



**LATVIJAS
UNIVERSITĀTE**

Dati par promocijas darba vadītāju, recenzentiem, aizstāvēšanas laiku un vietu

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē; Latvijas Jūras Medicīnas centrā, Leipcigas Universitātes MH laboratorijā un BKUS Medicīniskās ģenētikas klīnikā

Promocijas darba vadītājs:

Prof. Dr. hab. med. Māris Mihelsons

Promocijas padomes priekšsēdētājs:

Oficiālie recenzenti:

Aizstāvēšana notiks 2010. gada _____ pulksten _____ Latvijas Universitātes medicīnas, bioloģijas un farmācijas nozaru promocijas padomes sēdē Rīgā, Raiņa bulvārī 19, LU Mazajā aulā.

ANOTĀCIJA

Ļaundabīgā (malignā) hipertermija (MH) ir reta autosomāli dominanta farmakoģenētiska slimība, kas izpaužas ar skeleta muskulatūras hipermetabolisku reakciju uz gaistošiem anestēzijas līdzekļiem (halotānu, izoflurānu, desflurānu un sevoflurānu) un depolarizējošo muskuļu relaksantu sukcinilholīnu. Reti tā manifestējas kā atbilde uz stresu, piemēram, lielu slodzi vai karstumu. Pateicoties mūsdienu diagnostikas iespējām, medicīnas personāla informētībai un dantrolēna pieejamībai šobrīd attīstītajās valstīs letalitāte ir 2 – 3%.

Diemžēl Latvija pieder pie valstīm, kur šai problēmai netiek pievērsta nepieciešamā uzmanība, kas potenciāli apdraud pacientu dzīvību. Oficiāli nav dokumentēts neviens MH gadījums un statistiskā uzskaitē netiek veikta. Pēc Latvijas anesteziologu un reanimatologu asociācijas (LARA) datiem atrasti divi pacienti, kuriem, iespējams, bija MH. Abos gadījumos pacienti mira 3 līdz 4 stundu laikā pēc anestēzijas sākuma, tiem nebija iespējams saņemt pilnvērtīgu terapiju, jo Dantrolēns nebija pieejams un slimības diagnostika nebija iespējama. Pacientu piederīgie tika izmeklēti atbilstoši EMHG vadlīnijām. Izmeklējumu rezultāti AN pacienta ģimenē uzrādīja jaunu *missense* mutāciju G528T (Glu-176-Asp) *RYR1* gēnā un pozitīvu *In vitro* kontrakcijas testu - muskuļa biopsijas materiāla relaksācijas traucējumus veicot testu gan ar halotānu, gan ar kofeīnu. Turpmāk veiktie Ca^{2+} vielmaiņas funkcionālie mērījumi ticami atšķīrās no mērījumiem MH-normālo (MHn) indivīdu kontrolgrupā, kas apliecina šī genotipa saistību ar MH-pozitīvo (MHs) fenotipu.

Simts brīvprātīgiem voluntieriem tika veikta molekulārā diagnostika, lai izslēgtu Latvijas populācijai raksturīgu polimorfismu. Veikto izmeklējumu rezultāti liecina, ka augstāk minētā mutācija ir cēlonis MHS un šīs mutācijas nēsātājiem jāizvairās no anestēzijas ar trigervielām. Ar šīs ģimenes locekļiem tiek uzturēti regulāri kontakti un tiem tiek sniegta konsultatīvā palīdzība, tāpat tiek konsultēti anesteziologi, kuri nodrošina minēto pacientu aprūpi operāciju laikā.

AS pacientes ģimenes locekļiem mutāciju *RYR1* gēnā neatrada un IVCT pēc viņu vēlēšanās netika veikts.

Malignās hipertermijas diagnostikas sistēmas izveidošanai un pilnveidošanai Latvijā jāveic plašs izglītojošais darbs medicīnas personāla starpā, lai slimība tiktu diagnosticēta arī vieglāku un abortīvu formu gadījumā. Šobrīd ir izveidota Dantrolēna rezerve viena līdz divu pacientu ārstēšanai, kura atrodas Katastrofu medicīnas centrā. Darbs ir pierādījis, ka Latvijā ir pietiekošs potenciāls, lai izveidotu MH laboratoriju, kur tiks veikta savlaicīga un kvalitatīva MH diagnostika ne vien Latvijas pacientiem, bet arī pacientiem no visām Baltijas valstīm.

Atslēgas vārdi: Malignā hipertermija, IVCT, mutācijas RYR1 gēnā, komplikācijas pēc anestēzijas.

ABSTRACT

Malignant hyperthermia (MH) is a rare pharmacogenetic disorder with an autosomal dominant inheritance that presents as a hypermetabolic response in skeletal muscle to volatile anaesthetic gases (halothane, isoflurane, desflurane, sevoflurane) and the depolarizing muscle relaxant succinylcholine and rarely to stresses such as vigorous exercise and heat. Current MH mortality is 2 – 3%, because of the today's diagnostic facilities, knowledge of medical staff and worldwide used calcium channel blocker dantrolene (the only one specific and effective treatment for MH).

Situation in Latvia is quite different because of the lack of dantrolene treatment possibility and low activity from medical specialists in diagnostic of MH; therefore there is no available statistical data about the presence of MH in Latvia. In old medical files, two patients, who probably have had MH crisis, were recognized. Both of them died in several hours after surgery because the treatment with dantrolene was not available. Patients' relatives were investigated according to European Malignant Hyperthermia Group (EMHG) guidelines. Novel missense mutation G528T (Glu-176-Asp) in gene *RYR1* for four AN-family members was found. Also *in vitro* contracture test (IVCT) revealed muscle disability to relax to baseline after contracture with halothane and caffeine confirming the diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. The functional investigation of *RYR1* function in *ex vivo* tissues from MH-susceptible patients was performed by calcium ligand binding measurements in myotubes and significant statistical difference in rest calcium concentrations in MH-susceptible and MH-negative myotubes was found. One hundred DNA samples of volunteers were investigated for the absence of the sequence change to exclude the population specific polymorphism. Investigation results confirm the novel mutation G528T (Glu-176-Asp) association with the MHs phenotype. Persons with this mutation should avoid volatile anesthetics and succinylcholine for general anesthesia in case of surgery.

For AS-family mutation in *RYR1* gene was not found and the IVCT was not performed at their own will.

More education about MH clinical forms should be given to medical society for establishing of MH diagnostic and treatment system in Latvia. Dantrolene for two persons' treatment is situated in Latvian Disaster Medicine centre. Our investigation shows that Latvia has the sufficient potential to set up the MH centre that could be in attendance not only on Latvian population but also on all Baltic countries.

Key words: Malignant hyperthermia, Mutation in RYR1 gene, IVCT, Anesthesia, Complications.

SATURA RĀDĪTĀJS

| | |
|---|----|
| Titullapa | 1 |
| Dati par promocijas darba vadītāju, recenzentiem un aizstāvēšanas laiku un vietu | 2 |
| Anotācija | 3 |
| Abstract | 4 |
| Satura rādītājs | 5 |
| Ievads | 7 |
| Darba mērķis un uzdevumi | 9 |
| I Literatūras apskats | 10 |
| 1. Anestezioloģija kā medicīnas nozare | 10 |
| 1.1. Anestēzijas veidi un to pielietojums | 11 |
| 1.2. Anestēzijā izmantojamie medikamenti | 12 |
| 1.2.1. Miega līdzekļi | 12 |
| 1.2.2. Narkotiskie analgētiķi | 14 |
| 1.2.3. Muskuļu relaksanti | 15 |
| 1.2.4. Gaistošie anestēzijas līdzekļi | 16 |
| 1.3. Anestēzijas ietekme uz pacienta organismu un iespējamās komplikācijas | 20 |
| 1.3.1. Vispārējās anestēzijas būtiskākās komplikācijas | 21 |
| 1.3.2. Reģionālās anestēzijas būtiskākās komplikācijas | 22 |
| 1.3.3. Lokālās anestēzijas būtiskākās komplikācijas | 23 |
| 1.4. Komplikāciju iedalījums pēc ietekmes uz atbilstošo orgānu sistēmu | 23 |
| 2. Malignā hipertermija | 24 |
| 2.1. Malignās hipertermijas atklāšanas vēsture | 24 |
| 2.2. Malignās hipertermijas epidemioloģija | 25 |
| 2.3. Malignās hipertermijas etioloģija | 25 |
| 2.3.1. Skeleta muskulatūras darbības fizioloģija | 26 |
| 2.3.2. Skeleta muskuļu stress | 28 |
| 2.3.3. Iegūts skeleta muskuļu stress | 29 |
| 2.3.4. Iedzimtas skeleta muskulatūras disfunkcijas formas | 31 |
| 2.3.5. Neiromuskulārās slimības, kas kombinējas ar maligno hipertermiju | 32 |
| 3. Malignās hipertermijas klīniskās izpausmes | 35 |
| 3.1. Primārās izpausmes | 35 |
| 3.2. Malignās hipertermijas klīniskā aina | 36 |
| 4. Malignās hipertermijas molekulāri ģenētiskie aspekti | 38 |
| 4.1. Rianodīna receptora gēna 1 (<i>RYR1</i>) struktūra | 39 |
| 4.2. <i>RYR1</i> gēna mutācijas | 40 |
| 4.3. EMHG kritēriji <i>RYR1</i> mutāciju iekļaušanai MH izraisošo mutāciju sarakstā | 41 |
| 5. MH diagnostikas iespējas | 42 |
| 5.1. <i>In vitro</i> kontrakcijas tests | 42 |
| 5.1.1. IVCT diagnostiskie kritēriji | 45 |
| 5.1.2. Kvalitātes kontrole | 46 |
| 5.1.3. Alternatīvie testi | 47 |
| 5.2. <i>RYR1</i> gēna mutāciju diagnostika | 47 |
| 6. Malignās hipertermijas ārstēšana | 48 |
| 7. Anestēzija pacientiem ar aizdomām par MH | 50 |
| II Materiāls un metodes | 51 |
| 1. Pacienti | 51 |
| 2. Pacientu DNS paraugu molekulārā diagnostika | 51 |

| | |
|---|----|
| 2.1. Genoma DNS izdalīšana | 51 |
| 2.2. Mutāciju noteikšana | 53 |
| 2.2.1. DNS paraugu tiešās sekvencēšanas analīze | 53 |
| 3. <i>In vitro</i> kontrakcijas tests | 56 |
| 3.1. IVCT diagnostiskās iekārtas uzbūve | 56 |
| 3.1.1. Programmas darba logs | 58 |
| 3.1.2. Izdrukas | 60 |
| 4. Kalcija vielmaiņas funkcionālā analīze | 61 |
| III Rezultāti | 63 |
| IV Diskusija | 70 |
| V Secinājumi | 79 |
| Vēres | 81 |
| Pielikums | |

IEVADS

Maligno hipertermiju (MH) pirmo reizi aprakstīja 1960. gadā ārsti Denborough un Lovell Austrālijā, kuri bija ievērojuši, atsevišķās ģimenēs novēro ar anestēziju saistītus līdzīgas izpausmes nāves gadījumus (Denbrough MA and Lovell RRH, 1960). Tomēr jau agrāk literatūrā aprakstīti MH līdzīgi sindromi, piemēram, 1929. gada franču patoloģis aprakstījis bālumu un hipertermiju saistībā ar operāciju un augstu mirstību bērniem. Tā ir iedzimta farmakoģenētiska slimība, kas izpaužas ar hipermetabolisku sindromu un muskulatūras rigiditāti pēc ekspozīcijas ar gaistošām anestēzijas vielām vai īsas darbības muskuļu relaksantu sukcinilholīnu.

MH tiek pārmantota autosomāli dominantā veidā un ir saistīta ar mutācijām pirmā tipa rianodīna receptora gēnā (*RYR1*). Klīniski tā manifestējas ar pastiprinātas muskulatūras kontrakcijas izraisītu hipermetabolu stāvokli, kas manifestējas ar tahikardiju, paaugstinātu CO₂ līmeni izelpojamā gaisā, muskulatūras rigiditāti un paaugstinātu muskulatūras tonusu. Organisms nespēj nodrošināt nepieciešamo skābekļa daudzumu, kas nepieciešams šūnām pastāvīgas kontrakcijas nodrošināšanai. Rezultātā muskuļu šūnas iet bojā un asinsritē nokļūst miocītu saturs- mioglobīns, kālijs un audu nekrotiskais faktors, izraisot sirdsdarbības traucējumus, akūtu nieru mazspēju un diseminētas intravazālas koagulācijas (DIK) sindromu. Sākotnēji mirstība no MH bija aptuveni 70 – 80%, jo nebija zināma specifiska terapija un kvalitatīva diagnostika. Uzlabojoties pacientu monitorēšanas un ārstēšanas iespējām letalitāte MH manifestācijas gadījumā attīstītajās valstīs samazinājās līdz 10% astoņdesmitajos gados. Mūsdienās pateicoties medicīnas personāla informētībai, funkcionālās un molekulārās diagnostikas iespējām un Dantrolēna pieejamībai attīstītajās valstīs letalitāte ir 2 – 3%. Dantrolēns ir vienīgais specifiskais medikaments, kurš spēj bloķēt kalcija jonu kanālus MH krīzes gadījumā, ļaujot glābt pacienta dzīvību.

Malignā hipertermija manifestējas 1 no 40 000 līdz 1 no 100 000 anestēziju. Slimības klīniskā norise ir smagāka jauniem cilvēkiem, bet vecākiem pacientiem un zīdaiņiem simptomi ir mazāk izteikti (Benumof JL, Saidman LJ. 2000). Svarīgs faktors ir medicīnas personāla informētība par MH izpausmēm, pirmajām pazīmēm un abortīvām formām. Anamnēzē saņemta anestēzija ar trigervielām, kur MH nav manifestējusies negarantē drošu anestēzijas norisi arī turpmāk. Ir zināmi fulminantas MH gadījumi pēc iepriekš pārciestām operācijām, kur līdzīgas anestēzijas gadījumā slimība nav izpaudusies vai šajos gadījumos simptomi bijuši maz izteikti un par iespējamu maligno hipertermiju neviens nav iedomājies (Bendixen et al 1997). Līdz pat 50% no MH aizdomīgiem pacientiem, pirms diagnozes uzstādīšanas, saņēmuši anestēziju ar trigervielām, bet slimības simptomi nav manifestējušies

(Halsall PJ et al 1979). Līdz ar to visā pasaulē tā vēl joprojām tiek uzskatīta par ļoti bīstamu ar anestēziju saistītu slimību.

Malignās hipertermijas diagnoze tiek apstiprināta veicot *In vitro* kontrakcijas testu (IVCT). Šai gadījumā tiek izmantots pacienta muskuļa biopsijas paraugs un pārbaudītas tā kontrakcijas pēc ekspozīcijas ar trigervielām. Ja IVCT ir pozitīvs, turpmāk tiek veikta pacienta DNS analīze.

Latvijā ik gadu tiek veiktas 40 – 60 000 anestēzijas, tātad jābūt vismaz vienam MH manifestācijas gadījumam vienā līdz divos gados, bet pēc šobrīd pieejamām ziņām tā konstatēta reizi 10 gados. Maz ticams, ka Latvijas iedzīvotājiem mutācijas *RYR1* gēnā nav sastopamas vai sastopamas daudz retāk kā citur pasaulē. Drīzāk MH pazīmes netiek savlaicīgi atpazītas un iespējamie mutācijas nēsātāji netiek atklāti. Speciālisti atzīmē, ka MH līdzīgi simptomi klīniskajā praksē sastopami biežāk, tikai tie netiek dokumentēti un pacienti netiek izmeklēti. Diemžēl par MH sāk domāt tikai tad, ja augsta temperatūra pacientam pieturas ilgāku laiku un nevar tai atrast citu pārliecinošu iemeslu. Anesteziologu sabiedrībā tiek analizēti un diskutēti tikai letālie gadījumi, bet citu specialitāšu ārsti par šo slimību nav informēti vispār.

Latvijā stāvoklis MH diagnostikas un ārstēšanas jomā stipri atšķiras no attīstītajām valstīm. Šobrīd zināmi 2 pacienti, kuriem, iespējams, bija MH. Abos gadījumos pacients mira 3 līdz 4 stundu laikā pēc anestēzijas sākuma, tiem nebija iespējams saņemt pilnvērtīgu terapiju, jo Dantrolēns nebija pieejams un slimības diagnostika nebija iespējama (Tomiņš u. C.). Neuzstādot precīzu diagnozi nav iespējams pasargāt arī šo cilvēku piederīgos no līdzīgas situācijas nākotnē. Kolēģi bieži atceras klīnisko situāciju, bet nevar atcerēties pacientu un arī operācijas laiku, tādejādi ir neiespējami sameklēt pacientu, kuram, iespējams, bijusi MH manifestācija. Tātad pašlaik zināmā letalitāte valstī no MH ir 100% (pēc LARA datiem) vai 66.7% (ņemot vērā neprecizēto gadījumu no mūsu iegūtajiem datiem). Nepietiekošā diagnostika šobrīd pakļauj potenciālam riskam pacientus, kuriem tiek veikta operācija, kā arī medicīnas personālu nevajadzīgam stresam, īpaši tādēļ, ka vienīgais specifiskais medikaments dantrolēns nav pieejams nepieciešamajā apjomā. Latvijas anesteziologi ir informēti par slimības izpausmēm un nepieciešamo ārstēšanu, un mūsu uzdevums bija izveidot sistēmu, lai varētu veikt kvalitatīvu diagnostiku un pilnvērtīgu ārstēšanu pacientiem ar MH klīniskām izpausmēm.

