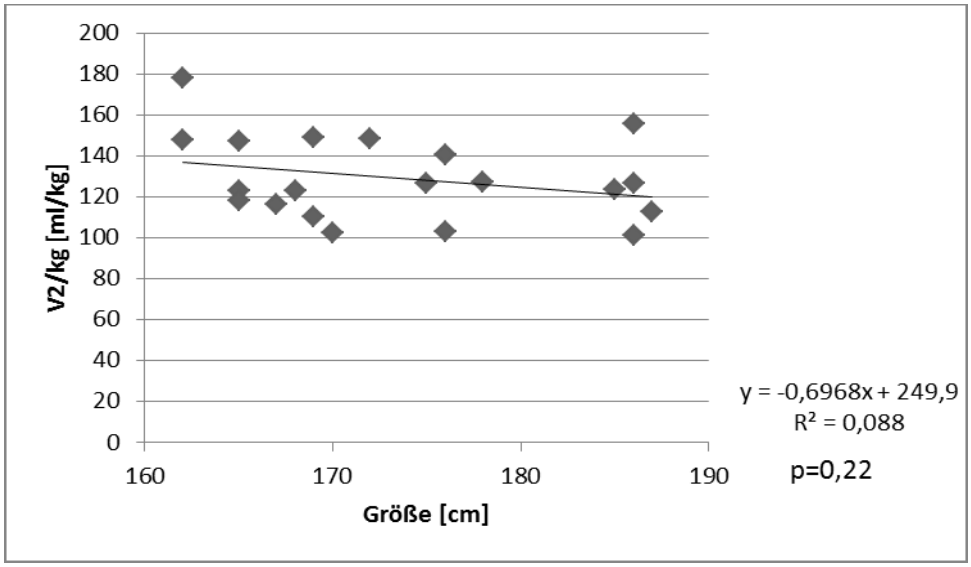

Abbildung 17 Korrelation zwischen V_2 und der Größe

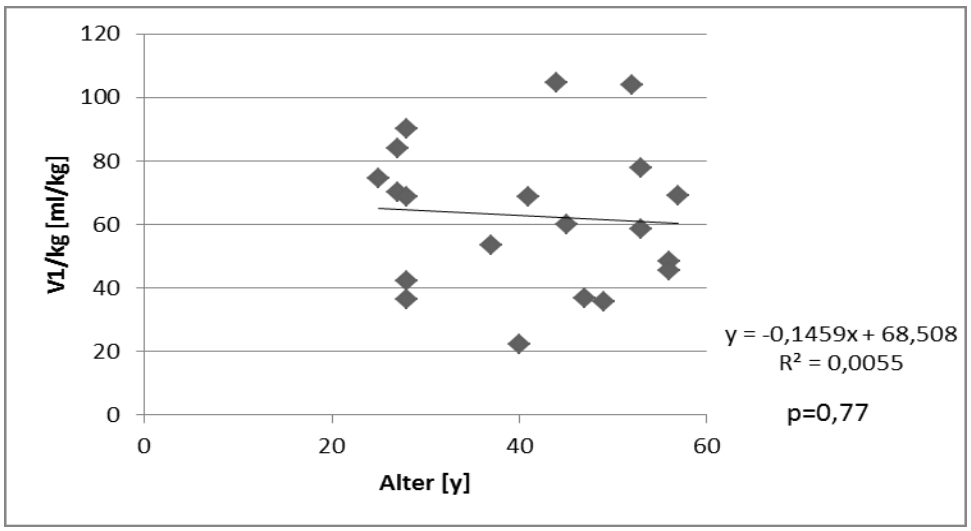

Abbildung 18 Korrelation zwischen V_1 und dem Alter

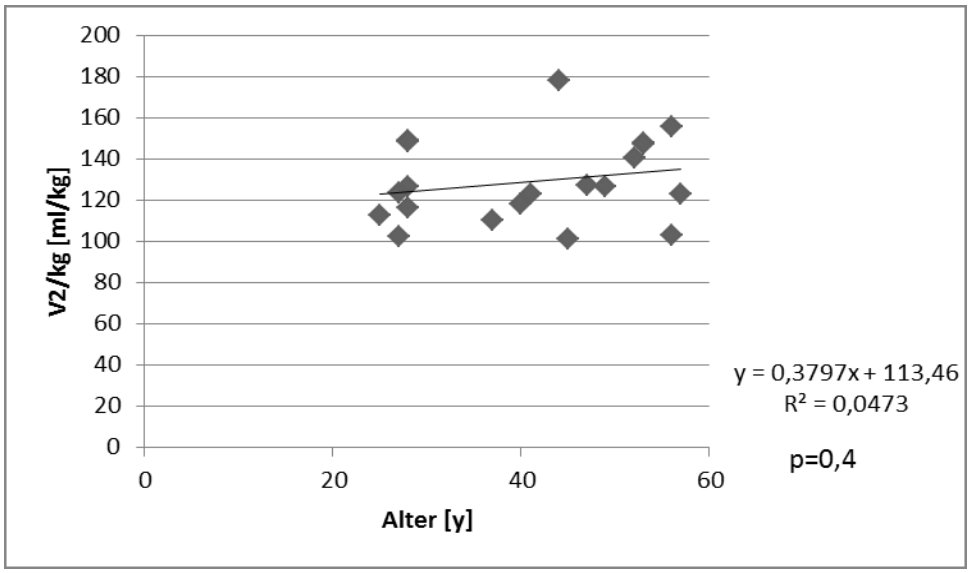

Abbildung 19 Korrelation zwischen V_2 und dem Alter

3.7 In vitro Ergebnisse

Insgesamt wurden Versuche zum in vitro Abbau von Cisatracurium nach oben beschriebenen Protokoll mit Blutproben von 8 ProbandInnen, davon 3 Männer und 5 Frauen, durchgeführt. In Abbildung 13 sieht man den zeitlichen Verlauf des Abbaus Cisatracuriums in vitro und in vivo graphisch dargestellt. Man erkennt, dass die Cisatracuriumkonzentration in vivo zu Beginn sehr viel schneller abnimmt als in vitro, die Konzentrationen zum Ende der Messungen aber ähnlich sind.

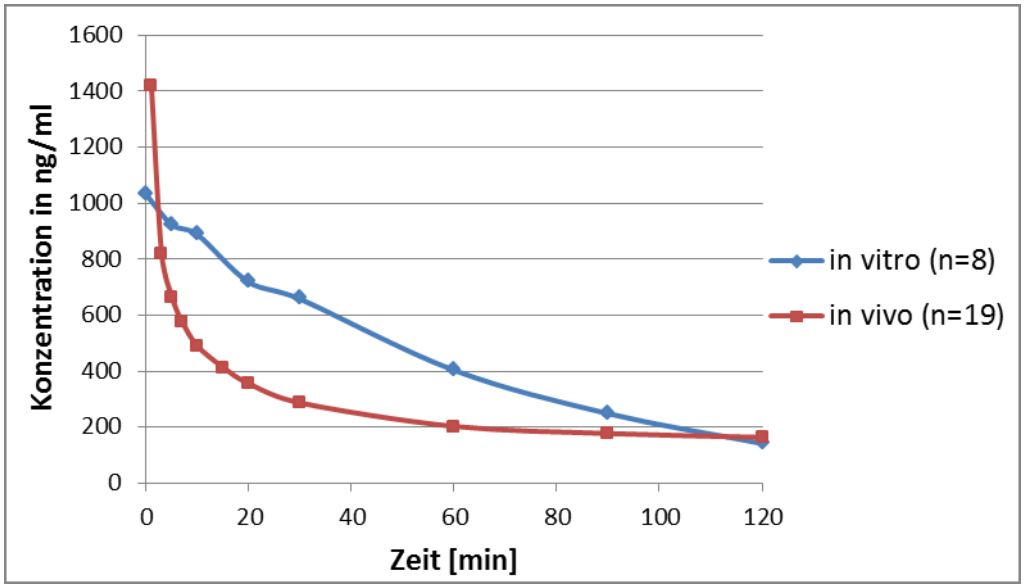

Abbildung 20 Zeitlicher Verlauf des Cisatracuriumsabbaus in vitro und in vivo

4 Diskussion

4.1 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit hatte das primäre Ziel die Pharmakokinetik Cisatracuriums hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede zu prüfen und hat festgestellt, dass es diese nicht gibt. Bei keinem der erhobenen pharmakokinetischen Parameter konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt werden. Auch andere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass es keine klinisch signifikanten Unterschiede in der Wirkung Cisatracuriums zwischen Männern und Frauen gibt. Diese Arbeit war aus pharmakokinetischer Sicht sinnvoll, weil die Anzahl an Arbeiten, die sich mit der Pharmakokinetik beschäftigt haben, begrenzt ist und die Ergebnisse nicht ganz eindeutig waren. Darüber hinaus wurde für diese Arbeit der Ansatz, wie die Daten berechnet und auf mögliche Unterschiede geprüft wurden, anders gewählt.

Es gibt wenige Studien, die sich explizit mit der Pharmakokinetik Cisatracuriums beschäftigt haben und die über die Messung des Cisatracuriumsabbau im Plasma ein pharmakokinetisches Modell erstellt und die Parameter angegeben haben. Wenngleich die Aussagen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden bis auf eine Ausnahme immer ähnlich waren, lassen sich durchaus Unterschiede in den einzelnen Arbeiten entdecken. So finden Shapoor et al. 1996, dass die Plasmaclearance durch höheres Alter nicht beeinflusst wird(38), genau das Gegenteil finden aber Smith et al. 1997 heraus und geben an, dass die Clearance mit jedem Jahr um einen konstanten Wert abnimmt. Im Detail beschreiben sie, dass das Alter und Inhalationsanästhetika V1 beeinflussen und Übergewicht die Clearance senkt(26). Gestützt wird diese Ansicht in einer von Eastwood et al. 1995 veröffentlichen Arbeit, in der beschrieben wird, dass die Clearance mit dem Alter sinkt und das männliche Geschlecht mit einer deutlich größeren Clearance einhergeht(39). Andere Arbeiten befassten sich vor allem mit der Frage, ob das pharmakokinetische Modell besser ist, wenn die Elimination nur im zentralen oder im zentralen und im peripheren Kompartiment stattfindet. Sie geben an, dass das V_{dss} im Modell, das lediglich die zentrale Elimination enthält, als zu klein angenommen wird(28,38).