DARBA MĒRĶIS

Darba mērķis bija apzināt Latvijā notikušos iespējamus MH gadījumus un veikt to analīzi un ar pacientu piekrišanu veikt nepieciešamos izmeklējumus, kas apstiprinātu vai noliegtu malignās hipertermijas diagnozi šiem pacientiem. Iepriekš nekonstatētas mutācijas *RYRI* gēnā atklāšanas gadījumā veikt visus nepieciešamos izmeklējumus, kas nepieciešami, lai pierādītu, ka šī mutācija var būt MH cēlonis. Darba rezultātā nodrošināt MH diagnostikas un konsultācijas iespējas Latvijā, kā arī izveidot sistēmu nepieciešamās ārstēšanas saņemšanai pacientiem ar malignās hipertermijas diagnozi.

Darba uzdevumi:

1. Apkopot informāciju par iespējamiem malignās hipertermijas gadījumiem Latvijā
2. Ievākt anamnēzi no MH iespējamiem pacientiem un to ģimenes locekļiem
3. Pacientiem un piederīgajiem ar iespējamiem MH simptomiem veikt muskuļu funkcionālo un molekulāro diagnostiku:
 - a) Veikt *In vitro* kontrakcijas testu (IVCT)
 - b) Veikt *RYRI* gēna mutācijas analīzi
4. Nodrošināt medicīnisko un organizatorisko atbalstu indivīdiem ar Malignās hipertermijas manifestācijas risku saņemot medicīnisko aprūpi.
5. Nodrošināt MH pacientu efektīvu ārstēšanu slimības izpausmes gadījumā:
 - a) Adaptēt MH ārstēšanas vadlīnijas Latvijas apstākļiem
 - b) Panākt vienīgā specifiskā medikamenta Dantrolēna pieejamību Latvijā

I LITERATŪRAS APSKATS

1. Anestezioloģija kā medicīnas nozare

Anestezioloģija ir samērā jauna medicīnas nozare par kuras dzimšanas dienu tiek uzskatīts 1846. gada 16. oktobris, kad Viljams Mortons Masačūsetas slimnīcā (ASV) sekmīgi demonstrēja ētera narkozi. Pēc tam sākās strauja anestēzijas izplatība pasaulē, ieviesa arvien jaunas anestēzijas metodes, kas pavēra jaunas iespējas ķirurģijas attīstībai. Vēlāk 20. gadsimta vidū tika atklāti un ieviesti klīniskajā praksē muskuļu relaksanti, kas vēl vairāk paplašināja anestēzijas un ķirurģijas iespējas. Jaunās iespējas diemžēl radīja arī jaunus riskus un apdraudējumus pacienta dzīvībai un veselībai. Šai laikā arī radās anesteziologa specialitāte.

Anestezioloģijas, kā zinātnes, galvenais uzdevums ir pētīt tos patofizioloģiskos un bioķīmiskos procesus, kas organismā noris pēc ķirurģiskas traumas un tās laikā, kā arī izstrādāt efektīvus pasākumus šo noviržu profilaksei un intensīvai terapijai. Tātad organisms jāpasargā no sāpju sajūtas negatīvās ietekmes operācijas laikā, kā arī tuvākajā pēcoperācijas posmā. Vārds anestēzija cēlies no grieķu valodas (*anaesthesia* – nejutīgums), tāpat kā narkoze (*narkosis* – sastingums) (Vanags *et al.*, 2008). Anestēzija tiek izmantota, lai pacientam ķirurģiskas iejaukšanās vai sāpīgu un nepatīkamu procedūru laikā nodrošinātu atsāpināšanu un dzīvībai svarīgo funkciju uzturēšanu, kā arī nodrošinātu pacientam maksimālu komfortu šo manipulāciju laikā un atsāpināšanu pēc tuvākajā pēcoperācijas periodā.

Anesteziologa galvenie uzdevumi ir:

- pirmsoperācijas periodā atpazīt iespējamus ar operāciju un anestēziju saistītos riskus, tos novērst vai mazināt,
- sāpju sindroma ārstēšana operācijas laikā un pēcoperācijas periodā,
- anestēzijas un operācijas laikā novērot pacienta stāvokli, agrīni konstatēt novirzes no fizioloģiskās normas un savlaicīgi tās novērst,
- nodrošināt dzīvībai svarīgo fizioloģisko funkciju norisi operācijas laikā un pēcoperācijas periodā
- kopīgi ar ķirurgu veikt visus ārstnieciskos pasākumus maksimāli labvēlīga operācijas rezultāta iegūšanai,
- nodrošināt ķirurgam iespējami labus apstākļus operācijas veikšanai.

1.1. Anestēzijas veidi un to pielietojums

Augstāk minēto uzdevumu realizācijai tiek izmantoti dažādi anestēzijas veidi, kurus pēc anestēzijas līdzekļa iedarbības vietas var iedalīt sekojoši:

- Virsmas vai infiltrācijas anestēzija

- Nervu un to pinumu blokāde
- Centrālās neuroaksiālās blokādes
- Vispārējā anestēzija jeb narkoze

Virsmas vai infiltrācijas anestēziju – ar vietējās anestēzijas līdzekļiem iedarbojoties uz perifēriskās nervu sistēmas receptoriem gļotādā vai zemādā, panākot to nejutīgumu. Šādu anestēziju izmanto nelielām operācijām, kur patoloģija atrodas ādā, zemādā vai seklākajos zemādas audos.

Nervu un to pinumu blokāde – ievadot vietējās anestēzijas līdzekļus nervu un to pinumu tiešā tuvumā tiek panākta sāpju impulsu pārvades blokāde pa tiem. Pamatā izmanto operācijās, kuras tiek veiktas uz ekstremitātēm, arī citur ķermenī, kur ir samērā viegla un droša piekļuve attiecīgo reģionu inervējošiem nerviem un to pinumiem. Svarīga ir arī operācijas tehnika, kas reizēm prasa pacienta līdzdalību operācijas procesā.

Centrālās neuroaksiālās blokādes – ar vietējās anestēzijas līdzekļiem bloķējot sāpju impulsu pārvadi jušanas saknītēs muguras smadzeņu epidurālā vai subarahnoidālā telpā. Šo anestēzijas tehniku parasti izmanto operējot apakšējās ekstremitātes un slimības, kas lokalizētas vēdera lejasdaļā. Ļoti plaši izmanto arī atsāpināšanai dzemdību laikā un pēcoperācijas periodā pēc lielām un sāpīgām operācijām kājās, vēderā vai krūšu kurvī.

Vispārējā anestēzija jeb narkoze – ievadot narkotiskas vai anestētiskas vielas sāpju sajūtas pārvade tiek pārtraukta dažādu centru un lokalizāciju līmenī. Anestēzijas vielas tiek ievadītas organismā intravenozi, inhalācijas veidā, intramuskulāri, perorāli vai *per rectum*. Tās, nonākot asinīs, šķērso hematoencefālisko barjeru un iedarbojas uz galvas smadzenēm.

Vispārējā anestēzija izpaužas ar dziļu atgriezenisku centrālās nervu sistēmas (CNS) nomākumu, kura laikā ir izslēgta sāpju sajūta, visi citi jušanas veidi un pacients ir bezsamaņā.

Vispārējo anestēziju jeb narkozi pēc anestēzijas līdzekļu ievades veida organismā iedala sekojošos veidos:

- Inhalācijas anestēzija
- Totāla intravenoza anestēzija (TIVA)
- Kombinētā anestēzija

Inhalācijas anestēzija – anestēzijas līdzekļi gāzes vai tvaiku veidā caur elpceļiem nonāk plaušās un, šķērsojot alveolāri kapilāro membrānu, nonāk asinīs. Šai gadījumā svarīga ir gaistošā anestēzijas līdzekļa spēja nodrošināt pietiekošu analgēziju un sedāciju. Metodes pielietojamību ierobežo tas, ka lielai daļai gaistošo anestēzijas līdzekļu ir nepatīkama specifiska smaka un daļa no tiem kairina elpceļus. Tāpat nopietns pretarguments šīs metodes pielietošanai ir apgrūtināta hermētisma nodrošināšana ievadanestēzijas laikā ar sejas masku, pakļaujot operāciju zāles personāla veselību nevajadzīgam riskam un mazinot darbaspējas.

Totāla intravenoza anestēzija – medikamenti, kas iedarbojas uz CNS tiek ievadīti intravenozi. Medikamenti- miega līdzekļi (visbiežāk propofols) un narkotiskie analgētiķi (visbiežāk remifentanils) tiek ievadīti pastāvīgas infūzijas veidā ar ievades ātrumu regulējošas ierīces palīdzību. Ievadāmie medikamenti ir ar ļoti īsu pusizvades laiku, kas ļauj teicami vadīt anestēziju operācijas laikā. Ievades ātrums parasti tiek aprēķināts pēc pacienta ķermeņa svara, jaunākajos perfuzoros tiek papildus ieprogrammēti arī pacienta augums un vecums, lai modelējot atbilstošā medikamenta farmakokinētiku prognozētu medikamenta efektīvo koncentrāciju smadzenēs vai plazmā un atbilstoši tai pielāgotu medikamentu ievades ātrumu.

Kombinētā anestēzija – šai gadījumā izmanto gan inhalācijas, gan neinhālācijas anestēzijas līdzekļus tos dažādos veidos kombinējot. Šis vispārējās anestēzijas veids praksē tiek izmantots visbiežāk.

1.2. Anestēzijā izmantojamie medikamenti

1.2.1. Miega līdzekļi

Anestēzijā izmantojamiem miega līdzekļiem jāizraisa ātrs efekts, tam jābūt prognozējamam un īslaicīgam. Svarīgi, lai miega līdzekļa darbība neturpinātos ilgstoši pēc anestēzijas beigām un neradītu elpošanas nomākumu. Svarīgi, lai pēc medikamenta darbības beigām pacients ātri atgrieztos, spētu nodrošināt visas dzīvības funkcijas un spētu sevi aprūpēt, ja to atļauj veiktās operācijas apjoms. Miega līdzekļiem jābūt ar minimālu alergēnu efektu un nedrīkst veicināt histamīna izsviedi, tas nedrīkst būt toksisks kādai orgānu sistēmai un ar pietiekoši drošu terapeitisko indeksu. Plašāk izmantotie miega līdzekļi ir:

- Barbiturāti- izraisa sedatīvu un miega efektu nomācot retikulārās formācijas aktivitāti. Tie iedarbojas uz GABA A receptoriem izraisot postsinaptisko neironu membrānu hiperpolarizāciju un inhibīciju, nomāc neiromediatora acetilholīna izsviedi, iedarbojas tieši uz GABA A receptoriem, glutamāta, adenozīna un N-acetilholīnerģiskajiem receptoriem. Barbiturāti ātri izplatās audos, tiem piemīt augsta šķīdība lipīdos, kas nosaka to ātro iedarbību. Barbiturātus noārda aknas, veidojot ūdenī šķīstošus metabolītus, kurus izvada caur nierēm. Nopietnas aknu mazspējas gadījumā jāpārēvējas ar barbiturātu ilgstošu iedarbību.
- Propofols ir viens no jaunākajiem anestēzijas līdzekļiem, kas raksturojas ar ātru miegu izraisošu iedarbību un ātru pamošanos, atgūstot adekvātas psihomimētiskās īpašības un spēju orientēties. Tam ir prognozējams darbības ilgums un tā metabolītiem nepiemīt farmakoloģiska aktivitāte, ir stabils un neizraisa histamīna izsviedi. Propofols pieder alkilfenolu grupai, tā darbības mehānisms nav pilnībā noskaidrots, bet

uzskata, ka tas darbojas uz GABA A receptoriem, izraisot to hiperpolarizāciju. Propofolam piemīt arī antiemētiska darbība, kas ir svarīgi pēcoperācijas slīktās dūšas un vemšanas (PONV *angl. Postoperative nausea and vomiting*) profilaksei, tāpat tas samazina pēcoperācijas drebuļu iespējamību. Pašlaik propofols tiek ļoti plaši izmantots ievadanestēzijas, totālas intravenozas anestēzijas (TIVA) un pacientu sedācijas intensīvās terapijas nodaļā (ITN) gadījumā.

- Etomidāts ir imidazolu saturoša viela, kas nomāc retikulāro formāciju un tieši iedarbojas uz GABA A receptoriem, palielinot to afinitāti pret GABA. Etomidāts minimāli ietekmē kardiovaskulāro sistēmu, kādēļ to uzskata par izvēles medikamentu ievadanestēzijai kardiāliem pacientiem. Etomidāts tomēr samazina sistēmisko vaskulāro rezistenci un var izraisīt hipotensiju. Iedarbojoties uz talamokortikālo traktu un izjaucot līdzsvaru starp ierosinošiem un nomācošiem efektiem CNS, izraisa miokloniskas kustības, kas līdzinās krampjiem. Tāpat etomidāts var izraisīt epilepsijas veida aktivitāti elektroencefalogrammā (EEG), kādēļ no etomidāta izmantošanas jāizvairās pacientiem ar epilepsiju
- Ketamīns ir ūdenī šķīstošs fenciklidīna atvasinājums, kurš izraisa disociējošo anestēziju- kataleptisku stāvokli, kura laikā slimnieka acis var būt atvērtas, ar nelielu nistagmu, bet viņš nav komunikabls. Ketamīnam piemīt lieliskas analgētiskas īpašības. Ketamīns antagonizē N-metil-D-aspartāta (NMDA) receptorus un iedarbojas uz mī, delta un kapa opioīdu receptoriem un tam ir vāja ietekme uz GABA A receptoriem. Ketamīns ir izvēles medikaments pacientiem ar nestabilu hemodinamiku vai šoka stāvoklī, jo tas izraisa centrālu simpātisku stimulāciju, inhibējot noradrenalīna reabsorbciju presinaptiskajā daļā palielinot sistolisko asinsspiedienu un sirdsdarbības frekvenci. Ketamīns var izraisīt nepatīkamus, murgainus sapņus, tādēļ to rekomendē kombinēt ar benzodiazepīniem.

1.2.2. Narkotiskie analgētiķi

Narkotiskie analgētiķi sāpju impulsu uztveri un pārvadi CNS, tie izmaina sāpju uztveri un nomāc veģetatīvo reakciju uz sāpēm. Narkotisko analgētiķu darbības pamatmehānismi izpaužas ar:

- Traucētu sāpju impulsu uztveri un pārvadi no I neirona aksona, kura ķermenis atrodas spinālajā ganglijā uz II neironu, kurš atrodas muguras smadzeņu sānu ragu receklainajā vielā (*substantia gelatinosa*).
- Nomāc zemsliedzīgu impulsu summēšanos talamus

- Samazina miencefalon, hipotalama un limbiskās sistēmas atbildes reakciju uz sāpju kairinājumu
- Rada eiforiju un mazina emocionālo un mentālo reakciju uz sāpju kairinājumu.

Smadzenēs esošos opiātu receptorus iedala:

- Mī- opiātu receptori, ar kuriem saistās bēta- endorfīni, izraisa supraspinālu analgēziju, eiforiju, atkarību, elpošanas centra nomākumu un bradikardiju
- Kappa-opiātu receptori, kurus uzbudina dinorfīns, izraisa spinālu analgēziju, sedāciju un miozi
- Delta- opiātu receptori, kurus uzbudina enkefalīni, izraisa analgēziju.

Narkotisko analgētiķu iedalījums:

- Mī un kapa opiātu receptoru agonisti:
 - Piperidīna derivāti:
 - Morfijs
 - Kodeīns (apmēram 5 – 7 reizes vājāks analgētiķis, kā morfijs)
 - Etilmorfīns
 - Fenilefrīna derivāti:
 - Promedols (apmēram 3 – 4 reizes vājāks analgētiķis, kā morfijs)
 - Fentanils (apmēram 100 – 400 reizes spēcīgāks analgētiķis, kā morfijs)
 - Difenilmetāna derivāti:
 - Piritramīds (dipidolor) – līdzīgs morfijam
 - Tramadol
- Agonisti- antagonisti:
 - Mī opiātu receptoru agonists un kapa opiātu receptoru antagonists- buprenorfīns ir apmēram 25 – 30 reizes spēcīgāks par morfiju
 - Kapa opiātu receptoru agonists un mī opātu receptoru antagonists- pentazocīns ir 2 – 3 reizes vājāks kā morfijs un butarfonols ir līdzīgi stiprs kā morfijs.

Narkotiskie analgētiķi ļoti ātri remdē akūtas sāpes, nereti lietderīgs ir arī eiforiju radošais efekts, īpaši onkoloģisku sāpju gadījumā. Lietojot narkotiskos analgētiskos līdzekļus akūtu sāpju gadījumā parasti atkarība neveidojas.

Agonisti- antagonisti daudz mazākā mērā un retāk izraisa atkarību.

Ir sintezēts arī pilnīgs mī un kapa opiātu receptoru antagonists- naloksons, kas tiek izmantots, lai pārtrauktu nevēlamu narkotisko līdzekļu darbību.

1.2.3. Muskuļu relaksanti

Pacienta intubācijai, elpošanas nodrošināšanai un veiksmīgai oprācijas norisei bieži nepieciešams izmantot miorelaksantus- medikamentus, kas nodrošina skeleta šķērsvītrotās muskulatūras atslābumu. Tie ir perifēriskas darbības N-holīnblokatori, kuru iedarbības vieta ir neiromuskulārā sinapse. Izšķir divu veidu miorelaksantus:

- Depolarizējošie miorelaksanti
- Nedepolarizējošie miorelaksanti

Depolarizējošie miorelaksanti, tāpat kā acetilholīns, rada neiromuskulārās sinapses motoriskās plātnītes holīnreceptoru depolarizāciju, kas izraisa muskuļu kontrakciju-fibrilāciju. Depolarizējošie miorelaksanti saistās ar receptoru uz ilgāku laiku kā acetilholīns, izraisot ilgstošu depolarizāciju, kam seko paraboliska reakcija- atslābums. Depolarizējošo miorelaksantu iedarbība parasti nav ilgstoša- tikai 4 līdz 6 minūtes. Pašlaik klīniskajā praksē izmanto tikai vienu depolarizējošo miorelaksantu- sukcinilholīnu. Tā izraisītās blaknes ir hiperkaliēmija, kas var izraisīt bradikardiju vai pat sirds apstāšanos, sākotnējās kontrakcijas izraisītās muskuļu sāpes, krampji, pacientiem ar muskuļu distrofiju, malignā hipertermija.