Betrachtet man diese Zusammenfassung, lässt sich sagen, dass die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich, bezüglich Alter und Clearance, zum Teil nur ein einziges Mal beschrieben wurden, wie zum Beispiel in der Frage ob die Clearance durch Übergewicht herabgesetzt wird. Diese Arbeit kann also als Zusammenfassung von bereits Bekanntem

und der Überprüfung von vorherigen Widersprüchen oder nur einmalig Beschriebenem verstanden werden. Die Fragestellung, ob es geschlechterspezifische Unterschiede gibt, konnte also beim Studium der Literatur um einige weitere interessante Fragestellungen ergänzt werden.

4.2 Zusammenfassung der in vitro Versuche

Der graphische Vergleich zwischen in vitro und in vivo Ergebnissen zeigt einige sehr interessante Details. Es fällt auf, dass die Konzentration in vivo initial deutlich schneller abfällt, die Konzentrationen in vivo und in vitro aber nach 120 Minuten ähnlich sind. Erklären lassen sich diese Beobachtungen damit, dass in vivo in der ersten Zeit zunächst eine Verteilung im gesamten zentralen- und vor allem auch eine Verschiebung und Verteilung in das periphere Kompartiment stattfindet. Dies lässt die Konzentration initial in vivo sehr schnell sinken, während in vitro von Anfang an nahezu ausschließlich die Hofmann Elimination für den Abfall der Cisatracuriumkonzentration verantwortlich ist. Nach 120 Minuten ähneln sich die Konzentrationen neuerlich, wobei davon auszugehen ist, dass der in vitro Abbau in ähnlicher Weise weiter bis auf null gehen wird, wohingegen die in vivo Konzentration deutlich langsamer sinken wird, was vor allem auf die langsame Verschiebung des Muskelrelaxans zurück aus dem großen peripheren Kompartiment V2 zurückzuführen ist.

Was in den in vitro Versuchen im Vergleich zu anderen in vitro Arbeiten außer Acht gelassen wurde, ist der pH-Wert, der in den meisten anderen Arbeiten kontrolliert und stabil gehalten wurde und einen wichtigen Einfluss auf die Hofmann Elimination hat(13,15,29). In einer Arbeit wird beschrieben, dass der pH-Wert im Plasma ohne Verwendung von Puffern dazu neigt zu steigen, weil der CO_2 Gehalt sinkt(13). Es ist jedoch nicht sicher, wie die Situation in Vollblut ist, weil die anderen Arbeiten immer Plasma und kein Vollblut für die Versuche verwendet haben. Plasma zu verwenden hat dabei zweifelsohne Vorteile, weil eine Lagerung, auch über längere Zeit möglich ist. In unseren Versuchen wurde hingegen dass gewonnene Blut sofort verwendet und es bleibt festzuhalten, dass Vollblut sicherlich den physiologischen Gegebenheiten näherkommt als die Verwendung von Plasma, aber eben auch deutlich aufwendiger in der Verarbeitung ist. In weiteren Versuchen wäre eine dauerhafte pH Messung interessant und wichtig, weil der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der Hofmann Elimination hat(13). Außerdem wäre es generell interessant wie sich der pH-Wert in Vollblut in vitro verändert.

4.3 Zusammenfassung der in vivo Ergebnisse

Insgesamt wurden für diese Arbeit Proben von 39 beziehungsweise 20, wenn nur die Kontrollgruppe Berücksichtigung fand, PatientInnen verwendet. Die PatientInnenzahl in dieser Arbeit ist denen in anderen Arbeiten ähnlich und teilweise auch höher. Es war nicht möglich, signifikante Unterschiede im Konzentrationsverlauf oder in der Pharmakokinetik von Cisatracurium zu finden, was in Übereinstimmung mit vorhergehenden Ergebnissen ist(11,20,22,24). Die Ergebnisse anderer Arbeiten, vor allem in Hinblick auf die Clearance und deren Korrelation mit dem Alter, dem Geschlecht, dem BMI oder dem Gewicht konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Konstanten k_{01}, k_{12}, k_{21} und das Zentrale Volumen V_1 sind die Werte, auf denen ein Großteil der weiteren Berechnungen basierte. Beim Betrachten der Werte fällt auf, dass die Verschiebung in das periphere Kompartiment als etwa doppelt so groß angenommen wird, als die Verschiebung zurück in das zentrale Kompartiment, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass auch eine Elimination im peripheren Kompartiment stattfindet.

Vergleicht man die Werte mit zwei anderen Arbeiten, die diese auf zwei verschiedene Arten, einmal wie in dieser Arbeit nur mit zentraler Elimination, und einmal mit zentraler und peripherer Elimination, berechnet haben, so kommt man zu interessanten Ergebnissen, weil sowohl k_{10}, als auch k_{12} tendenziell eher den Werten entsprechen, die in Annahme von zentraler und peripherer Elimination berechnet wurden. Außerdem fällt auf, dass die in dieser Arbeit berechneten Werte deutlich größer (k_{12}, k_{21}) beziehungsweise kleiner (k_{10}) sind(27,28). Erklärungen für diese Unterschiede könnte einerseits ein anderes PatientInnenkollektiv sein, andererseits vor allem auch in dem unterschiedlichen Ansatz in der Berechnung der Parameter gefunden werden.

Arbeiten	n	k_{10}	k_{12}	k_{21}
Bergeron et al. (27)	15	0.095 (0.048*)	0.098 (0.148 *)	0.070 (0.046*)
Tran et al.(28)	14	0.112 (0.053*)	0.126 (0.185*)	0.073 (0.049*)
Ergebnisse dieser Arbeit	39	0,040	0,250	0,110

Tabelle 6 Vergleich der Konstanten k_{10}, k_{12}, k_{21} mit zwei anderen Arbeiten. Mit * gekennzeichnete Werte sind auf Grundlage eines Modells in dem eine zentrale und periphere Elimination angenommen wurde berechnet. In Klammern hinter den Arbeiten ist die Referenznummer angegeben

V1/kg wurde mit 62 [$ml \cdot kg^{-1}$] berechnet und liegt damit im Durchschnitt der Ergebnisse anderer Arbeiten, die Werte zwischen 35 bis 75 [$ml \cdot kg^{-1}$] angeben(12,24,28).

Die Clearance beträgt in dieser Arbeit etwa 3,8 [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$] oder 270 [$ml \cdot min^{-1}$] und liegt im unteren Bereich der Ergebnisse anderer Arbeiten, in denen sich die Clearance

zwischen 3,7 und 5,1 [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$] bewegt(12,24,28), und deren Ergebnisse in Tabelle 7 mit den Ergebnissen in dieser Arbeit verglichen werden. Bei Eastwood et al., die beschreiben, dass die Clearance mit zunehmenden Alter sinkt und bei Männern höher ist, und bei Smith et al., die ebenfalls beschreiben, dass die Clearance mit zunehmenden Alter sinkt, sind die Clearanceveränderungen nur in ml pro Minute angegeben: Eastwood führt 293[$ml \cdot min^{-1}$] an und Smith schreibt 702[$ml \cdot min^{-1}$](26,39). Es fällt auf, dass hier erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Arbeiten bestehen und der Vergleich schwierig scheint. Im Falle von Smith und Eastwood, wäre es auf jeden Fall sinnvoll, die Clearance pro kg zu wissen. Diese Werte werden allerdings nicht angegeben.

Arbeiten	n	Clearance
Eastwood et al. (39)	16	293 [$ml \cdot min^{-1}$]
Tran et al. (28)	14	3.7 [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]
Smith et al. (26)	10	702 [$ml \cdot min^{-1}$]
Kisor et al. (12)	31	5,2 [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]
Schmith et al. (24)	>240	4,57 ($ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]
Ergebnisse dieser Arbeit	39	3,8[$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$] bzw. 280[$ml \cdot min^{-1}$]

Tabelle 7 Vergleich der angegebenen Clearance von Cisatracurium in verschiedenen Arbeiten. In Klammern hinter den Arbeiten ist die Referenznummer angegeben.

Sehr wichtig für die klinische Anwendung ist das Distributionsvolumen, dass die Größe des zentralen und des peripheren Kompartiments angibt und Rückschlüsse zulässt in welchem Volumen, in dieser Arbeit 190 [$ml\ kg^{-1}$], die Verteilung von Cisatracurium stattfindet. Es lässt außerdem feststellen, dass das periphere Kompartiment einen doppelt so großen Anteil im Distributionsvolumen einnimmt als das zentrale Kompartiment V1. Ein anderer wichtiger Parameter ist die Halbwertszeit in der Eliminationsphase ($t_{1/2}ß$). Hier unterscheiden die Ergebnisse dieser Arbeit mit circa 64 Minuten deutlich von anderen Arbeiten, die Werte zwischen 24 und 36 Minuten angeben(26,28,38,39). Dieser Unterschied ist sehr groß und könnte durch Unterschiede in der Berechnung der Halbwertszeit begründet sein, die ja in unserem Fall auf den erwähnten Konstanten basiert. Es könnte zusätzlich auf den Umstand zurückzuführen sein, dass in unserem Modell die Elimination nur aus dem zentralen Kompartiment angenommen wird und dadurch das doppelt so große V_2 keinen Einfluss auf die Elimination nimmt, und sich dadurch die berechnete Halbwertszeit logischerweise verlängern müsste.
Zur Vergleichbarkeit der Arbeiten im Allgemeinen und im Hinblick auf das Distributionsvolumen im Fließgleichgewicht sei auf den folgenden Abschnitt hingewiesen.