Nedepolarizējošie miorelaksanti bloķē acetilholīna nokļūšani neiromuskulārās sinapses holīnreceptoros. Tie saistās ar receptoru, bet neizraisa tā depolarizāciju, rezultātā nenotiek muskuļšķiedras saraušanās. Šo preparātu iedarbība ir lēnāka un darbību var antagonizēt specifiski antagonisti vai holīnesterāzes inhibitori. Blokādes rezultātā muskuļa šķiedra nespēj sarauties vai, nepilnas blokādes gadījumā, saraujas ar mazāku spēku un atkārtota kairinājuma rezultātā atbildes reakcija kļūst vājāka.

1.2.4. Gaistošie anestēzijas līdzekļi

Inhalācijas un kombinētajā anestēzijā izmanto gaistošos anestēzijas līdzekļus. Tie iedarbojas uz CNS, kavējot signāla pārvadi dažādos līmeņos- pārtrauc normālu signāla pārvadi sinapsēs kavējot neurotransmiteru izdali no presinaptiskā termināla, pastiprinot neurotransmiteru reabsorbciju un kavējot to saistīšanos ar postsinaptiskajiem receptoriem. Šūnu līmenī anestēzijas līdzekļi kavē jonu plūsmu caur kanāliem šūnas membrānā, kavējot uzbudinājuma pārvadi neironos. Tie iedarbojas gan presinaptiskā, gan postsinaptiskā līmenī.

Šobrīd vēl nav precīzi zināms gaistošo anestēzijas līdzekļu darbības mehānisms, bet ir zināmi vairāki veidi, kā iedarbojas gaistošie anestēzijas līdzekļi. Viens no iespējamajiem iedarbības veidiem ir tieša ietekme uz neironu membrānu, kā arī iespējama sekundāro mediatoru produkcija. Saistība starp šķīdību taukos un anestēzijas līdzekļa darbības potenciālu liecina, ka tie darbojas hidrofobā veidā un spēj saistīties neironu membrānas lipīdu un olbaltumu slāni.

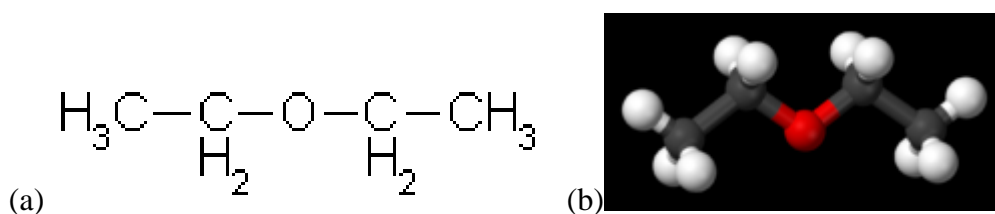
Meijera-Overtona (Meyer-Overton) teorija apraksta korelāciju starp inhalācijas vielas šķīdību taukos un minimālo alveolāro koncentrāciju (MAC). Uzskata, ka anestēzija iestājas brīdī, kad šūnas membrānas lipīdu slānī ir izšķīdis nepieciešamais daudzums anestēzijas līdzekļa molekulu. Šī teorija uzskata, ka svarīgs ir šūnas membrānā izšķīdušo molekulu skaits, to papildināja Mullins ar kritiskā tilpuma hipotēzi. Viņš uzskata, ka anestēzijas līdzekļa molekulu uzsūkšanās izpleš hidrofobo zonu šūnas membrānā, deformējot nātrija jonu plūsmas kanālus un kavējot darbības potenciāla rašanos, kas nepieciešams signāla pārvadei sinapsē. Olbaltumu receptoru hipotēze uzskata, ka CNS lokalizēti receptori ir atbildīgi par inhalācijas anestēzijas līdzekļu darbību (Griffits&Norman, 1993). Šī teorija balstās uz efekta atkarību no devas. Tomēr nav skaidrs vai anestēzijas vielas pārtrauc jonu plūsmu caur membrānu tieši saistoties ar receptoriem jonu kanālos šūnas membrānā vai netiešā veidā ar sekundāru mediatoru starpniecību, kur liela nozīme ir proteīnkināzei C.

Vēl viena teorija apraksta gaistošo anestēzijas līdzekļu ietekmi uz gamma aminosviestskābes (GABA- angl. *Gamma-Aminobutyric acid*) receptoriem. Gaistošie anestēzijas līdzekļi spēj aktivizēt GABA kanālus un hiperpolarizēt šūnu membrānu. Turklāt tie spēj inhibēt atsevišķus kalcija jonu kanālus, kavējot mediatoru izdali un bloķēt glutamāta kanālus. Šādi gaistošie anestēzijas līdzekļi darbojas tāpat kā citi sedatīvie, miega un analgēzijas līdzekļi.

Minētās teorijas apraksta vienu noteiktu anestēzijas līdzekļu darbības veidu. Katra teorija fokusējas tikai vienā virzienā, tomēr patiesā gaistošo anestēzijas līdzekļu darbība var sastāvēt no vairāku darbības veidu kombinācijas. Ideāls gaistošais anestēzijas līdzeklis būtu bez smakas, kuru būtu patīkami ieelpot, nodrošinātu ātru un patīkamu iemigšanu, stabilu anestēziju operācijas laikā un ātru un patīkamu atmošanos. Tas neiespaidotu citas orgānu sistēmas, varētu pielietot visa vecuma pacientiem, tai skaitā grūtniecēm. Ideālais inhalācijas anestēzijas līdzeklis nemetabolizētos organismā, būtu stabils, nereaģētu ar medicīnisko aprīkojumu (metālu, plastmasām, gumiju) un adsorbentu, nebūtu kaitīgs operāciju zāles personālam, nebūtu degošs, būtu viegli sintezējams un lēts.

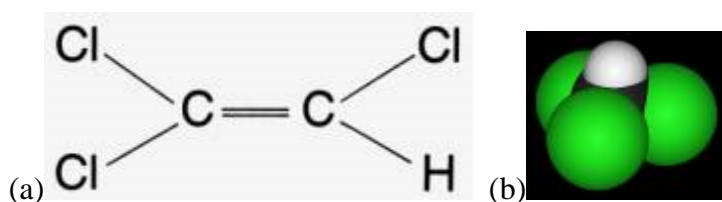
Diemžēl vēl pagaidām nav pieejams anestēzijas līdzeklis, kas atbilstu visām šīm prasībām, tāpēc aplūkosim līdz šim plašāk lietotos gaistošos anestēzijas līdzekļus.

Senākais gaistošais anestēzijas līdzeklis ir dietilēteris ($C_4H_{10}O$). Tā iedarbības demonstrācija, ko veica Viljams Tomass Grīns Mortons 1846. gada 30. septembrī tiek uzskatīta par anestezioloģijas dzimšanas dienu. Dietilēteri jau vairākus gadu desmitus anestezioloģijā neizmanto.



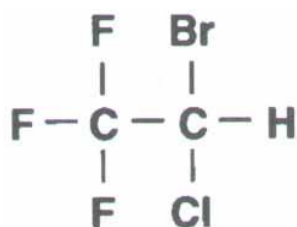
1.1. att. Dietilētera molekulas ķīmiskā formula (a) un telpiskā uzbūve (b)

Drīzumā atklāja, ka arī hloroforms (CHCl_3) ir izmantojams vispārējai anestēzijai. To pirmo reizi izmantoja medicīnā 1847. gadā un turpmāk daudzus gadu desmitus tas ļoti plaši tika izmantots medicīnā. Tomēr šo anestēzijas līdzekļu izmantošana bija saistīta ar lielu komplikāciju risku. Hloroformam īpaši raksturīga blakne bija bīstami sirds darbības ritma traucējumi. Tam raksturīga arī hepatotoksicitāte un nefrotoksicitāte. Tā lietošana medicīnā ir pārtraukta.



1.2. att. Hloroforma molekulas ķīmiskā formula (a) un telpiskā uzbūve (b)

Halotāns ($\text{C}_2\text{HBrClF}_3$) tika sintezēts 1951. gadā un pirmo reizi klīniskajā praksē to izmantoja 1956. gadā. Halotāns ātri kļuva populārs, jo salīdzinot ar iepriekšējiem gaistošajiem anestēzijas līdzekļiem nebija sprādzienbīstams. Ļoti plaši tika izmantots līdz pagājušā gadsimta astoņdesmitajiem, deviņdesmitajiem gadiem, kad to sāka aizvietot ar jaunākiem un mazāk toksiskiem anestēzijas līdzekļiem. Galvenās halotāna nevēlamās ietekmes bija spēja izraisīt hepatītu. Līdz 20% no ieelpotā halotāna metabolizējas aknās. Kā aknu metabolisma starpprodukts ir trifluoracetskābe, kas ir hepatotoksiska. Atkārtotas halotāna anestēzijas lietošanas gadījumā paaugstinājās halotāna hepatīta risks, kam bija augsta letalitāte - no 30 līdz 70%. Halotānam ir samērā izteikta kardiodepresīva ietekme, kādēļ to neiesaka izmantot pacientiem ar sirds mazspēju, tāpat tas sensibilizē miokardu pret kateholamīniem, radot augstu aritmiju risku to lietošanas gadījumā. Halotāns ir arī spēcīgākais MH provcējošais gaistošais anestēzijas līdzeklis. Pēdējos gados tā izmantošana medicīnā ievērojami samazinājusies, to izmanto tikai trūcīgās valstīs tā zemo izmaksu dēļ.



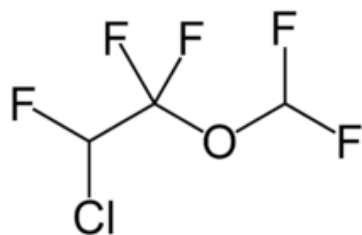
(a) **Halothane**



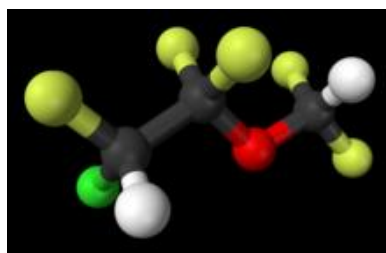
(b)

1.3. att. Halotāna molekulas ķīmiskā formula (a) un telpiskā uzbūve (b)

Enflurāns ($\text{C}_3\text{H}_2\text{ClF}_5\text{O}$) tika atklāts 1963.gadā un pirmo reizi izmantots klīniskajā praksē 1966.gadā. Tas tika plaši izmantots divdesmitā gadsimta septiņdesmitajos un astoņdesmitajos gados. Tam bija nepatīkams aromāts, samērā lēna iedarbība un ilgstoša atmošanās. Tas arī nomāca miokarda kontraktilitāti, pazemināja krampju sliekšni un provocēja MH. Enflurāns mazināja dzemdes tonusu grūtniecēm, sadaloties tam veidojās nefrotoksiski metabolīti, kuri spēja izraisīt nieru mazspēju. 2 līdz 5% metabolizējās aknās, kas varēja provocēt aknu bojājumu. Iepriekš minēto blakus efektu dēļ enflurāna izmantošana klīniskajā praksē bija samērā īslaicīga.



(a)

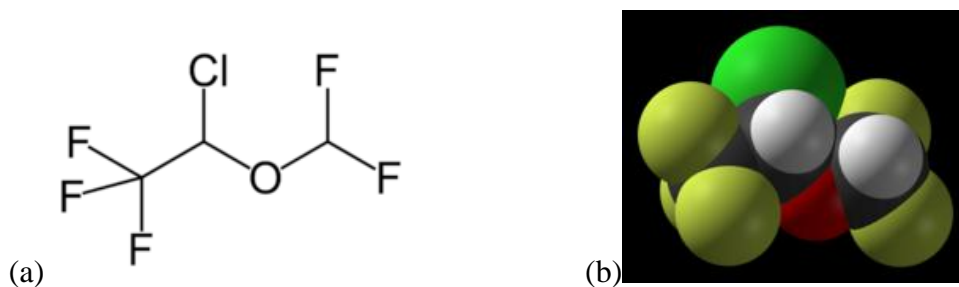


(b)

1.4. att. Enflurāna molekulas ķīmiskā formula (a) un telpiskā uzbūve (b)

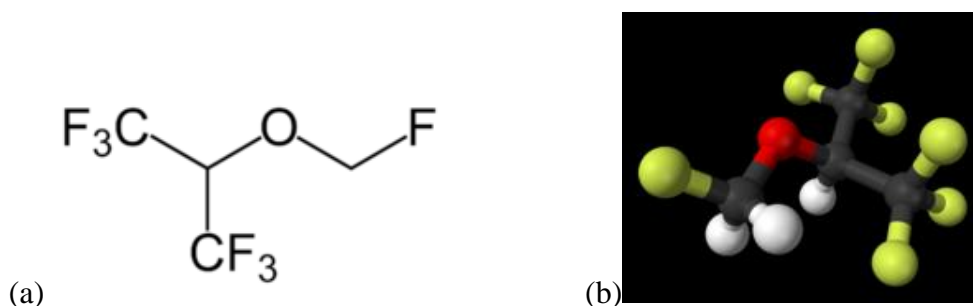
Izoflurāns ($\text{C}_3\text{H}_2\text{ClF}_5\text{O}$) iedarbojas ātrāk kā halotāns, tam ir minimāls metabolisms aknās, bet ir asa un nepatīkama smaka un tas var kairināt elpceļus. Izoflurānu, atšķirībā no halotāna nevar izmantot ievadanestēzijā. Ievadanestēzijai vienmēr jāizmanto kāds cits medikaments, piemēram, propofols vai tiopentāl-nātrijs. Izoflurāns ir spēcīgs analgētiķis un tam piemīt muskulatūru relaksējošas īpašības. Izoflurāna darbības mehānisms ir vairāk izpētīts, bet vēl joprojām nav pilnīgi skaidrs. Tas saistās ar GABA, glutamīna un glicīna receptoriem un kavē kālija kanālu aktivāciju. Glicīna receptoru bloķēšana nodrošina miorelaksējošo darbību.

Tomēr tas var izraisīt nervu šūnu apoptozi un vēlīni radīt apziņas traucējumus (Xie *et al.*, 2007). Fodale saista izoflurānu ar Alcheimera slimības attīstību veicinot amiloīda beta peptīda oligomerizāciju (Fodale *et al.*, 2010).



1.5. att. Izoflurāna molekulas ķīmiskā formula (a) un telpiskā uzbūve (b)

Sevoflurāns ($C_4H_3F_7O$) ir nedegošs gaistošais anestēzijas līdzeklis ar saldenu smaržu, kurš sintezēts 1971.gadā un klīniski sāka izmantot 1990.gadā. To var izmantot gan ievadanestēzijai, gan narkozes uzturēšanai. Klīniskajā praksē sevoflurāns šobrīd aizstāj halotānu un izoflurānu. Pašlaik pēc desflurāna tas ir otrs ātrākās darbības gaistošais anestēzijas līdzeklis (Sakai *et al.*, 2005). Šobrīd sevoflurāns tiek uzskatīts par piemērotāko anestēzijas līdzekli maskas indukcijai, jo tam ir ātra iedarbība, patīkama smarža un tas nekairina elpceļus. Sevoflurāns anestēzijas iekārtā, reaģējot ar sausu kalcija hidroksīdu saturošu adsorbentu var veidot savienojumu Compound A, kas ir nefrotoksisks (Stabernack *et al.*, 2003). Šī iemesla dēļ dažās valstīs ir noteikta minimālā svaigās gāzes plūsma 2 L/min, kas sadārdzina sevoflurāna pielietošanu. Viena no blaknēm ir uzbudinājums bērniem atmostoties no sevoflurāna anestēzijas, ko saista ar ļoti straujo anestēzijas ietekmes izbeigšanos un anestēzijas beigu posmā rekomendē ievadīt midazolāmu, lai padarītu bērna atmošanās procesu pakāpeniskāku.

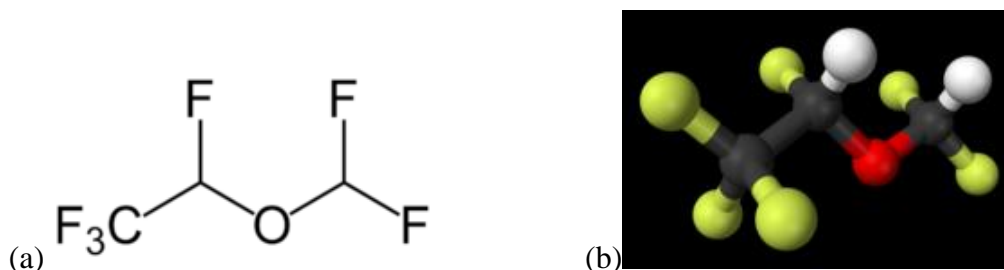


1.6. att. Sevoflurāna molekulas ķīmiskā formula (a) un telpiskā uzbūve (b)

Desflurāns ($C_3H_2F_6O$) ir ar visātrāko iedarbību no šobrīd zināmajiem gaistošajiem anestēzijas līdzekļiem. To nodrošina zemā šķīdība asinās. Desflurāna vājākās vietas ir salīdzinoši vājākās anestētiķa īpašības, kodīgums un dārdzība. Tas spēj provocēt tahikardiju

un elpceļu kairinājumu, ja lieto koncentrācijās, kas pārsniedz 10 vol%. Šo iemeslu dēļ desflurānu praktiski neizmanto inhalācijas ievadanestēzijai.

Neskatoties uz labām iztvaikošanas spējām, istabas temperatūrā tas ir šķidrā agregātstāvoklī, tādēļ anestēzijas iekārtas jāaprīko ar speciāliem apsildāmiem iztvaikotājiem, lai nodrošinātu pastāvīgu tvaiku spiedienu. Desflurāns tāpat kā enflurāns un izoflurāns reaģē adsorbentā ar oglekļa dioksīdu, radot toksisko oglekļa monoksīdu.



1.7. att. Desflurāna molekulas ķīmiskā formula (a) un telpiskā uzbūve (b)

1.3. Anestēzijas ietekme uz pacienta organismu un iespējamās komplikācijas

Jebkura medicīniska iejaukšanās pacienta dzīvības norisēs saistīta ar komplikāciju iespējamību. Neskatoties uz arvien labāko aprīkojumu anestēzijas nodrošināšanai un pacienta stāvokļa monitorēšanai ar vispārējo anestēziju saistīto komplikāciju risks joprojām ir augsts. Jebkurš anestēzijas veids ir saistīts ar komplikāciju risku, tāpēc ir svarīga pacienta informēšana par izvēlēta anestēzijas veida priekšrocībām un riskiem. Komplikāciju cēloņi un smagums ir dažāds.

Vispārējā anestēzija kā pacienta nāves cēlonis pēc Lielbritānijas anesteziologu asociācijas pētījuma datiem varētu būt 1 no 10 000 līdz 1 no 200 000 operācijām, bet anestēzijas komplikācijas nereti ir grūti atdalīt no ķirurģiskajām komplikācijām, tādēļ pacienta nāves cēlonis tikai anestēzijas dēļ ir apmēram 0.0007% (Aitkenhead, 2005).

Komplikācijas var izraisīt dažādi faktori:

- Pacienta anatomiskās īpatnības, kas var apgrūtināt vai padarīt neiespējamu kādu no anestēzijas veidiem vai etapiem
 - Intubāciju vai ventilāciju ar masku var traucēt sejas un žokļu attīstības anomālijas, sejas traumas, miega apnojas sindroms, kakla kustību traucējumi, adipozitāte, apakšžokļa locītavas kustību ierobežojums un veidojumi vai infekcija mutes dobumā.
 - Neuroaksiālo anestēziju apgrūtina mugurkaula deformācija, mugurkaula traumas un infekcijas sekas, mugurkaula attīstības traucējumi.

- Vadu anestēziju iespaido nervu gaitas un lokalizācijas atšķirības dažādiem pacientiem.
- Pacientu individuāla medikamentu nepanesība, alerģijas
- Atbilstoša aprīkojuma pieejamība
- Anesteziologa profesionālā sagatavotība
- Iedzimtas slimības, piemēram, malignā hipertermija, holīnesterāzes deficīts.

Katram anestēzijas veidam ir tikai tam raksturīgas komplikācijas, kuras jāņem vērā izvēloties pacientam labāko risinājumu.

1.3.1. Vispārējās anestēzijas būtiskākās komplikācijas:

- Sāpes
- Pēcoperācijas slikta dūša un vemšana (PONV)
- Zobu bojājums
- Aizsmakums un balsenes bojājumi
- Anafilaktiska reakcija
- Kardiovaskulāras komplikācijas
- Elpošanas nomākums
- Elpošanas mazspēja
- Aspirācijas pneimonija
- Hipotermija
- Smadzeņu hipoksisks bojājums
- Nervu bojājums
- Nomods anestēzijas laikā
- Trombemboliskas komplikācijas
- Muguras sāpes
- Galvassāpes
- Malignā hipertermija
- Jatrogēns pneimotorakss
- Nāve

1.3.2. Reģionālās anestēzijas būtiskākās komplikācijas:

Reģionālās anestēzijas gadījumā tiek bloķēti aferentie un eferentie nervi ievadot lokālās anestēzijas līdzekli muguras smadzeņu tuvumā. Tiek bloķēti gan motorie, gan sensorie nervi un autonomā nervu sistēma. Būtiskākās komplikācijas ir:

- Sāpes
- Pēcpunkcijas galvassāpes
- Hipotensija un bradikardija
- Epidurāla vai intratekāla hematoma
- Elpošanas mazspēja
- Tiešs nervu bojājums
- Hipotermija
- Muguras smadzeņu bojājums
- Infekcija
- Aseptisks meningīts
- Muguras smadzeņu hematoma
- Anafilakse
- Urīna retence
- Muguras smadzeņu infarkts

1.3.3. Lokālās anestēzijas būtiskākās komplikācijas

- Sāpes
- Asiņošana un hematoma
- Nerva bojājums
- Infekcija
- Ishēmiska nekroze

Lai nodrošinātu iespējami labu anestēziju ir jāapzinās katra anestēzijas veida priekšrocības un blaknes. Svarīgi, lai anesteziologs zinātu kā mazināt un novērst iespējamās komplikācijas, bet vēl svarīgāk, lai viņš prastu tās ārstēt. Tāpēc ir svarīgi zināt anestēzijas ietekmi uz orgānu sistēmām.

1.4. Komplikāciju iedalījums pēc ietekmes uz atbilstošo orgānu sistēmu:

Respiratorās komplikācijas:

Ar laringoskopiju un intubāciju saistītās komplikācijas
 Elpceļu nosprostojums
 Hipoksēmija
 Hiperkapnija
 Hipokapnija
 Hipoventilācija

Regurgitācija un aspirācija

Kardiovaskulārās komplikācijas:

Hipotensija

Hipertensija

Aritmijas

Neiroloģiskās komplikācijas:

Nomods vispārējās anestēzijas laikā

Aizkavēta atmošanās

Perioperatīva neiropātija

Pēcoperācijas sliktā dūša un vemšana

Temperatūras regulācijas traucējumi:

Hipotermija

Hipertermija

Medikamentu nevēlama darbība vai hipersensitivitāte:

Paradoksāla (pretēja) iedarbība

Izteikts kairinājums vai reakcija medikamenta ievades vietā

Histamīna, serotonīna un citu bioloģiski aktīvo vielu pastiprināta izsviede

Neparedzēti ilga medikamenta iedarbība

Alerģiska reakcija

Anafilakse

Komplikācijas saistītas ar ķermeņa pozīciju operācijas laikā:

Nervu bojājums

Radzenes bojājums

Ausu, deguna nospiedums

Bērnu neiroķirurģisku operāciju gadījumā iespējamās dažādas ar anestēziju saistītas komplikācijas līdz 9,6% gadījumiem (Aleksic *et al.*, 2009). Lai gan kopējais sarežģījumu skaits ir samērā liels, letalitāte dažādu komplikāciju gadījumā nav vienāda. Tā, piemēram, ar anestēziju saistīti nāves gadījumi vērojami 1,12 gadījumos no 10,000 anestēzijām, kur 55,5% gadījumu cēlonis bija respiratoriskas, bet 45,5% medikamentu izraisītas problēmas (Braz *et al.*, 2006). Viena no iespējami fatālām vispārējās anestēzijas komplikācijām ir malignā hipertermija, kur pacienta nāve var iestāties dažu stundu laikā, ja MH netiek diagnosticēta vai atbilstoši ārstēta.

2. Malignā hipertermija

Viena no retām vispārējās anestēzijas komplikācijām ir Malignā hipertermija (Malignant hyperthermia) (MH).

2.1. Malignās hipertermijas atklāšanas vēsture

Maligno hipertermiju pirmo reizi aprakstīja 1960. gadā Denborough un Lovell Austrālijā. (Denbrough&Lovell, 1960). Tomēr jau agrāk literatūrā aprakstīti MH līdzīgi sindromi, piemēram, 1929. gada franču patoloģis aprakstījis bālumu un hipertermiju saistībā ar operāciju un augstu mirstību bērniem. Tā ir iedzimta autosomāli dominanta slimība, kas izpaužas ar hipermetabolisku sindromu un muskulatūras rigiditāti pēc ekspozīcijas ar gaistošām anestēzijas vielām vai īsas darbības muskuļu relaksantu sukcinilholīnu. Sākotnēji mirstība no MH bija aptuveni 70 – 80%, bet uzlabojoties pacientu monitorēšanas un ārstēšanas iespējām tā attīstītajās valstīs samazinājusies līdz 10% astoņdesmitajos gados (McCarthy *et al.*, 2004) un līdz 2 – 3% šobrīd (Halsall *et al.*, 2003).

2.2. Malignās hipertermijas epidemioloģija

Literatūrā sastopami stipri atšķirīgi dati par slimības izplatību. Rianodīna receptora 1 (*RYR1*) un dihidropiridīna receptora alfa-1S subvienības (*CACNA1S*) gēnu mutāciju izplatība populācijā ir no 1:5000 līdz 1: 15000 (Denbrough, 1998; McCarthy, 2004). Cits sastopamības mērījums ir 1: 40 000 līdz 1: 100 000 anestēziju, tāpat slimības norise ir smagāka jauniem cilvēkiem, bet vecākiem pacientiem un zīdaiņiem simptomi ir mazāk izteikti (Benumof&Saidman, 2000).

Latvijā ik gadu tiek veiktas 40 – 60 000 anestēzijas (dati atšķirīgi dažādos avotos), tātad Latvijā jābūt vismaz vienam MH manifestācijas gadījumam katru otro gadu, bet pēc šobrīd pieejamām ziņām tas konstatēts reizi 10 gados. Parasti speciālisti atzīmē, ka MH līdzīgi simptomi sastopami biežāk, tikai tie netiek dokumentēti un pacienti netiek izmeklēti, jo par MH kolēģi sāk domāt tikai tad, ja augsta temperatūra pacientam pieturas ilgāku laiku un nevar atrast citu pārliecinošu iemeslu.

Interesants ir Halsall pētījums, ka aptuveni 50% no MH aizdomīgiem pacientiem, pirms diagnozes uzstādīšanas, saņēmuši anestēziju ar trigervielām, bet slimības simptomi nav manifestējušies (Halsall *et al.*, 1979). Anesteziologu sabiedrībā tiek analizēti un diskutēti tikai letālie gadījumi, bet citu specialitāšu ārsti par šo slimību nav informēti vispār. Šī iemesla dēļ būtu lietderīgi pievērst lielāku uzmanību sīkajai simptomātikai, par ko parādās regulāras publikācijas medicīniskajā literatūrā. (Chen *et al.*, 2007; Bonciu *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2007).

Lielbritānijā katru gadu tiek ziņots par 100 – 200 jauniem gadījumiem, no kuriem aptuveni 50% nevar izslēgt maligno hipertermiju un savukārt 40 – 50% no tiem MH diagnoze tiek apstiprināta (Halsall&Hopkins, 2003).

2.3 Malignās hipertermijas etioloģija

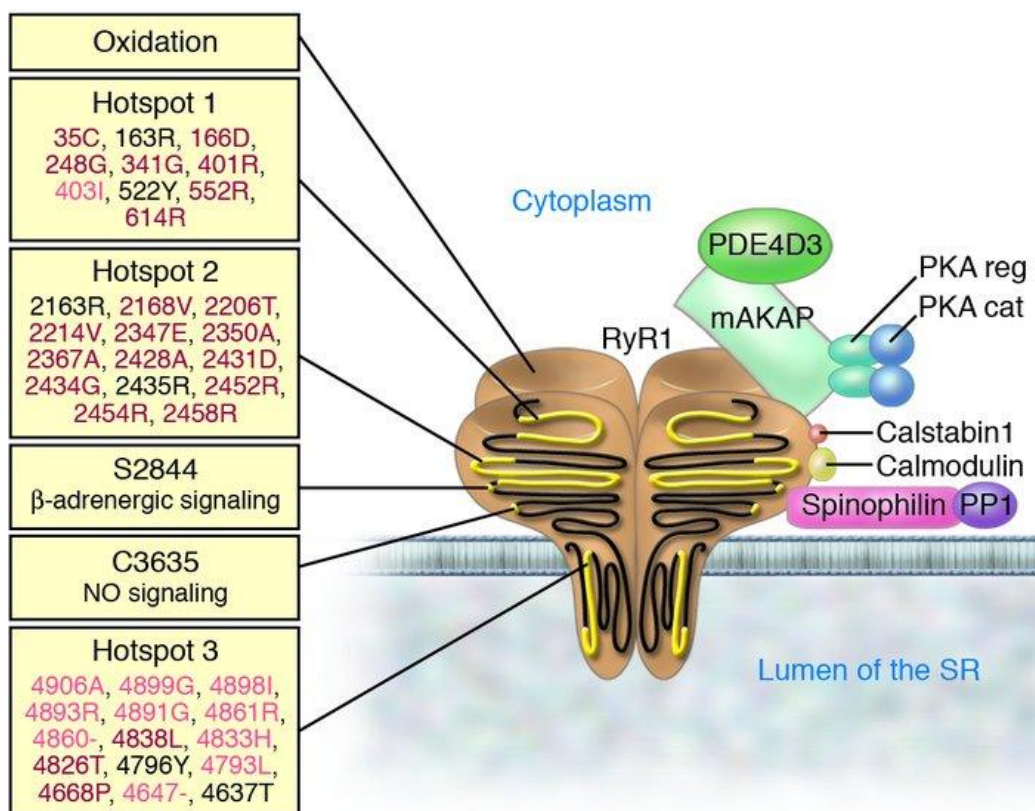
MH ir skeleta muskulatūras slimība, kas izpaužas ar kalcija jonu (Ca^{2+}) homeostāzes traucējumiem muskuļu kontrakcijas laikā pēc ekspozīcijas ar anestēzijas līdzekļiem. Intracelulārās kalcija jonu koncentrācijas pieaugums noved pie MH klīniskajām izpausmēm. Cēlonis ir mutācija rianodīna receptora 1 gēnā- *RYR1*, vienā no lielākajiem cilvēka gēniem, kas lokalizēts 19. hromosomā. Gēna garuma dēļ iespējamas daudzas gēnu mutācijas. Šobrīd ir identificētas vairāk kā 90 mutācijas šai gēnā, bet slimības manifestācijas risks saistīts ar 30 mutācijām (Wehner *et al.*, 2004; www.emhg.org). Ir atrastas arī iespējami bīstamas mutācijas citos gēnos 1., 3., 7. un 17. hromosomā. Tas varētu izskaidrot dažādību klīniskajās izpausmēs un demonstrē kalcija vielmaiņas sarežģītību šūnās. MH visbiežāk kombinējas ar centrālas dabas temperatūras regulācijas traucējumiem, Dišēna/Bekera muskuļu distrofiju, pēkšņas nāves sindromu bērniem, karstuma dūrienu, maligno neuroleptisko sindromu un miopātijām (Wedel, 2000).

2.3.1. Skeleta muskulatūras darbības fizioloģija

Skeleta muskulatūras kontrakciju ierosina muskuļu šūnas membrānas (sarkolemmas) depolarizācija. Sarkolemmas depolarizācija noved pie šķērstiltu veidošanās starp miozīnu un aktīnu un pamata kontraktīlās struktūras – sarkomēra – saīsināšanās, kas pazīstams kā uzbudinājuma-kontrakcijas (E-C – ang. *excitation-contraction*) process. Kalcija jons, kas tiek atbrīvots no intracelulārajiem depo, ir sekundārais ziņnesis, kas saista membrānas depolarizāciju ar muskuļa kontrakciju E-C laikā. Sarkolemmas depolarizācija turpinās pa šķērscaurulītēm (ang. *T-tubules*), kas ir dziļas sarkolemmas invaginācijas, un aktivē sprieguma atkarīgos Cav1.1 Ca^{2+} kanālus, kas arī pazīstami kā L-tipa Ca^{2+} kanāli. Sprieguma ierosinātas Cav1.1 kanāla konformācijas izmaiņas aktivē cieši atrodošos Ca^{2+} atbrīvotāj kanālus, kas pazīstami kā 1. tipa rianodīna receptori (RyR1) un atrodas uz sarkoplazmatiskā tīkla (SR – ang. *sarcoplasmic reticulum*) terminālām cisternām (Tanabe *et al.*, 1990). Ca^{2+} atbrīvošana no SR caur RyR1 kanāliem noved pie ātras citoplazmatiskās Ca^{2+} koncentrācijas paaugstināšanās, kas savienojas ar troponīnu C un līdz ar to veidojas šķērstilti starp aktīna un miozīna molekulām, kas savukārt noved pie aktīna un miozīna molekulu slīdēšanas vienai pret otru un nodrošina sarkomēra saīsināšanos. Rezultāts ir muskuļa kontrakcija un spēks

(Fill&Copello, 2002; Gonzales-Serratos&Valle-Aguilera, 1982; Rios & Brum, 1987; Catterall, 1991).

Prolongēts muskuļu stress, kā, piemēram, maratona skrējiens, vai slimības kā hroniska sirds mazspēja, raksturojas ar hronisku simpātiskās nervu sistēmas (SNS) aktivāciju un traucētu muskuļu funkciju, iespējams sakarā ar traucētu E-C procesu. It īpaši samazinās Ca^{2+} daudzums, kas atbrīvojas no SR katras kontrakcijas laikā, rezultātā var rasties neadekvāta Ca^{2+} atbrīvošana un palēninās Ca^{2+} atpakaļuzņemšana (Reiken *et al.*, 2003; Lunde *et al.*, 2001; Westerblad& Allen, 1991). Šādi novērojumi liek domāt, ka hroniskas SNS aktivācijas kaitīgie efekti uz skeleta muskulatūru iespējams daļēji skaidrojami ar defektiem Ca^{2+} signalizācijā.



2.1. att. **Skeleta muskuļu rianodīna receptors kā stresa mērķis.** Sarkoplazmatiskā tīklā Ca^{2+} atbrīvotājkanāli veido lielu makromolekulāru signālkompleksu, kas sastāv no četriem 565-kDa RyR1 monomēriem un vairākiem enzīmiem, kas ir vērsti uz RyR1 kanāla citoplazmatisko domēnu, tai skaitā kalstabīns 1 (arī pazīstams kā FKBP12), cAMP-atkarīga proteīnkināze (PKA), proteīnu fosfatāze 1 (PP1) un fosfodiesterāze 4D3 (PDE4D3). A-kināzes enkurproteīns (mAKAP) saista PKA un PDE4D3 pie RyR1 un spinofilīns saista PP1 pie RyR1 (Takeshima *et al.*, 1989; Marks *et al.*, 1989; Zalk *et al.*, 2007; Bellinger *et al.*, 2008).