4.4 Vergleichbarkeit und Aussagekraft

Auf den ersten Blick lassen sich die gefundenen Ergebnisse in einem Satz zusammenfassen: Es gibt keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Pharmakokinetik von Cisatracuriums. Doch was steckt hinter den Ergebnissen und wie lassen sie sich mit denen anderer Arbeiten vergleichen? Pharmakokinetische Modellberechnungen werden in der Entwicklung neuer Medikamente eingesetzt, um die Pharmakokinetik zu simulieren und mögliche physiologische Faktoren zu erkennen, die diese verändern könnten. So ist das auch im Falle Cisatracuriums geschehen und die Ergebnisse wurden bereits in der Einleitung zusammengefasst. Was interessant wäre, ist die Frage wie man in anderen Arbeiten die Ergebnisse zustande gekommen sind, weil schon im vorherigen Abschnitt deutlich geworden ist, dass der Vergleich, aufgrund großer Unterschiede in den Werten, die in den einzelnen Arbeiten angeben werden, schwierig ist. Ein typisches Beispiel, bei dem pharmakokinetische Modellrechnungen in die Entwicklung von Cisatracurium eingeflossen ist, ist die Studie von Schmith et al., in der man zunächst 1607 Cisatracuriumplasmakonzentrationen von 241 Patienten gesammelt und eine Basispopulation, die männlich, normalgewichtig, mit normaler Nierenfunktion war, und bei der immer dieselbe Anästhesiemethode verwendet wurde, erstellt hat und dann untersucht hat, ob PatientInnen, die in irgendeiner Eigenschaft von dieser Basis abweichen, auch unterschiedliche pharmakokinetische und oder pharmakodynamische Parameter aufweisen. Dies ist ein sehr interessanter Ansatz, konnte man doch danach sagen, dass es zwar Faktoren gibt, die die Pharmakokinetik beeinflussen, die aber keine klinisch signifikanten Unterschiede bewirken. Diese Modellerstellung hat dazu beigetragen, dass die Anzahl von Studien in der Entwicklung von Cisatracurium deutlich gesenkt werden konnte(24). Auch die Versuche in dieser Arbeit den Einfluss des Gewichts beziehungsweise des BMI auf die Clearance, fußten vor allem auf den Ergebnissen dieser Studie. Dass dabei keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten, könnte vor allem auf die deutlich kleinere Anzahl von PatientInnen zurückgeführt werden. Weiteres wäre es interessant gewesen auch andere Ergebnisse dieser Studie zu überprüfen, was aber nicht möglich war, weil die Kreatininwerte in dieser Arbeit nicht bekannt waren und die k_{eo} nicht berechnet wurde. Bei Schmith et al. ist auch eine periphere Elimination (k_{20}) in die Modellrechnungen mit eingeflossen, was einen weiteren Unterschied zu dieser Arbeit darstellt Die periphere Elimination wurde aufgrund von vorhergegangenen in vitro Versuchen in Plasma auf 0,0237 min^{-1} festgesetzt. Dieses Vorgehen wird von einer anderen Studie gestützt, die behauptet, dass das Distributionsvolumen im

Fließgleichgewicht Vd_{ss} sonst als 17% zu klein angenommen wird(12,38). Was sich in diesen Arbeiten leider nicht findet, ist eine Begründung warum es nicht auch umgekehrt sein könnte.

Die Annahme, dass die periphere Elimination gleich der Elimination in vitro zu setzen ist, ist äußerst kritisch zu hinterfragen. In der Arbeit von Weindlmayer-Goettl et al., wird das Vorgehen die periphere Elimination gleich der Elimination in in vitro Versuchen in Plasma gleichzusetzen in Frage gestellt. Man hat nämlich in in vitro Versuchen herausgefunden, dass die Elimationsgeschwindigkeit entscheidend von dem verwendeten Puffer abhängt. Das wird darauf zurückgeführt, dass jeder Puffer in unterschiedlichen Konzentrationen Basen enthält und diese anscheinend die Elimination von Cisatracurium beeinflussen. Die Autoren folgern daraus, dass auch im Körper die Elimination, je nachdem mit welchen Oberflächen oder Stoffen Cisatracurium in Kontakt kommt, überall unterschiedlich schnell vonstattengeht, weil die Basenkonzentration von Stoff zu Stoff unterschiedlich ist. Im peripheren Kompartiment ist die Eliminationsgeschwindigkeit mit ziemlicher Sicherheit nicht überall gleich, und wahrscheinlich nicht mit den in vitro Werten übereinstimmend(40). Unter Umständen wäre es sinnvoller die Eliminationsgeschwindigkeit auf Basis von in vitro Versuchen in Interstitialflüssigkeit zu berechnen. Alles in allem ist es schwierig die periphere Elimination zu quantifizieren, weil man sie nicht direkt messen kann und es lässt sich durchaus rechtfertigen, dass in dem Modell in dieser Arbeit nur eine zentrale Elimination mit eingeflossen ist.

Was sich anbietet, und im vorhergehenden Abschnitt ja zum Teil auch schon durchgeführt wurde, ist ein Vergleich oben genannter Arbeiten mit der hier vorliegenden. Hier müssen aber auch noch zwei Einschränkungen angeführt werden. Zum einen variieren die angegebenen Werte stark und zum anderen wird in vielen Arbeiten nicht angegeben, wie die einzelnen Parameter berechnet wurden. Denn wie auch in dieser Arbeit, leitet sich ein Großteil der Parameter von den zentralen Elementen des pharmakokinetischen Modells ab. In unserem Fall wurde ja auch nur k_{01}, k_{12}, k_{21}, V_1 mittels Scientist berechnet, die Restlichen wurden auf deren Grundlage mit Formeln berechnet. Hier liegt ein Problem des Vergleichens, weil diese Formeln nicht überall mit angegeben werden und der Verdacht besteht, dass diese nicht überall gleich sind. So wurde zum Beispiel bei Kisor et al. das Distributionsvolumen im steady state Vd_{ss} über folgenden Formel berechnet: $V_1 \cdot [1+(k_{12}/k_{21})]$. In unserer Studie, wie auch bei Schmith et al. wurde es als einfache Summe von V_1+V_2 angegeben. Vergleicht man trotzdem auch Vd_{ss} der drei Arbeiten, kommt man zu dem interessanten Ergebnis, dass unser Ergebnis mit

190 (SD: 35) [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$] am ehesten dem bei Kisor et al. mit dem Modell mit Elimination aus dem zentralen und peripheren Kompartiment berechneten Wert: 168 (SD: 44) [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$] entspricht. Sowohl deren mit dem Modell, dass nur die zentrale Elimination einschließt, berechneter Wert, als auch der Basispopulationswert von Schmith et al. sind kleiner: 139 und 146 [$ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]. Demzufolge ist nicht davon auszugehen, dass das Distributionsvolumen generell deutlich kleiner ist, wenn man nur von zentraler Elimination ausgeht.

4.5 Bewertung des Modells und des benutzten Programms

Eine Bewertung der Stärke des in dieser Arbeit verwendeten Modells durch Vergleiche mit anderen Arbeiten, scheint also generell schwierig zu sein. Im Prinzip muss man eher auf die objektive Beurteilung der erstellten Kurve, und wie genau diese die gemessenen Konzentrationen trifft, verlassen. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die berechneten Werte auch mit der Standardabweichung nicht ≤0 wären, was bestätigt wurde. Somit kann von einem guten Modellfit ausgegangen werden. Auch in den Richtlinien der good clinical research practice Veröffentlichung wird die visuelle Kontrolle der erstellten Kurve empfohlen. Zusätzlich könnte man das Residuum, also den Unterschied zwischen den gemessen und berechneten Daten, graphisch und rechnerisch beurteilen. Außerdem könnte man den Standardfehler, der unter einem bestimmten vorher festgelegten Bereich liegen muss, zur Validierung der Güte des Modells verwenden(41). Was sicherlich interessant wäre, ist wie sich die Werte und das Modell verändern würde, wenn man auch eine periphere Elimination mit einbeziehen würde und einen Vergleich mit den in dieser Arbeit beschriebenen Werten anstreben würde.

Interessant ist auch der Ansatz mit dem die pharmakokinetischen Parameter berechnet wurden. Während in unserem Fall mittels Scientist für jede/n einzelne/n Patienten/in eine Kurve mit den dazugehörigen Parametern berechnet wurde, wurde in anderen Arbeiten zumeist mit der NONNEM (non linear Mixed Effects Model) Software ein Modell für alle PatientInnen erstellt(12,24,26). Es wird also aus den Daten aller PatientInnen ein Populationsmittel für die einzelnen pharmakokinetischen Parameter erstellt und deren Variabilität angegeben. Dieses Vorgehen wurde auch von Schmith et al. verwendet und im vorgehenden Abschnitt beschrieben. Zusätzlich hat NONNEM eine für pharmakokinetische Studien sehr interessante Funktion, weil es über die sogenannte objektive Funktion angibt, in wie weit das Modell zu den gemessenen Daten passt und so direktes Feedback über die Güte des Modells gibt. Man erstellt also ein Modell aus allen gemessenen Daten und kann dann überprüfen, ob sich das Modell verbessert, wenn

Eigenschaften wie Gewicht und oder Alter mit in das Modell einbezogen werden(26). Dies erleichtert entscheidend die Begutachtung des Modells.

4.6 Bewertung der Korrelationsanalysen

An dieser Stelle sollen die Korrelationsanalysen diskutiert werden. Diese wurden im Hinblick auf den Einfluss des Gewichts und des Alters auf die Clearance durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob das Volumen des zentralen oder des peripheren Kompartiments durch Alter, Größe oder Gewicht beeinflusst wird. Außerdem werden die Korrelationsanalysen bezüglich der Halbwertszeit diskutiert.

4.6.1 Clearance

Andere Studien haben gefunden, dass die Clearance durch Alter und oder Geschlecht beeinflusst wird(26,39). Es sollte aber kritisch hinterfragt werden, wie sie zu diesen Ergebnissen gekommen sind. Beide Arbeiten haben mit einem PatientInnenkollektiv gearbeitet, dass aus 16 beziehungsweise 10 Personen bestanden ist. Durch die geringe Stichprobengröße dieser Arbeiten, war es deshalb sinnvoll diese Ergebnisse an einem größeren Kollektiv zu überprüfen.

Schmith et al. konnten an einer größeren Stichprobe (>240) feststellen, dass Übergewicht die Clearance geringfügig verändert, was sich in dieser Arbeit nicht finden ließ, was unter Umständen ebenfalls an der Stichprobengröße liegt. Außerdem bleibt kritisch anzumerken, dass unsere Proben nicht mit dem primären Ziel abgenommen wurden, die Pharmakokinetik bei Übergewicht zu untersuchen. Dafür hätte man, in Anlehnung an die GCRP Richtlinien, vor allem Proben von PatientInnen sammeln müssen, die das Idealgewicht oder den normalgewichtigen BMI um mehr als 30% überschreiten(41). Aber auch hier sind die Ergebnisse insofern als aussagekräftig zu bezeichnen, als dass sich die Clearance in zwei homogenen, aber vom BMI her signifikant unterschiedlichen Gruppen, nicht unterscheiden. Darüber hinaus ist die Frage ob die Pharmakokinetik von adipösen Menschen Unterschiede zeigt, im Hinblick auf eine immer höhere Adipositasprävalenz in der Bevölkerung hoch interessant und sehr wichtig.

4.6.2 V_1 und V_2

Die Korrelationsanalysen inwieweit V_1 und V_2 mit dem Gewicht, Alter oder der Größe korrelieren, basierten auf der Beobachtung, dass die Werte vor allem bei V_1 stark schwanken und auch wenn sie auf pro kg Körpergewicht umgerechnet werden immer noch Standardabweichungen von 37% beziehungsweise 16% aufweisen. Deshalb wurde überprüft, ob die bekannten Eigenschaften der PatientInnen einen Einfluss auf die

Kompartimentgröße haben. Eine Korrelation konnte allerdings nicht gefunden werden. Das könnte einerseits wieder auf die kleine PatientInnenanzahl (n=20) zurückzuführen sein, andererseits könnte das Volumen aber auch von anderen Parametern beeinflusst werden, die nicht erfasst wurden.