Cilvēka organismā PKA, PP1 un PDE4D3 katalītiskās un regulatorās subvienības regulē PKA mediētu RyR1 fosforilāciju pie Ser2843 (Ser2844 pelēs) (Reiken *et al.*, 2003; Zalk *et al.*, 2007). Ir pierādīts, ka PKA mediēta RyR1 Ser2843 fosforilācija paaugstina kanāla jutību pret citoplazmatisko Ca^{2+} koncentrāciju, samazina kalstabīna 1 afinitāti pret RyR1 un destabilizē kanāla aizvērto stāvokli (Reiken *et al.*, 2003; Marx *et al.*, 1998). Pretēji Meissners ar kolēģiem pierādīja, ka PKA mediēta RyR1 Ser2843 fosforilācija nesamazināja kalstabīna 1 saistīšanos ar RyR1; tomēr datu interpretāciju apgrūtina fakts, ka autori nekontrolēja kalstabīna koncentrāciju reakciju laikā (Stange *et al.*, 2003). Ir pierādījumi, ka kalstabīna 1 koncentrācija skeleta muskulatūrā ir aptuveni 200 nM un ka PKA mediēta RyR1 fosforilācija samazina kalstabīna 1 afinitāti pret RyR1 no 100-200 nM līdz 600 nM. Līdz ar to fizioloģiskos apstākļos kalstabīna 1 afinitātes redukcija pret RyR1, kuru samazina PKA mediēta RyR1 Ser2843 fosforilācija, ir pietiekama lai būtiski samazinātu kalstabīna 1 koncentrāciju RyR1 kompleksā. (Reiken *et al.*, 2003). Hroniska PKA mediēta RyR1 Ser2843 hiperfosforilācija, kas tiek definēta kā PKA mediēta 3 vai 4 no 4 Ser2843 saišu fosforilācija katrā no RyR1 homotetramēriem, noved pie noplūdes kanālu veidošanās. Noplūdes kanāli ir tādi, kuriem ir tendence atvērties miera stāvoklī, kas veicina muskuļu disfunkciju, kas ir saistīta ar hiperadrenerģiskiem stāvokļiem, kādi attīstās pie hroniskas sirds mazspējas (HSM) (Reiken *et al.*, 2003). PDE4D3 koncentrācijas samazināšanās RyR1 kompleksā pastiprina PKA mediētu RyR1 hiperfosforilāciju hroniska hiperadrenerģiska stresa laikā (Reiken *et al.*, 2003).

Ir dati, ka RyR1 posttranslācijas modifikācijas, izņemot fosforilāciju, kā cisteīna brīvo sulfhidrilgrupu nitrozilācija (S-nitrozilācija), paaugstina RyR1 kanāla aktivitāti (Eu *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001).

RyR1 aktivitāti arī regulē Ca^{2+} un 17-kDa Ca^{2+} -saistošais proteīns kalmodulīns, kas saistās ar RyR1 monomēriem attiecībā 1:1. Kalmodulīna bezkalcija jonu forma darbojas kā daļējs RyR1 agonists pie zemas Ca^{2+} koncentrācijas citoplazmā (zemāk par 200 nM), savukārt kalmodulīna ar kalcija joniem saistītā forma darbojas kā inhibitors pie augstas citoplazmatiskas Ca^{2+} koncentrācijas (augstāk par 1 μM) (Tripathy *et al.*, 1995).

2.3.2. Skeleta muskuļu stress

Proteīna RyR1 aktivitāti modulē stabilas posttranslācijas modifikācijas, kā fosforilācija, nitrozilācija un oksidācija, kas var būt sekojoši efekti stresa-atkarīgos signālceļos. Atkārtotas, spēcīgas muskuļu kontrakcijas noslogo muskuļu ārpusšūnu matriksu, membrānas un citoskeletu. Šādi noslogotam muskulim jāiztur arī cikliskas desmitkārtīgas citoplazmatiskās Ca^{2+} -koncentrācijas izmaiņas (no 100 nM līdz vairāk kā 1 μM katras kontrakcijas laikā) bez

paliekošiem bojājumiem vai šūnu nāves. Neatbildēts jautājums ir kādā veidā muskuļu šūnas spēj izvairīties no kaitīgo, Ca^{2+} -atkarīgo signālceļu, kas ir saistīti ar apoptozi un proteolīzi, aktivācijas, kaut arī atkārtoti tiek sasniegtas citoplazmatiskas Ca^{2+} koncentrācijas, kas ir pietiekamas lai aktivētu šūnas bojājošus un šūnas nāvi ierosinošus signālceļus.

Ir zināms, ka muskuļi spēj ilgstoši uzturēt kontraktīlo funkciju neskatoties uz smagu mehānisku un metabolisku stresu, jo pastāv aizsargājoši mehānismi, kas ierobežo neatgriezeniskus, stresa ierosinātus bojājumus un šūnu nāvi (Flück, 2006). Kontrakciju laikā muskuļiem rodas dažādi bojājumi, piemēram, membrānu plīsumi vai pat stāvokļi ar enerģijas rezervju iztukšošanu, bez paliekošiem bojājumiem. Līdz ar to, lai novērtētu muskuļu stresa līmeni, ir jāņem vērā ne vien pievadītā stresa veids un daudzums, bet arī muskuļa aizsargmehānismus, kas nosaka muskuļa stresa inducētā bojājuma sliekšni. Ir vairāki faktori, kas nosaka muskuļa šķiedras mehāniska stresa ierosinātā bojājuma sliekšni: šķiedras tips, kas atspoguļojas tās mitohondriju skaitā un to oksidatīvajā saturā; šķiedras enerģijas rezerves; šķiedras kontrakcijas ātrums un spēks; šķiedras izmērs; šķiedras attiecības ar blakusšķiedrām un kādā veidā šķiedra tiek izmantota (Fitts, 1994). Muskuļu I b tipa šķiedrām (ātrās, glikolītiskās šķiedras), ir raksturīga zema aerobā mitohondriju aktivitāte un ātra kontrakcija, savukārt I tipa šķiedrām (lēnās, aerobās šķiedras) ir augstāka mitohondriālā kapacitāte un tās ir rezistentākas pret nogurumu. Par muskuļa bojājuma sliekšņa variabilitāti var spriest pēc novērojuma, ka dažādas muskuļu slimības skar tikai noteiktas muskuļu šķiedras un muskuļus. II tipa šķiedras lielos proksimālos muskuļos ir visvairāk skārtās Kušinga sindroma gadījumā (Olafsson *et al.*, 1994), I b tipa šķiedras apakšējās ekstremitātēs ir visvairāk skartas pie dažādām muskuļu distrofijām (Webster *et al.*, 1988), un mazie ekstraokulārie muskuļi ir visbiežāk skarti pie mitohondriālām miopātijām (Schoser & Pongratz, 2006). Dažādi stresa faktori ierosina audu bojājumu atšķirīgos veidos- daži stimuli tieši ietekmē muskuli, bet citi pazemina muskuļa bojājuma sliekšni. Jebkurā gadījumā tie ir Ca^{2+} homeostāzes traucējumi.

Iedzimta, ar stresu asociēta muskuļu disfunkcija tiek saistīta ar mutācijām RyR1 gēnā, kas izmaina Ca^{2+} atbrīvošanu, kā arī ar mutācijām gēnos, kas kodē citoskeleta un ekstracelulārus proteīnus, tai skaitā tādus proteīnus, kas ir saistīti ar muskulārām distrofijām, kas savukārt noved pie miofibrillu membrānu trausluma (MacLennan & Phillips 1992). Iegūta, ar stresu asociēta muskuļu disfunkcija tiek saistīta arī ar vides faktoriem un lielu fizisku slodzi. Viena no parādībām pie atkārtotas, smagas fiziskas slodzes, kā arī pie hroniskām slimībām (piem. sirds mazspēja) ir hiperadrenerģisks stāvoklis.

2.3.3. Iegūts skeleta muskuļu stress

Muskuļu spēka samazināšanos nogurdinošas stimulācijas dēļ uz noteiktu laiku var kompensēt ar RyR1 stimulatoru kofeīnu (Allen & Westerblad, 2001). Muskuļu noguruma laikā T-tubuļu funkcija ir saglabāta un miofilamentu jutība uz Ca^{2+} ir normāla (Westerblad *et al.*, 2003), kas arī norāda uz iespējamu SR Ca^{2+} atbrīvošanas defektu lomu muskuļu noguruma patoģenēzē. Pirms SR Ca^{2+} atbrīvošanas samazināšanās atkārtotas tetāniskas stimulācijas laikā, rodas raksturīgas izmaiņas Ca^{2+} koncentrācijas izmaiņu cikliskumā – pagarinās Ca^{2+} atbrīvošanas fāzes lejupejošā daļa (kuru nosaka SR Ca^{2+} reabsorbcijas ātrums) un progresējoši paaugstinās miera stāvokļa Ca^{2+} koncentrācija šūnā (Allen & Westerblad, 2001). Kalcija jonu atbrīvošanas fāzes lejupejošās daļas prolongācija varētu rasties sakarā ar neapstādinātu Ca^{2+} atbrīvošanu pēc sākotnējās kanāla atvēršanas un traucētu SR Ca^{2+} reabsorbcijas sūkņa darbību – sarkoplazmātiskā/endoplazmātiskā tīkla Ca^{2+} adenozintrifosfotāzi 1a (SERCA1a – ang. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1a*), iespējams, sakarā ar oksidāciju (Scherer & Deamer DW, 1986). Paaugstināta intracellulāra Ca^{2+} koncentrācija varētu būt cits mehānisms, kas varētu inhibēt Ca^{2+} atbrīvošanu muskuļu noguruma laikā, iespējams, sakarā ar traucētu savienošanos starp Cav1.1 un RyR1 vai arī caur tiešu inhibitoru efektu uz RyR1 mediētu Ca^{2+} atbrīvošanu (Chin & Allen, 1996; Lamb *et al.*, 1995).

Viens no argumentiem pret pilnībā metabolisku muskuļu vājuma mehānismu un par SR Ca^{2+} atbrīvošanas defektu lomu nozīmību ir, ka cilvēka muskulim pēc smagas fiziskas slodzes tiek novērota ilgstoša spēka ģenerācijas samazināšanās, kas var ilgt vairākas dienas (Edwards *et al.*, 1977). Šāds laika sprādis atbilst prolongētam SR Ca^{2+} atbrīvošanas inhibīcijas periodam (Westerblad *et al.*, 2000). Daļēji samazināto SR Ca^{2+} atbrīvošanu var skaidrot ar brīvā Ca^{2+} samazināšanos SR iekšienē sakarā ar Ca^{2+} fosfātu sāļu precipitāciju (Fryer *et al.*, 1995; Westerblad *et al.* 1996).

Muskuļos pēc smagas, nogurdinošas, fiziskas slodzes biežāk novērojama spontāna Ca^{2+} atbrīvošanās caur RyR1, nekā miera stāvoklī vai pēc vieglas slodzes (Wang X, *et al.*, 2004). Tā kā šādas Ca^{2+} atbrīvošanas epizodes ir atkarīgas no RyR1 aktivitātes, tas norāda, ka nogurušā muskulī RyR1 kanāli ir neblīvi.

Muskuļu šķiedras kontrakcija pacientiem ar MH noris ar traucējumiem RyR1 darbībā, kuru cēlonis ir mutācija šai gēnā. Eksperimentālie pētījumi dažādās vidēs *in vitro*, *in vivo*, izolētās šūnās pelēm, kurām ir kāda no MH izraisošām mutācijām RyR1 gēnā skaidri pierāda, ka klīniskie simptomi ir saistīti ar nekontrolētu Ca^{2+} atbrīvošanos no SR (Rosenberg *et al.*, 2007). Pilnīgi skaidrs mehānisms kā dažādas substances izraisa MH manifestāciju līdz šim nav precīzi noskaidrots. To var izraisīt vispārējā anestēzijā izmantojamie halogēnus saturošie

anestēzijas līdzekļi un depolarizējošais muskuļu relaksants sukcinilholīns. Kalcija jonu atbrīvošanos izraisa dihidropiridīna receptora (DHPR) aktivācija, kas atrodas SR tubuļu sienā (Nelson *et al.*, 1988; Pessah *et al.*, 1986).

Lielākos pašlaik zināmos intracelulārās Ca^{2+} atbrīvošanas kanālus kodē divi svarīgākie gēni no visas gēnu grupas - inositola trifosfāta receptoru un rianodīna receptoru gēni. Evolūcijas gaitā radušies daudzi citi gēni, kas piedalās intracelulārā Ca^{2+} signālu pārvades kompleksā (Sorrentino *et al.*, 2000). DHPR ir sprieguma atkarīgs receptors, kas sastāv no piecām apakšvienībām: a1, a2, b, c un d. a1 apakšvienība uztur Ca^{2+} kanāla aktivitāti un saistās ar Ca^{2+} antagonistiem. Pārējās četras apakšvienības darbojas kā modulatori. DHPR funkcionāli saista šķērstubuli ar rianodīna receptoru un pārvada depolarizācijas vilni no šķērstubuļa uz RyR. Rezultātā notiek sprieguma atkarīga dihidropiridīna receptora a1 apakšvienības sprieguma atkarīgas formas izmaiņas (Paolini *et al.*, 2004). Šīs izmaiņas izmaina rianodīna receptora konfigurāciju saistot olbaltuma II un III segment, kas atver rianodīna receptoru. RyR1 kanāla atvēršana izraisa strauju intracelulārā kalcija līmeņa pieaugumu un muskuļa kontrakciju. Pēc muskuļa kontrakcijas intracelulārie Ca^{2+} sūkņi ātri atgriež kalcija jonus atpakaļ SR un sākas relaksācija, kad Ca^{2+} koncentrācija ir zemāka par kairinājuma sliekšni. RyR1 ir divas pozīcijas, kurām ir liela loma Ca^{2+} koncentrācijas izmaiņās: A- pozīcija un I- pozīcija. A- pozīcija ir augstas afinitātes Ca^{2+} saistīšanās vieta, kas izraisa RyR1 atvēršanos. I- pozīcija ir zemākas afinitātes Ca^{2+} saistīšanās vieta, kas izraisa olbaltuma slēgšanos. Rianodīna receptora mioplazmatiskajā daļā ir izvietotas vairākas papildus saistīšanās vietas olbaltumiem un citiem ligandiem, tai skaitā, Ca^{2+} , ATF, Mg^{2+} un dažādiem citiem aģentiem kā gaistošie anestēzijas līdzekļi, rianodīns vai dantrolēns (Wappler, 2001; Galli *et al.*, 2006; Balog *et al.*, 2001).

2.3.4. Iedzimtas skeleta muskulatūras disfunkcijas formas

Ir potenciāli informatīvi izmeklēt *RYR1* gēna mutāciju sekas, kas ir saistītas ar skeleta muskulatūras miopātijām kurām pamatā iespējams ir izmainīta Ca^{2+} regulācija. Šīs ģenētiskās slimības sniedz ļoti svarīgu ieskatu RyR1 disregulācijas mehānismos, kas noved pie traucētas skeleta muskulatūras funkcijas. Visplašāk pētītās RyR1 mutācijas ir tās, kas ierosina maligno hipertermiju (MH) (MacLennan & Phillips, 1992). Šīs patoloģijas pamatā ir ātra un noturīga intracelulārās Ca^{2+} koncentrācijas paaugstināšanās RyR1 kanālu hiperaktivācijas dēļ (Mickelson JR & Louis CF, 1996). RyR1 kanāliem ar MH mutāciju ir raksturīgs pazemināts sliekšnis Ca^{2+} atkarīgai aktivācijai MH „trigera” klātbūtnē (Mickelson *et al.*, 1988; Richter *et al.*, 1997).

Retos gadījumos MH epizodes uzņēmīgiem indivīdiem var izsaukt arī smaga fiziska slodze, kā arī pārkaršana bērniem, kas savukārt norāda, ka vides stresori var pazemināt aktivācijas sliekšni RyR1 kanāliem ar MH mutāciju un ierosināt patoloģisku SR Ca²⁺ atbrīvošanu (Denborough, 1998; Tobin *et al.*, 2001). Ir vērts pieminēt, ka Cav1.1 gēna mutācijas arī var ierosināt MH, kas norāda, ka traucēta Cav1.1 un RyR1 savienošanās arī var novest pie paaugstinātas jutības pret RyR1 kanālus aktivējošiem aģentiem (Stewart *et al.*, 2001). Akūtas MH epizodes terapija ir vērsta uz RyR1-mediētu Ca²⁺ atbrīvošanas samazināšanu (Krause *et al.*, 2004).

Pretēji MH, kas klīniski izpaužas kā akūta krīze citādi veselam indivīdam, cita RyR1 gēna mutāciju grupa izraisa centrālo kodolu slimību (ang. *central core disease* – CCD). Tā ir iedzimta miopātija, kas izpaužas bērnībā un raksturojas ar vāju muskuļu tonusu, muskuļu vājumu un muskuloskeletālām anomālijām (Cabello & Ricoy-Campo, 2003; Quane *et al.*, 1993; Zhang Y *et al.*, 1993; Tilgen *et al.*, 2001). Liela daļa *RYR1* gēna mutāciju, kas saistītas ar CCD, izpaužas ar nenoturīgiem RyR1 kanāliem. Rezultējošā hroniskā SR Ca²⁺ noplūde paaugstina mioplazmātisko Ca²⁺ koncentrāciju, kas noved pie mitohodriālas disfunkcijas, miofibrilu dezorganizācijas un muskuļa bojājuma (Tilgen *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 1999; Gommans *et al.*, 2002). Slimība raksturojas ar 1. tipa miofibrilu centrāliem bojājumiem, oksidatīvo enzīmu deficītu, miofibrilu dezorganizāciju, 2. tipa šķiedru nepietiekamību un variablu intersticiālu fibrozi (Wu *et al.*, 2006). Ar CCD asociētas RyR1 gēna mutācijas RyR1 kanāla poras reģionā noved pie SR Ca²⁺ atbrīvošanas no sarkolemmas un sekojoša muskuļa šķiedras uzbudinājuma (Avila *et al.*, 2003).