4.7 Vor der nächsten Studie

In diesem Abschnitt soll diskutiert werden, was vor Durchführung weiterer pharmakokinetischer Studien zu bedenken wäre.

4.7.1 Modellvergleiche

In unserem Fall wäre es interessant gewesen, auch ein Modell zu erstellen, das die periphere Elimination inkludiert. Die Ergebnisse könnte man dann mit unseren Ergebnissen und auch mit anderen Arbeiten vergleichen.
Andere Ansätze in der Modellrechnung sind bereits geplant, wurden aber hier nicht mehr durchgeführt, da dies den Umfang dieser Arbeit überschreiten würde.

4.7.2 Korrelationsanalysen

Sicherlich wäre es auch sehr interessant in weiteren Studien oder anhand vorhandener Literatur der Frage nachzugehen, wovon die Größe der einzelnen Kompartimente oder auch die anderen berechneten pharmakokinetischen Parameter abhängen.

4.7.3 Halbwertszeit

Sehr wichtig erscheint es auch, zu überprüfen, warum sich die Halbwertszeit so stark von den Angaben in anderen Arbeiten unterscheidet.

4.8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Pharmakokinetik von Cisatracurium gefunden werden. Sie grenzt sich dabei von anderen Arbeiten vor allem dadurch ab, dass ein anderer Ansatz zur Modellerstellung gewählt wurde, dass nur die zentrale Elimination in den Berechnungen berücksichtigt wurde, und dass diese Arbeit circa 15 Jahre nach dem „Zenit“ an Veröffentlichungen zum Thema Cisatracurium durchgeführt wurde.
Aus den einzelnen Punkten in der Diskussion geht hervor, dass diese Arbeit gerechtfertigt ist. Es wurden Ergebnisse erzielt, die vergleichbar mit denen anderer Arbeiten sind und zudem wurden fragliche Ergebnisse aus anderen Arbeiten überprüft. Dabei wurde deutlich, dass es generell gilt, Publikationen kritisch zu lesen und die erzielten Ergebnisse kritisch zu hinterfragen.

Auch die periphere Elimination nicht mit in die Modellrechnungen einzubeziehen ist letztendlich gerechtfertigt, weil die Annahme eines fixen Wertes für das Ausmaß der peripheren Elimination immer noch kritisch zu sehen ist, und im Übrigen nicht gesichert ist, dass diese Maßnahme das Modell entscheidend verbessert.
Dass die Arbeit viele Jahre nach dem Großteil der Publikationen entstanden ist, muss nicht als Zeichen fehlender Aktualität angesehen werden, sondern vielmehr als Durchführung einer Studie mit „gewissem Abstand“ und zur kritischen Hinterfragung von bereits Publiziertem.

5 Literaturverzeichnis

1. Steinhilber D. Medizinische Chemie. 2. Aufl. Stuttgart: Dt. Apotheker-Verl.; 2010.
2. Bowman WC. Neuromuscular block. Br. J. Pharmacol. 2006 Jan;147 Suppl 1:S277–86.
3. Lüllmann H. Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen. 17. Aufl. Stuttgart;New York NY: Thieme; 2010.
4. Wastila WB, Maehr RB, Turner GL, Hill DA, Savarese JJ. Comparative pharmacology of cisatracurium (51W89), atracurium, and five isomers in cats. Anesthesiology. 1996 Juli;85(1):169–77.
5. Belmont MR, Lien CA, Quessy S, Abou-Donia MM, Abalos A, Eppich L, u. a. The clinical neuromuscular pharmacology of 51W89 in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. Anesthesiology. 1995 Mai;82(5):1139–45.
6. Savarese JJ, Lien CA, Belmont MR, Wastila WB. [The clinical pharmacology of new benzylisoquinoline-diester compounds, with special consideration of cisatracurium and mivacurium]. Anaesthesist. 1997 Okt;46(10):840–9.
7. Schmidt R. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Berlin, Heidelberg :: Springer,; 2005.
8. Suxamethonium – Wikipedia [Internet]. [zitiert 2011 Jul 28];Available from: http://de.wikipedia.org/wiki/Suxamethonium
9. Roy JJ, Varin F. Physicochemical properties of neuromuscular blocking agents and their impact on the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. Br J Anaesth. 2004 Aug;93(2):241–8.
10. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch : Buch Online. 263. Aufl. Berlin: De Gruyter; 2011.
11. Atherton DP, Hunter JM. Clinical pharmacokinetics of the newer neuromuscular blocking drugs. Clin Pharmacokinet. 1999 März;36(3):169–89.
12. Kisor DF, Schmith VD, Wargin WA, Lien CA, Ornstein E, Cook DR. Importance of the organ-independent elimination of cisatracurium. Anesth. Analg. 1996 Nov;83(5):1065–71.
13. Welch RM, Brown A, Ravitch J, Dahl R. The in vitro degradation of cisatracurium, the R, cis-R'-isomer of atracurium, in human and rat plasma. Clin. Pharmacol. Ther. 1995 Aug;58(2):132–42.