Nav skaidras robežas starp CCD un MH kā klīniski, tā arī spriežot pēc RyR1 funkcijām (Zhou *et al.*, 2007; Priori & Napolitano, 2005; Tong *et al.*, 1999) un dažas *RYR1* mutācijas tiek saistītas ar kombinētu MH un CCD fenotipu (Zhou *et al.*, 2007), tomēr nav līdz galam noskaidrots šo fenotipu atšķirību iemesls. Pastāv uzskats, ka funkcionāla klasifikācija, balstoties uz RyR1 radītu kalcija jonu noplūdes pakāpi, varētu būt informatīva. Varētu izdalīt „kompensētu noplūdi”, pie kuras Ca²⁺ noplūde miera stāvoklī ir vienāda ar Ca²⁺ reabsorbciju, kas raksturojas ar MH fenotipu, kā arī „dekompensētu noplūdi”, kuras laikā kalcija jonu noplūde pārsniedz Ca²⁺ reabsorbciju, kas savukārt raksturotos ar jauktu MH un CCD fenotipu (Priori & Napolitano, 2005; Dirksen & Avila, 2004).

2.3.5. Neiromuskulāras slimības, kas kombinējas ar maligno hipertermiju.

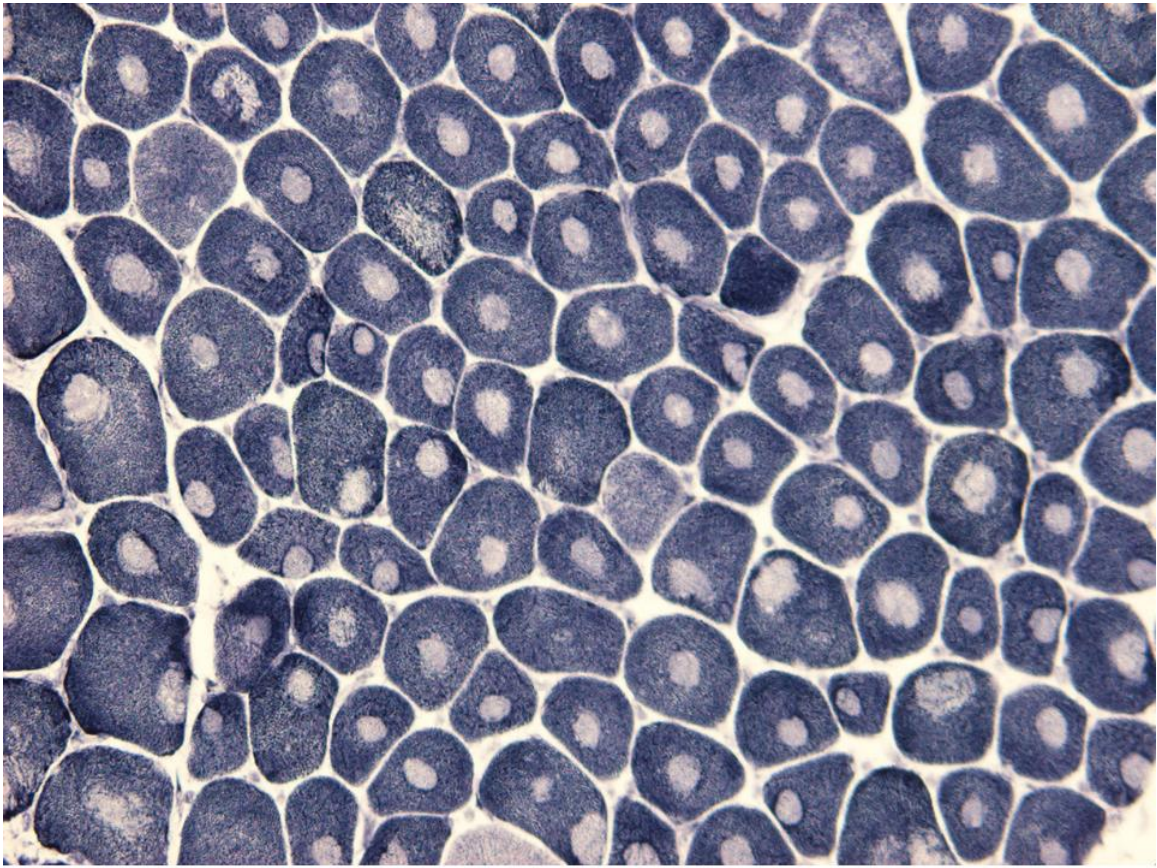
Domājams, ka izmainīta Ca²⁺ homeostāze ir centrālais patoģenētiskais components biežāko muskuļu distrofiju gadījumā, kā Dišēna muskuļu distrofija (DMD) un Bekera muskuļu distrofija (BMD), kuras ierosina pilnīgs vai daļējs distrofina ekspresijas zudums.

Distrofina trūkums noved pie liela distroglikāna kompleksa integritātes zuduma, kas savieno muskuļšūnas membrānas un savieno intracellulāro aktīna citoskeletu ar ārpusšūnas matriksu. Distroglikāna kompleksa izjaukšana noved pie muskuļšūnas membrānas trausluma un netieši pie Ca^{2+} homeostāzes traucējumiem (Matsumura *et al.*, 1992), kaut arī mehānismus vēl jāprecizē. Paaugstināta Ca^{2+} plūsma caur sarkolemmu un apoptozes mehānismu aktivācija ir izvirzītas kā DMD patoģenētiskie mehānismi (Deconinck & Dan, 2007). Savukārt MDX (distrofina nepietiekamības) DMD peļu modelī ir novērotas SR Ca^{2+} depo un Ca^{2+} atbrīvošanas izmaiņas (Robert *et al.*, 2001; Plant & Lynch, 2003; Woods *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2005). Mitohondriju paaugstināta Ca^{2+} uzņemšana ir izvirzīta kā muskuļu vājumu veicinošs faktors DMD gadījumā (Plant & Lynch, 2003), tomēr jautājums, kā RyR1 iesaistās Ca^{2+} homeostāzes patoloģiju gadījumā pie muskuļu distrofijām, vēl paliek atklāts.

No iedzimtām muskuļu patoloģijām ar MH visbiežāk kombinējas Centrālo kodolu slimība. Šī arī ir autosomāli dominanta slimība ar mutāciju *RYR1* gēnā. Tai raksturīgs pazemināts muskulatūras tonuss, kas dinamikā neprogresē. Parasti slimība skar proksimālos muskuļus, galvenokārt gūžu un augšstilbu, kādēļ vērojama motora atpalcība bērna attīstībā- bērns vēlāk sāk sēdēt un staigāt. Vērojama arī sejas muskulatūras atonija, bērns slikti zīž. Vēlākā attīstībā vērojami arī skeleta attīstības traucējumi, kas izpaužas ar skoliozi vai gūžas locītavas mežģījumu. Ļoti reti, smagu formu gadījumā vērojama respiratoriska mazspēja.

Diagnozi uzstāda parasti pēc klīniskām pazīmēm, muskuļu biopsijas un molekulārās diagnostikas rezultātiem.

Mikroskopiski izmeklējot muskuļu biopsiju vērojama sekojoša atrade- slimība skar parasti 1. Tipa muskuļu šķiedras un mikroskopiski izmeklējot muskuļa paraugu atrod centrāli novietotus šūnu kodolus, kodoli nav vienāda izmēra, tiem nereti ir izplūdusi robeža. Atrodamas šūnas ar vairākiem vai daudziem sīkiem kodoliem (sk. att. 2.2).



2.2. att. Muskuļa preparāts pacientam ar Centrālo kodolu slimību

CCD specifiska ārstēšana nav iespējama. Pamatā ir simptomātiska terapija- gūžas mežģītuma un skoliozes operatīva korekcija, ankiložu veidošanās profilakse un elpošanas muskulatūras treniņš, elpošanas mazspējas profilaksei.

Dišēna muskuļu distrofija (DMD) ir recesīvi pārmantojama ar X hromosomu saistīta muskuļu distrofijas forma, kurai raksturīga strauji progresējoša muskulatūras deģenerācija. Tā skar praktiski tikai vīriešu dzimuma pārstāvjus un sievietes ir gēna nēsātājas. Slimību izraisa mutācija *DMD* gēnā, kurš atrodas X hromosomā. *DMD* gēns kodē proteīnu distrofīnu, kas ir svarīgs struktūras elements muskuļu audos- tas nodrošina distroglikāna kompleksa stabilitāti, kas atrodas šūnas membrānā un piedalās šūnas skeleta uzbūvē. Distroglikāna kompleksa nestabilitāte raksturojas ar pastiprinātu kalcija jonu kustību caur sarkolemmu, kas pastiprina oksidatīvo stresu un veicina šūnas bojāeju. Pacientiem raksturīgs paaugstināts kreatīnkināzes (CK) līmenis asinīs, kas paaugstinās muskuļu šūnu bojāejas rezultātā.

Vīriešu dzimuma *DMD* pacientiem simptomi parasti manifestējas pirms piecu gadu vecuma un var būt pamanāmi jau agrākā vecumā. Sākotnēji slimība izpaužas ar progresējošu muskulatūras vājumu un muskuļu masas samazināšanos. Vispirms tā skar ķermeņa lejasdaļas un iegurņa apvidu. Vēlāk šīs pašas izpausmes var skart kakla, roku muskulatūru un citas ķermeņa daļas, tai skaitā elpošanas muskulatūru.

Agrīnie simptomi ir apakšstilbu muskuļu pseidohipertrofija, kādēļ pacienti staigā uz pirkstgaliem un bieži krīt, fiziskās izturības mazināšanās, grūtības piecelties, nespēja uzkāpt pa kāpnēm. Slimībai progresējot muskuļu audi izzūd, tie tiek aizstāti ar taukaudiem un fibrotiskiem audiem. Apmēram 10 gadu vecumā ir nepieciešama palīdzība staigājot, bet jau 12 gadu vecumā vairumam pacientu ir nepieciešams ratiņkrēsls. Vēlāk rodas arī kaulu attīstības traucējumi, kas izraisa dažādas deformācijas, tai skaitā arī mugurkaulā. Turpinoties muskuļaudu bojāejai mazinās kustību iespēja un attīstās paralīze. Intelektuālā attīstība parasti nav traucēta. To var veicināt muskulatūras vājuma izraisītie kustību un mācīšanās traucējumi. Sagaidāmā dzīvildze šiem pacientiem ir no padesmit līdz 25 gadiem, retos gadījumos pacienti nodzīvo līdz 40 gadu vecumam.

Bekera muskuļu distrofija arī ir saistīta ar mutāciju X hromosomā. Tai, tāpat kā Dišēna muskuļu distrofijai, raksturīgs distrofīna deficīts, kas izraisa muskuļu šūnu skeleta nestabilitāti. Klīniskās izpausmes tai ir salīdzinoši vājākas. Tā ir sastopama retāk kā DMD un klīnisko pazīmju sākums vērojams 8 – 25 gadu vecumā vai pat vēlāk. Slimība ir lēni progresējoša un izpaužas ar nogurumu, samazinātu izturību staigājot, biežu krišanu, vēlīni arī elpošanas grūtības. Sievietēm, kuras ir mutācijas nēsātājas biežāk novēro dilatācijas kardiomiopātiju.

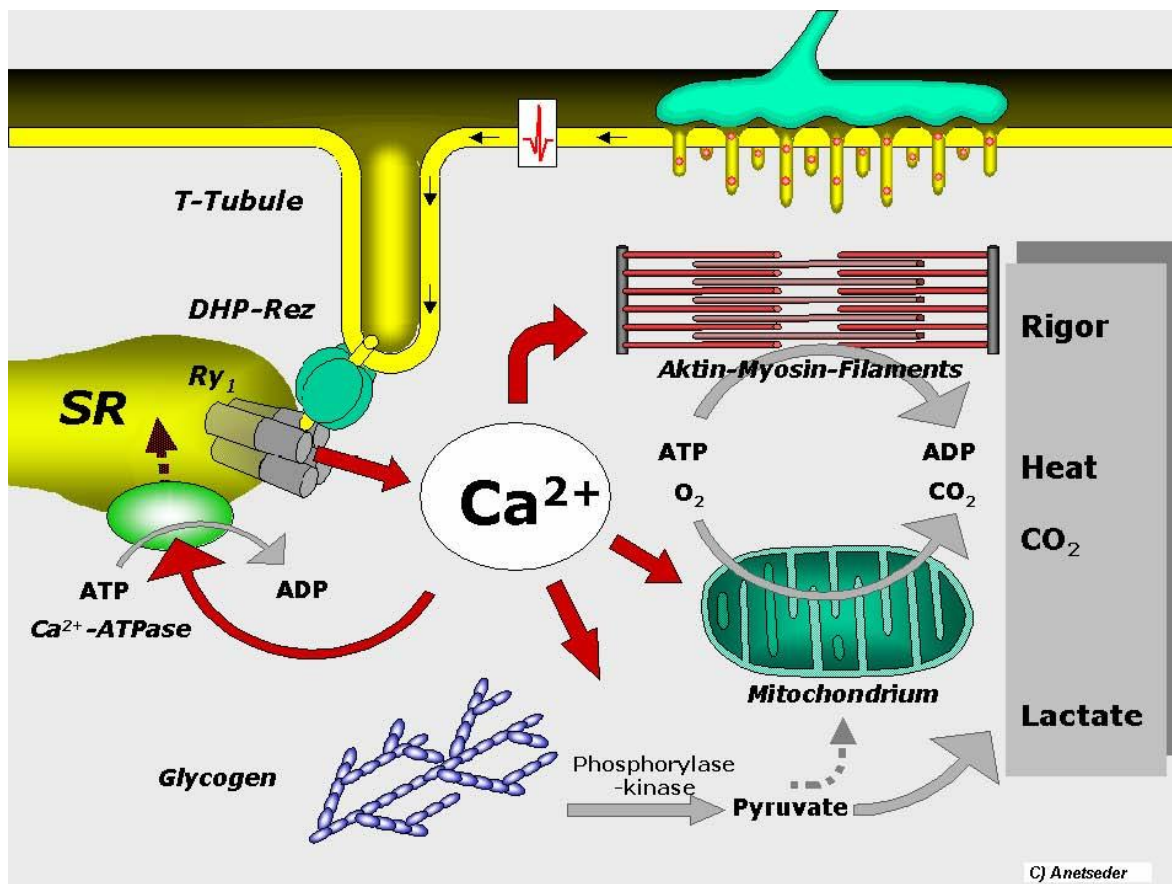
3. Malignās hipertermijas klīniskās izpausmes

3.1. Primārās izpausmes

MH primārās izpausmes ir tieši saistītas ar kalcija homeostāzes traucējumiem muskuļu šūnās ar intracelulārās kalcija jonu koncentrācijas pieaugumu. Muskuļu šūnās Ca^{2+} ir svarīgākais sekundārais mediators un pastāvīgi paaugstināta kalcija jonu koncentrācija izraisa:

1. Muskulatūras rigiditāti pastāvīgas aktīna- miozīna mijiedarbības rezultātā.
2. Hipermetabolisku stāvokli, kā cēlonis ir:
 - a. Kalcija- kalmodulīna izraisīta tieša glikolītisko fermentu tieša stimulācija
 - b. Netieši, radot paaugstinātu pieprasījumu pēc adenozintrifosfāta (ATF), kas nepieciešams, lai nodrošinātu pastiprināto miofilamentu mijiedarbību un apgādājot ar enerģiju dažādus membrānas kalcija sūkņus, kuri darbojas ar maksimālu jaudu, lai atjaunotu kalcija homeostāzi šūnā. Pastiprinātā siltuma un CO_2 produkcija ir pastiprinātas Ca^{2+} izsviedes un kalcija sūkņu darba maksimālā režīmā rezultāts, ar mērķi atjaunot homeostāzi. Laktātu produkcija pieaug anaerobā metabolisma rezultātā, jo hipermetaboliskā stāvokļa dēļ nav iespējams nodrošināt pietiekamu skābekļa piegādi.

3. Rabdomiolīze ir pastiprinātas kontraktilitātes un membrānas fosfolipīdu noārdīšanas sekas, ko veic kalcijs aktivētās fosfolipāzes (att. 3.1).



3.1. att. MH principiālais mehānisms, kas parāda hipermetaboliskā stāvokļa rašanos pastiprinātas kalcijs izsviedes rezultātā no sarkoplazmatiskā tīkla ar sekojošām klīniskajām izpausmēm kā muskulatūras rigiditāti, pastiprināta siltuma, ogļskābās gāzes un laktātu produkcija (Anetseder *et al.*, 1994).

3.2. Malignās hipertermijas klīniskā aina

MH klīniskā aina raksturojas ar hipermetabolisku stāvokli, kura cēlonis ir pastiprināta Ca^{2+} jonu izsviede no sarkoplazmatiskā tīkla muskuļu šūnās un traucējumi tā reabsorbcijā. Klīniski novēro sekojošas pazīmes:

1. Muskulatūras rigiditāti pastāvīgas aktīna – miozīna mijiedarbības rezultātā. Tā var būt dažādi izteikta no *M. Masseter* spazma pēc Sukcinilholīna ievades, līdz vispārējai muskulatūras rigiditātei. Apmēram 25% pacientu, kuriem ir bijis *M. Masseter* spazms pēc Sukcinilholīna ievades, tiek pierādīta MH iespējamība. Šī ir pacientu grupa, kura Latvijā netiek atpazīta. Pacienti metaboliskas stimulācijas un muskulatūras bojājuma rezultātā novēro ievērojamu kreatīnkināzes (CK) un mioglobīna pieaugumu

asins plazmā. CK maksimālais pieaugums ir pēc 24 stundām un var pārsniegt normu pat 50 reizes. Tāpat novero arī mioglobīnūriju, kas izpaužas agrāk.

2. Paaugstinātas vielmaiņas stāvokli, kuru izraisa tieša kalcija-kalmodulīna kompleksa stimulējoša darbība uz glikolītiskajiem enzīmiem un netiešā veidā pieaugot vajadzībai pēc ATF. Palielināts ATF daudzums nepieciešams lai uzturētu pastiprināto aktīva – miozīna mijiedarbību un nodrošinātu ar enerģiju dažādos membrānu sūkņus, kas darbojas ar maksimālu jaudu, lai atjaunotu kalcija homeostāzi.
3. Rabdomiolīzi, kura rodas pārmērīgas kontrakcijas un membrānas fosfolipīdu bojājuma rezultātā, kuru izraisa Ca^{2+} aktivētās fosfolipāzes.

Muskuļi veido aptuveni 40% no kopējās ķermeņa masas, tadēļ slimības manifestācija ir dzīvībai bīstama. Siltuma produkcija tik ļoti pārsniedz siltuma atdeves iespējas, ka ķermeņa temperatūra palielinās vairāk kā par 1°C 10 minūtēs. Šādā hipermetabolisma situācijā skābekļa piegāde ir nepietiekama un izraisa skābekļa piesātinājuma krišanos arteriālajās asinīs. Muskuļos pastiprināti veidojas CO_2 un pienskābe, kas izraisa acidozi. Rabdomiolīzes rezultātā asinīs nonāk mioglobīns un kālijs. Hiperkaliēmija var izraisīt dzīvībai bīstamus ritma traucējumus, savukārt mioglobīns izraisa nieru kanāliņu bojājumu un akūtu nieru mazspēju. Muskuļu šūnu bojājuma rezultātā atbrīvojas audu nekrotiskais faktors, kas kopā ar hipertermiju veicina diseminētas intravazālas koagulācijas attīstību.

Agriņās MH klīniskās pazīmes ir sekojošas:

- *M. Masseter* spazms pēc Sukcinilholīna ievades
- Tahikardija
- Aritmijas
- CO_2 koncentrācijas pieaugums izelpā
- Svīšana
- Hipertermija (daži autori to uzskata par vēlīnu simptomu)
- Metaboliska acidoze
- Muskulatūras rigiditāte
- Hipertensija
- Ādas pleķains apsārtums
- Skābekļa piesātinājuma samazināšanās

Vēlīnās komplikācijas ir:

- Muskuļu pietūkums
- Smadzeņu tūska
- Sirds darbības apstāšanās

- Nieru mazspēja (Girard *et al.* 1994)

Diferenciāldiagnozē jāizslēdz tireotoksikoze, ļaundabīgais neuroleptiskais sindroms, sepse, feohromocitoma, kofeīna intoksikācija, izelpas vārsta defekts anestēzijas iekārtā.

4. Malignās hipertermijas molekulāri ģenētiskie aspekti

Maligno hipertermiju vairumā gadījumu (50- 70%) izraisa mutācija 1. tipa rianodīna receptora gēnā, kas kodē sarkoplazmatiskajā tīklā lokalizētā 1. tipa rianodīna receptora proteīnu (Balog *et al.*, 2001; Chamley *et al.*, 2000; Litman & Rosenberg, 2005). Kofeīns, halotāns un citas trigervielas iedarbojas ievērojami palielinot A- piesaistes vietas afinitāti Ca^{2+} joniem un atbilstīgi samazinot I- piesaistes vietas afinitāti mutācijas rezultātā izmainītajam proteīnam. (Shomer *et al.*, 1994) Tā iespējams notiek pastiprināta Ca^{2+} atbrīvošana no SR pie zemāka kairinājuma un augstāka inhibīcijas sliekšņa. Palielinātā kalcija jonu daudzuma reabsorbcijai nepieciešams liels daudzums enerģijas, ko nodrošina ATF. Pastiprinātās kontrakcijas un jonu sūkņu darbības dēļ tiek atbrīvots liels daudzums siltuma, kas rada hipertermiju, kas arī bija šīs slimības sākotnējā galvenā pazīme. Muskuļu šūnā tiek bojāta ATF deficīta un augstās temperatūras dēļ, kā rezultātā šūnas saturs (kālijs, mioglobīns, kreatīns, kreatīnkināze un fosfāti) nonāk asins cirkulācijā. RYR1 receptora aktivitāti ietekmē arī Mg^{2+} , slēdzot jonu kanāla A- un I- piesaistes vietas. Mutācijas skartajiem proteīniem afinitāte pret Mg^{2+} ir ievērojami samazināta.

Otrs zināmais MH izraisošais gēns ir *CACNA1S*, kurš kodē L-tipa sprieguma atkarīgo kalcija kanālu α -vienību. Ir zināmas divas mutācijas šai gēnā un abas skar vienu lokusu- R1086. Tas atrodas lielajā intracelulārajā cilpā, kas savieno 3. un 4. domēnu un, iespējams, ir iesaistīts RYR1 negatīvajā regulācijā. Ja šī mutācija ir HEK 293 šūnās (cilvēka embrionālās nieru šūnas), rezultātā kalcija jonu kanāls ir piecas reizes jutīgāks aktivācijai ar kofeīnu un, domājams, arī ar halotānu (Monnier *et al.*, 1997)

Šūnās ar kanāliem, kurus veido mutācijas rezultātā izmainītais proteīns, ir paaugstināts bazālais Ca^{2+} līmenis citosolā. Kad šie kanāli aktivējas un aktivē RYR1, šī mijiedarbība izraisa izteiktu intracelulārā Ca^{2+} pieaugumu un rezultātā muskuļa šūnas kontrakciju. Zināmie ar MH saistītie gēni ir parādīti 4.1. tabulā.

4.1 tabula

Lokusi un gēni, kas saistīti ar MH

| Lokuss | Lokalizācija hromosomā | Gēns |
|--------|------------------------|-------------|
| MHS1 | 19q13.1 | <i>RYR1</i> |
| MHS2 | 17q11.3-q24 | Nezināms |

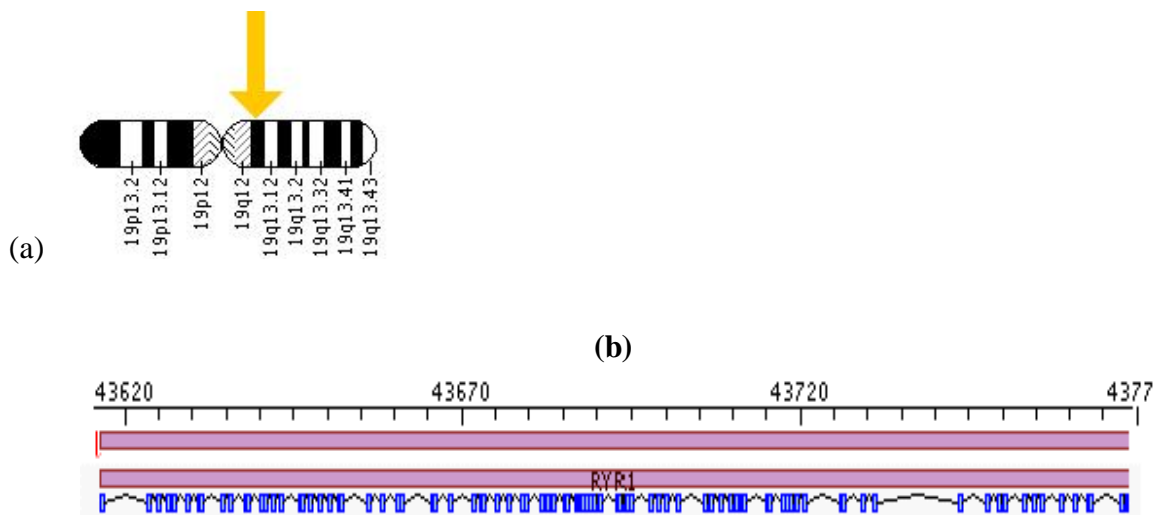
| | | |
|------|----------|----------------|
| MHS3 | 7q21-q22 | Nezināms |
| MHS4 | 3q13.1 | Nezināms |
| MHS5 | 1q32 | <i>CACNA1S</i> |
| MHS6 | 5p | Nezināms |

Genotipa un fenotipa korelācija ir vāja gan MH klīniskajās izpausmēs, gan izolēta muskuļu preparāta atbildes reakcijā uz kofeīnu vai halotānu. Tas apliecina, ka dažādi modulatori iespaido sindroma izpausmes.

4.1. Rianodīna receptora gēna 1 (*RYR1*) struktūra

RYR1 gēns kodē skeleta muskuļu proteīnu - rianodīna receptoru 1 (RYR1). Proteīns RYR1 ir daļa no rianodīna receptoru proteīnu ģimenes, kas veido Ca^{2+} jonu transporta kanālus šūnu sarkoplazmatiskajā tīklā. Gēna *RYR1* pamatekspresijas vieta ir skeleta muskuļu šūnas, bet daži pētījumi atklāj šī gēna ekspresiju arī barības vada, smadzeņu un gludās muskulatūras šūnās (Zheng *et al.*, 2008; Schmoelzl *et al.*, 1996).

Cilvēka *RYR1* gēns atrodas 19. hromosomā (19q13.1), kodē 15.3-kb mRNS (5038 aminoskābes) un sastāv no 106 eksoniem (gēna kodējošām secībām) (att. 4.1. (a) un (b)). Eksonu garums ir no 15 līdz 813 bp (bāzu pāriem), intronu – no 85 līdz 16,000 bp. Gēns *RYR1* ir viens no lielākajiem cilvēka gēniem (no 43,616,179. līdz 43,770,011. bp).



4.1. att. *RYR1* gēna lokalizācija (a) un shēma (b)

Mutācijas gēnā *RYR1* liek domāt par Ca^{2+} homeostāzes traucējumiem sekojošos iespējamajos veidos: 1) ietekme uz E-C saistīšanās mehānismu, 2) pastiprināts pasīvais Ca^{2+} zudums caur RYR1 kanālu miera stāvoklī (Priori *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2003).

4.2. *RYR1* gēna mutācijas

Mutācijas *RYR1* gēnā ir sastopamas līdz 70%-80% indivīdu ar apstiprinātu MH diagnozi. Vairāk nekā 180 mutācijas *RYR1* gēnā tika atklātas, bet tikai 30, kas atbilst EMHG izvirzītajiem kritērijiem, ir atzītas par MH izraisošām mutācijām (3.tabula pielikumā).

Visas mutācijas *RYR1* gēnā ir punktveida - aminoskābes kodējošajā tripletā ir mainīts viens nukleotīds, līdz ar to mainās arī sintezētā aminoskābe. Gandrīz visas mutācijas ir *missense* (aminoskābju aizvietošanas) mutācijas un tikai dažas ir viena nukleotīda delēcijas. Mutāciju rezultātā izmainītais proteīns RYR1 vairs nespēj pildīt savu funkciju, kas noved pie Ca^{2+} homeostāzes traucējumiem (Rosenberg *et al.*, 2010).

Daudzas mutācijas, kas ir saistītas ar MH, lokalizējas trīs *RYR1* gēna reģionos – aminogrupas galā (aa 35 – 614), centrālā reģionā (aa 1,787 – 2,458) un karboksilgrupas galā (aa 4,796 – 4,973) (Priori *et al.*, 2005).

Gēna garums, mutāciju skaits un to lokalizācija padara molekulāro diagnostiku darbietilpīgu un dārgu, tāpēc, veicot molekulāro, diagnostiku sākumā izmeklē tā dēvētos “Karstos punktus” *RYR1* gēnā: 1.domēns (eksoni 1-17), 2. domēns (eksoni 39-46) un 3. domēns (eksoni 90-104) (Treves *et al.*, 2005). Savukārt, 47. un 48. eksonos mutāciju atrod 89% pacientu ar CCD diagnozi (Wu *et al.*, 2006).

RYR1 gēna MH izraisošas mutācijas ir dominantas, bet ir konstatētas arī retas, recesīvas mutācijas ģimenēs, kas izpaužas ar dažādām miopātijām, sākot ar multi minikodolu slimību (angl.- *Multi minicore disease*), kas raksturojas ar muskuļu vājumu un asociējas ar multiplām miofibrillu dezorganizācijas vietām un oksidatīvo enzīmu zudumu, līdzīgi kā CCD gadījumā (Mathews & Moore, 2004), līdz pat fenotipam, kas raksturojas ar smagāku, ģeneralizētu muskuļu vājumu, kas iespējams saistīts ar proteīna RyR1 stabilitātes vai veidošanās defektiem, kas noved pie RyR1 Ca^{2+} atbrīvojošo kanālu koncentrācijas samazināšanās SR membrānā (Zhou *et al.*, 2007).

RYR1 gēna mutāciju saraksts tiek regulāri papildināts ar jaunām mutācijām, kuras tiek atrastas MH- jutīgiem pacientiem un akceptētas kā MH izraisošas atbilstoši Eiropas Malignās Hipertermijas Grupas (EMHG) vadlīnijām (Müller, 2004).

4.3 EMHG kritēriji *RYR1* mutāciju iekļaušanai MH izraisošo mutāciju sarakstā

EMHG kritēriji jaunu mutāciju iekļaušanai MH izraisošo mutāciju sarakstā paredz mutācijas ģenētisko un funkcionālo raksturojumu ar tam sekojošu rezultātu publikāciju zinātniskajā literatūrā.

Mutācijas ģenētiskajam raksturojumam ir nepieciešams mutācijas pilnīgs apraksts DNS un olbaltuma līmenī, mutācijas saistība ar MH fenotipu vismaz 2 ģimenēs un 100 kontroles paraugu pārbaude, lai izslēgtu lokāla polimorfisma iespējamību.

Katras *RYR1* gēna mutācijas funkcionālais raksturojums jāpierāda ar vienu vai vairākām testu sistēmām.

Rekombinantā *in vitro* ekspresija ar noteiktu genotipu ir standarta sistēma, ko ieviesa D. H. MacLennana grupa, izmantojot truša RYR1 cDNS konstrukciju ar atbilstošu mutāciju HEK293 šūnās. Ca²⁺ izviedes atbildes reakcija tiek mērīta fluorometriski pēc ekspozīcijas ar trigervielām (Tong *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1999; Tong *et al.*, 1999; Monnier *et al.*, 2000; Sambuughin *et al.*, 2001; Oyamada *et al.*, 2002). Lai gan tās nav muskuļu tipa šūnas, tās priekšrocība ir noteikta cDNS un ģenētiski standartizēta recipienta šūnu līnija. Tas ļauj tieši izvērtēt mutācijas iespaidu un izslēdz citu gēnu mutāciju ietekmi, kas var iespaidot RYR1 funkciju šūnās, kas ņemtas no pacienta.

Kā alternatīvu iespējams izmantot peļu miotubuļus, kuriem *RYR1* gēns ir aizstāts ar izvēlēto cDNS konstrukciju (Avila *et al.*, 2001). Arī šai sistēmā ģenētiskā bāze ir skaidri definēta un standartizēta. Modificētie miotubuļi ir tuvāki pacienta muskulim, tādēļ rezultāti nav tieši salīdzināmi ar HEK sistēmu.

Vēl viena sistēma mutācijas funkcionālajam raksturojumam ir RYR1 kultūras no *ex vivo* audiem. MHS pacientu audos ar zināmu RYR1 mutāciju tika veikti kalcija jonu saistīšanas mērījumi miotubuļos (Brinkmeier *et al.*, 1999, Wehner *et al.*, 2002), mikrosomālajos sarkoplazmātiskā tīkla preparātos no muskuļu biopsijām (Richter *et al.* 1997) vai limfoblastos (Girard *et al.*, 2001, Tilgen *et al.*, 2001).

Mērītie parametri ir Ca²⁺ plūsma un miera stāvokļa [Ca²⁺] vai rianodīna saistīšanās pie SRRYR1 preparāta. Miotubuļi un limfoblasti tiek izdalīti no pacienta audiem, tādēļ netiek izslēgta individuālu ģenētisku faktoru ietekmes iespējamība. SR preparātiem tika kombinētas dažādu pacientu biopsijas, lai mazinātu individuālu variāciju ietekmi. Lai izvairītos no ģenētisko faktoru interferences izmeklējums jāveic vismaz diviem pacientiem ar šādu mutāciju.

Lai mutāciju iekļautu to mutāciju sarakstā, kuras izraisa MH, ģenētiskajam un funkcionālajam raksturojumam jābūt publicētam zinātniskajā literatūrā. Tā kā tas kļūst arvien sarežģītāk EMHG plāno izstrādāt protokolu prasībām ziņu iesniegšanai par jaunām mutācijām (www.emhg.org).

5. MH diagnostikas iespējas

Joprojām galvenais diagnozes verifikācijas tests ir atbilstoši Eiropas Malignās Hipertermijas Grupas (EMHG) izstrādātām vadlīnijām (EMHG, 1984; Ording, 1997) veikts *in vitro* kontrakcijas tests (IVCT).

5.1. In vitro kontrakcijas tests

IVCT izmanto *m. Vastus medialis*, *m. Vastus lateralis* vai *m. Quadriceps* biopsijā iegūtus dzīvus muskuļu audus. Biopsiju ieteicams veikt izmantojot reģionālo vai vispārējo anestēziju, izvairoties no lokālas, infiltrējošas anestēzijas.

Izņemto muskuli tūlīt pēc izņemšanas ievieto Krebs-Ringer šķīdumā ar sekojošu sastāvu:

| | | |
|---------------------------------|-------|----------------------|
| NaCl | 118,1 | mmol l ⁻¹ |
| KCl | 3,4 | mmol l ⁻¹ |
| MgSO ₄ | 0,8 | mmol l ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 | mmol l ⁻¹ |
| Glikoze | 11,1 | mmol l ⁻¹ |
| NaHCO ₃ | 25,0 | mmol l ⁻¹ |
| CaCl ₂ | 2,5 | mmol l ⁻¹ |
| pH | 7,4 | |

Jonu koncentrācijai Krebs-Ringer šķīdumā jāatbilst iepriekšminētajām normām ar maksimālo pieļaujamo deviāciju $\pm 10\%$ robežās un to vēlams pārbaudīt katru mēnesi. pH jānodrošina no 7,35-7,45 37°C temperatūrā.