14. Wachter H. Chemie in der Medizin. 9. Aufl. Berlin [u.a.]: De Gruyter; 2008.
15. Tsui D, Graham GG, Torda TA. The pharmacokinetics of atracurium isomers in vitro and in humans. Anesthesiology. 1987 Nov;67(5):722–8.
16. Keeser E. Untersuchungen über die Ursachen der pharmakologischen Wirkungsunterschiede von optischen Isomeren.[Abstract] Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol. 1928 Mai;129(3-4):236–55.
17. Huang Q, He R, Kozikowski AP. Stereochemistry at the forefront in the design and discovery of novel anti-tuberculosis agents.[Abstract] Curr Top Med Chem. 2011;11(7):810–8.
18. Ekatodramis G, Borgeat A. The enantiomers: revolution or evolution.[Abstract] Curr Top Med Chem. 2001 Aug;1(3):205–6.
19. Xue FS, Tong SY, Liao X, Liu JH, An G, Luo LK. Dose-response and time course of effect of rocuronium in male and female anesthetized patients. Anesth. Analg. 1997 Sep;85(3):667–71.
20. Adamus M, Gabrhelik T, Marek O. Influence of gender on the course of neuromuscular block following a single bolus dose of cisatracurium or rocuronium. Eur J Anaesthesiol. 2008 Juli;25(7):589–95.
21. Xue FS, Zhang YM, Liao X, Liu JH, An G. Influences of age and gender on dose response and time course of effect of atracurium in anesthetized adult patients. J Clin Anesth. 1999 Aug;11(5):397–405.
22. Pleym H, Spigset O, Kharasch ED, Dale O. Gender differences in drug effects: implications for anesthesiologists. Acta Anaesthesiol Scand. 2003 März;47(3):241–59.
23. Dahaba AA, Suljevic I, Bornemann H, Wu X, Metzler H. Regional indifference in cisatracurium dose-response and time-course-of-action between patients in China and Bosnia. Br J Anaesth [Internet]. 2010 Dez 23;Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205623
24. Schmith VD, Fiedler-Kelly J, Phillips L, Grasela TH. Prospective use of population pharmacokinetics/pharmacodynamics in the development of cisatracurium. Pharm. Res. 1997 Jan;14(1):91–7.
25. Schmidt H. Pharmakologie und Toxikologie : für Studium und Praxis. 6. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2007.
26. Smith CE, van Miert MM, Parker CJ, Hunter JM. A comparison of the infusion pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium, the 1R-cis 1'R-cis isomer of atracurium, with atracurium besylate in healthy patients. Anaesthesia. 1997 Sep;52(9):833–

41.
27. Bergeron L, Bevan DR, Berrill A, Kahwaji R, Varin F. Concentration-effect relationship of cisatracurium at three different dose levels in the anesthetized patient. Anesthesiology. 2001 Aug;95(2):314–23.
28. Tran TV, Fiset P, Varin F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium after a short infusion in patients under propofol anesthesia. Anesth. Analg. 1998 Nov;87(5):1158–63.
29. Chen C, Yamaguchi N, Varin F. Studies on the pharmacokinetics of cisatracurium in anesthetized dogs: in vitro-in vivo correlations. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2009 Dez;32(6):571–6.
30. Weiterbildung für den Anästhesisten 2004 : Standardwissen für den Facharzt. 1. Aufl. Berlin: Springer; 2005.
31. Römpp kompakt Basislexikon Chemie. Stuttgart ;;New York: Thieme; 1998.
32. Farenc C, Audran M, Lefrant JY, Mazerm I, Bressolle F. High-performance liquid chromatographic method for the determination of atracurium and laudanosine in human plasma. Application to pharmacokinetics. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1999 März 5;724(1):117–26.
33. Meyer V. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Aktualisierte 9. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
34. Scientist_Getting_Started_Guide.pdf [Internet]. [zitiert 2011 Aug 28];Available from: http://www.softbooks.com.pl/micromath/files/download/Scientist_Getting_Started_Guide.pdf
35. Dahaba AA, Oettl K, von Klobucar F, Reibnegger G, List WF. End-stage renal failure reduces central clearance and prolongs the elimination half life of remifentanil. Can J Anaesth. 2002 Apr;49(4):369–74.
36. Stata - Wikipedia, the free encyclopedia [Internet]. [zitiert 2011 Jul 10];Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Stata
37. Regressionsanalyse – Wikipedia [Internet]. [zitiert 2011 Jul 10];Available from: http://de.wikipedia.org/wiki/Regressionsanalyse
38. Sorooshian SS, Stafford MA, Eastwood NB, Boyd AH, Hull CJ, Wright PM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium in young and elderly adult patients. Anesthesiology. 1996 Mai;84(5):1083–91.
39. Eastwood NB, Boyd AH, Parker CJ, Hunter JM. Pharmacokinetics of 1R-cis 1'R-

cis atracurium besylate (51W89) and plasma laudanosine concentrations in health and chronic renal failure. Br J Anaesth. 1995 Okt;75(4):431–5.
40. Weindlmayr-Goettel M, Kress HG, Hammerschmidt F, Nigrovic V. In vitro degradation of atracurium and cisatracurium at pH 7.4 and 37 degrees C depends on the composition of the incubating solutions. Br J Anaesth. 1998 Sep;81(3):409–14.
41. Viby-Mogensen J, Ostergaard D, Donati F, Fisher D, Hunter J, Kampmann JP, u. a. Pharmacokinetic studies of neuromuscular blocking agents: good clinical research practice (GCRP). Acta Anaesthesiol Scand. 2000 Nov;44(10):1169–90.