Uz laboratoriju muskuli jātransportē Krebs-Ringera šķīdumā pie vides temperatūras un laboratorijā to vēlams turēt karboksigenētu un pie istabas temperatūras. Laikam no biopsijas veikšanas līdz testu nobeigumam nevajadzētu būt garākam par 5 stundām. Testus vēlams veikt 37°C temperatūrā, audiem atrodoties audu vanniņā, Krebs-Ringera šķīdumā nodrošinot intermitējošu vai pastāvīgu šķīduma nomaiņas plūsmu, kā arī pastāvīgu šķīduma karboksigenizāciju. Jāveic vismaz četri testi, katru veicot ar atsevišķu audu paraugu. Jābūt diviem statistiskiem kofeīna testiem un diviem halotāna testiem, no kuriem savukārt viens var būt statistisks un viens dinamisks vai arī abi var būt statistiski. Katrai laboratorijai vēlams pieturēties pie vienas izvēlētās metodes. Katram aģentam vēlams izmantot atsevišķu vanniņu. *Muskuļa parauga izmēri*: Muskuļu paraugiem, kas domāti *in vitro* testiem, vēlams būt 15-20 mm gariem un 2-3 mm bieziem. Paraugu svaram vēlams būt no 100-200 mg. Paraugu sver pēc testa veikšanas, izvēloties to daļu, kas atradās starp ligatūrām.

Parauga garuma un pirmsizmeklējuma spēka noteikšana. Statiskos testus veic pie optimālā garuma (l_0), kuru nosaka 5 minūtes pēc parauga ievietošanas audu vanniņā un to lēnu stiepjot ar 2mN (0,2 g) spēku. Garums tiek mērīts starp uzliktajām ligatūrām (sākotnējais garums). Piecas minūtes muskuli atstāj minētajā iestiepumā, pēc tam uzsāk elektrisko stimulāciju un muskuļa paraugu pagarina līdz 150 ± 10 % no sākotnējā garuma, ko savukārt uzskata par optimālo garumu (l_0). Šo garumu atzīmē katram paraugam. Parauga garuma mērīšanas laikā Krebs-Ringera šķīduma karboksigenāciju pārtrauc.

Muskuli atstāj pie optimālā garuma (l_0) vismaz 15 minūtes, līdz bazālais muskuļa spēks nevariē vairāk par 2 mN (0,2 g) 10 minūšu periodā. Pēc iepriekšējo kritēriju sasniegšanas var pievienot medikamentus. Bazālais spēks tieši pirms medikamentu pievades tiek pierakstīts un tiek uzskatīts par pirms-medikamentu spēku.

Elektriskā stimulācija. Lai pierādītu parauga dzīvotspēju stimulē muskuļa paraugu ar 1-2 ms garu, supramaksimālu, elektrisku stimulu ar frekvenci 0,2 Hz. Pēc muskuļa parauga ievietošanas audu vanniņā un sākotnējā garuma mērīšanas lēnām tiek paaugstināts spriegums (voltāža) līdz kontrakciju augstums vairs nepaaugstinās (sākotnējā stimula intensitāte). Lai sasniegtu supramaksimālu stimulāciju spriegumu paaugstina līdz 120% no sākotnējā stimula intensitātes.

Statiskais kumulatīvais kofeīna tests un kofeīna slietšņa noteikšana. Kofeīna koncentrāciju (kā brīvu bāzi) audu vanniņā ieteicams paaugstināt pakāpeniski ar sekojošām koncentrācijām: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; un 32,0 mmol l⁻¹. Katru sekojošo kofeīna devu vēlams pievadīt līdzko ir sasniegts maksimālais iepriekšējās kofeīna devas ierosinātais kontrakcijas plato, vai arī pēc 3 minūtēm, kad muskulis bijis eksponēts iepriekšējai kofeīna devai bez notikušas kontrakcijas. Muskuli neskalo ar svaigu Krebs-Ringer šķīdumu starp sekojošām kofeīna devām. Kofeīnu audu vanniņā vēlams ievadīt bolusa veidā ar injekcijas palīdzību vai ar strauju perfūziju. Ir jāsasniedz ātra kofeīna koncentrācijas nomaiņa.

Šī testa rezultāts ir kofeīna slietšņa koncentrācija, kas ir zemākā koncentrācija, kas izraisa pastāvīgu kontrakcijas spēka pieaugumu par vismaz 2 mN (0,2 g) no izejas spēka zemākā rezultāta. Papildus vēlams norādīt maksimālo kontrakcijas spēku pie 2 mM kofeīna šķīdumā. Zemākais spēks ne vienmēr ir pirms-medikamentu spēks.

Statiskais halotāna tests un statiskā halotāna slietšņa noteikšana. Halotāna slietšni iegūst izmantojot halotānu sekojošās koncentrācijās: 0,11; 0,22; 0,44; un 0,66 mmol l⁻¹ kas ir attiecīgi ekvivalentas 0,5; 1,0; 2,0 un 3,0 tilpuma %. Paraugu katrai halotāna koncentrācijai eksponē 3 minūtes. Halotāna slietšņa noteikšana ir līdzīga kofeīna slietšņa noteikšanai. Testa beigās jānorāda maksimālo kontrakcijas spēku pie halotāna koncentrācijas 0,44 mmol l⁻¹.

Gāzu plūsmai jābūt pietiekošai, lai uzturētu pareizu halotāna koncentrāciju audu vannīnā. Gāzes plūsmu audu vannīnai kontrolē ar zemas plūsmas rotamētru vai līdzīgu ierīci, kas pieslēgta tuvu audu vannīnas gāzes pievades ligzdai. Jānosaka laiks, kas ir nepieciešams vienmērīgai halotāna koncentrācijas iegūšanai audu vannīnā, lai muskuļu paraugs pavadītu nepieciešamo ekspozīcijas laiku pie noteiktās koncentrācijas. Vienmērīgas koncentrācijas iegūšanas laiks ir atkarīgs no audu vannīnas tilpuma, gāzes un perfūzijas plūsmas ātruma, kā arī no sistēmas aerodinamikas.

Dinamiskais halotāna tests un dinamiskā halotāna sliekšņa noteikšana. Tests ir atkarīgs no motora. Sākotnēji muskuli pagarina ar konstantu ātrumu 4 mm min^{-1} līdz aptuveni sasniegts 30 mN (3 g) spēks un muskulis tiek turēts pie šāda iestiepuma 1 minūti . Iestiepumu pārtrauc uz $1,5 \text{ minūtēm}$. Tiek mērīts transduktora kustības attālums laikā no muskuļa 1 minūtes atpūtas laika beigām līdz zema spēka līmenim ar Verniera skalas palīdzību. Šis mērījums tiek izmantots, lai iegūtu visas sekojošās garuma / iestiepuma līknes. Muskulis katra sekojoša cikla laikā tiek iestiepts par 6 mm un noturēts augsta spēka (iestiepuma) līmenī 1 minūti un pēc tam ļauj muskulim atslābt un atrasties zema spēka (iestiepuma) līmenī 3 minūtes . Šo procesu atkārto 3 reizes , lai iegūtu $3 \text{ kontroles līknes}$. Trešās kontroles līknes lejupejošās daļas beigās muskuļa paraugu 3 minūtes eksponē $0,11 \text{ mmol l}^{-1}$ halotāna ($0,5\%$) un pēc tam atkārto iestiepuma procesu. Procedūru atkārto ar $0,22$ un $0,44 \text{ mmol l}^{-1}$ halotāna (1 un 2%). Spēku mēra augsta spēka (iestiepuma) līmenī tieši pēc iestiepuma beigšanas. Dinamiskais halotāna sliekšnis ir zemākā halotāna koncentrācija, pie kuras muskuļa parauga spēks paaugstinās par 2 mN ($0,2 \text{ g}$). Atzīmē arī maksimālo kontrakciju pie $0,44 \text{ mmol l}^{-1}$ halotāna.

5.1.1. IVCT diagnostiskie kritēriji

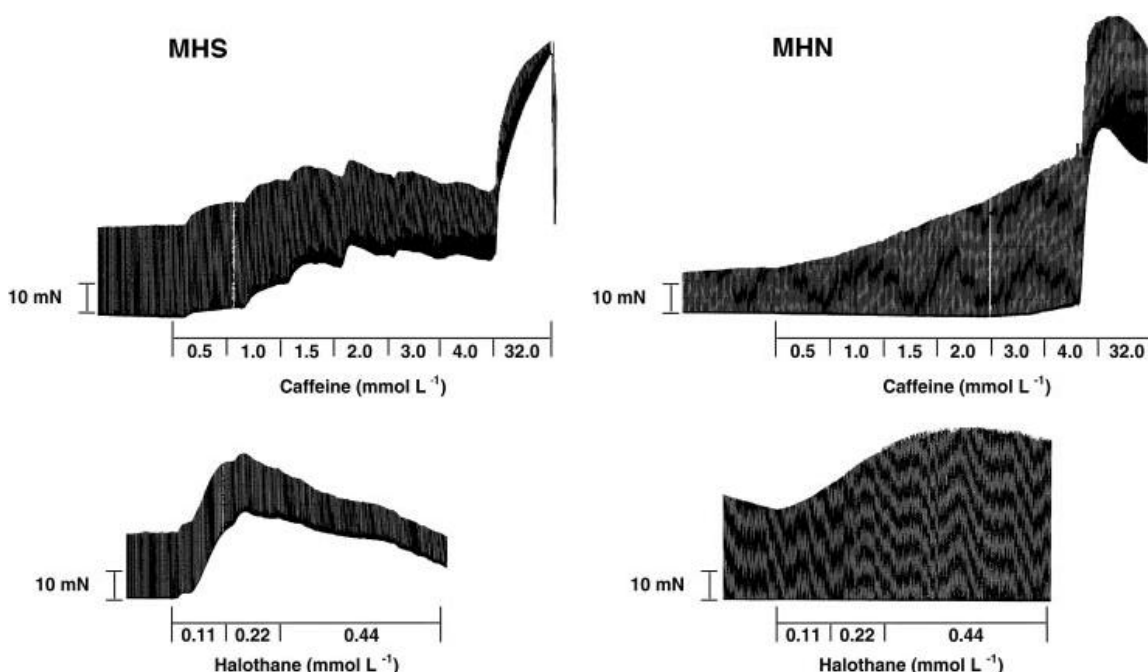
Uzņēmīgs pret maligno hipertermiju (ang. *malignant hyperthermia susceptible* – MHS): Kofeīna sliekšnis noteikts pie kofeīna koncentrācijas $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ vai mazāk un halotāna sliekšnis noteikts pie halotāna koncentrācijas $0,44 \text{ mmol l}^{-1}$ vai mazāk.

Neuzņēmīgs pret maligno hipertermiju (ang. *malignant hyperthermia negative* – MHN): Kofeīna sliekšnis noteikts pie kofeīna koncentrācijas 3 mmol l^{-1} vai vairāk un halotāna sliekšnis noteikts pie halotāna koncentrācijas $0,44 \text{ mmol l}^{-1}$ vai vairāk.

Uzņēmība pret maligno hipertermiju apšaubāma, ja iegūts pozitīvs rezultāts pārbaudē tikai ar vienu izraisošo aģentu (MHEc vai MHEh).

Visus pārējos rezultātus uzskata par apšaubāmiem, bet tos apraksta kā MHEh, ja muskuļa paraugs reaģē tikai uz halotānu vai MHEc, ja tas reaģē tikai uz kofeīnu. Uzskata, ka

MHE pacienti klīniski jāuzskata par MH uzņēmīgiem. Testa rezultātu paraugs parādīts 5.1. attēlā.



5.1. att. *In vitro* kontrakcijas testa līknes. *In vitro* kontrakcijas testa līknes ar kofeīnu (augšējās līknes) un ar halotānu (apakšējās līknes) skeleta muskuļa paraugam pret Maligno hipertermiju uzņēmīgam (MHS; kreisās puses līknes) un pret Maligno hipertermiju neuzņēmīgam (MHN; labās puses līknes). Muskuļa neatslābstošas kontrakcijas sākšanās pie zemākas kofeīna un halotāna koncentrācijas apstiprina Malignās hipertermijas diagnozi. (Wappler, 2001).

EMHG apstiprinātais IVCT protocols apliecinājis 99% jutīgumu un 93.6% specifitāti (Ording *et al.*, 1997).

5.1.2. Kvalitātes kontrole

Paraugu dzīvotspēju vēlams demonstrēt ar kontrakcijām, kuru spēks ir ne mazākas par 10 mN (1 g) testa sākumā, vai arī ar kontrakcijām kofeīna testa beigās pie kofeīna koncentrācijas 32 mmol l⁻¹, kuru spēks nav mazāks par 50 mN (5 g).

Kofeīna un halotāna koncentrācijas audu vanniņā vēlams noteikt ik pēc trīs mēnešiem. Paraugus kontrolei vēlams ņemt tieši no audu vanniņas tādos pašos dinamiskos apstākļos, kā testēšanas laikā. Paraugus halotāna koncentrācijas noteikšanai vēlams ņemt pēc gāzu plūsmas apturēšanas lai novērstu paraugu ņemšanu tieši no gāzes plūsmas avota. Halotāna koncentrāciju var noteikt izmantojot GLC vai HPLC (gāzu hromatogrāfiju) un kofeīna koncentrāciju lietojot UV spektroskopiju. Vēlams pārbaudīt halotānu pie koncentrācijas 0,44

mmol l⁻¹ un kofeīnu pie koncentrācijas 2 un 32 mmol l⁻¹. Pieļaujamās maksimālās deviācijas no normas ir ± 10%. Halotāna lambada (gaiss/Krebs-Ringer šķīdums) ir aptuveni 0,72 pie 37°C. Izтваikotājus vēlams pārbaudīt reizi gadā. Ieteicams monitorēt halotāna koncentrāciju tuvu pie audu vannīņas gāzu pievades porta. Vēlams kontrolēt audu vannīņas satura temperatūru.

Kontroles biopsijas. Ieteicams visām MH pētīšanas vienībām veikt kontroles muskuļu biopsijas saskaņā ar šo protokolu. Sekojoši pacienti tiek uzskatīti par atbilstošiem: veseli brīvpārīgi indivīdi, pacienti, kuriem teikt veiktas amputācijas sakarā ar lokālu slimību (ne sistēmisku slimību vai vaskulāru slimību), pacienti ar varikozām vēnām, smadzeņu nāves pacienti pirmo 24 stundu laikā, pacienti ar lūzumiem pirmajās 24 stundās.

5.1.3. Alternatīvie testi

Var veikt testus arī ar citiem medikamentiem, tomēr rezultāti netiek izmantoti diagnostikai. Tomēr lai varētu salīdzināt centru rezultātus ieteicams testus veikt vienveidīgi, kā noteikusi EMHG direktoru valde. Šobrīd pastāv protokoli rianodīnam un *4-chloro-m-cresolam*. Šos protokolus iespējams iegūt no EMHG.

Ja diagnoze apstiprinās, jāizmeklē visi tiešie radinieki sākot no pirmās pakāpes radiniekiem. Šobrīd tiek izstrādātas arvien jaunas diagnostikas metodes un, atbilstoši (EMHG) apstiprinātajam protokolam, jāveic arī ģenētiskā analīze. Pašlaik, ģenētiskajiem izmeklējumiem kļūstot arvien pieejamākiem, tie jāuzskata par primāro skrīninga metodi, jo ir mazāk invazīvi, vieglāk veicami un nav bīstami pacientam. Bērniem iesaka veikt tikai ģenētisku izmeklēšanu un IVCT veikt pēc 18 gadu vecuma sasniegšanas. Pacientu drošības apsvērumu dēļ rekomendē veikt IVCT arī negatīva DNS izmeklējuma rezultātā, lai izvairītos no viltus negatīva rezultāta. Pilnīgi pāriet uz molekulāro diagnostiku nav iespējams, jo regulāri tiek atrastas un pierādītas jaunas izraisošās mutācijas, ko apliecina arī veiktais pētījums. Šobrīd tiek izstrādātas un aprobētas arvien jaunas metodikas, piemēram, rianodīna kontrakcijas tests, kombinēts rianodīna un halotāna/kofeīna tests, kontrakcijas sākuma laika mērījumi un kalcija homeostāzes mērījumi muskuļušķiedru miotubuļos (Weisshorn *et al.*, 2004; Bendahan *et al.*, 2004; Wehner *et al.*, 2004), lai paaugstinātu metodes jutību.

5.2. RYR1 gēna mutāciju diagnostika

RYR1 gēna mutāciju analīzei izmanto divas dažādas pieejas: mērķtiecīga mutāciju analīze un mutāciju skrīnings ar tiešās sekvenēšanas analīzi.

Biežāk sastopamas mutācijas *RYR1* gēnā ir konstatētas apmērām 25%-30% indivīdu ar aizdomām par maligno hipertermiju (MHS) (Robinson *et al.*, 2002). Dažās populācijās,

piemēram, Šveicē, mutāciju spektrs ir limitēts populācijas homogenitātes dēļ (Girard *et al.*, 2001).

Mērķtiecīgai mutāciju noteikšanai izmanto polimerāzes ķēdes reakciju (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) ar tai sekojošu šķelšanu ar restrikcijas endonukleāzēm. PCR ļoti plaši izmanto visdažādākajās bioloģijas un medicīnas nozarēs, kā arī diagnostikā, DNS fragmentu pavairošanai.

Metodes būtībā ir DNS amplifikācija (pavairošana), ko veic termostabils ferments (*Taq* polimerāze). PCR balstās uz 20 - 40 reižu atkārtotiem DNS sintēzes cikliem ar dažādu temperatūras režīmu. Ar katru nākamo ciklu DNS daudzums pieaug divas reizes. Katru sintēzes ciklu veido trīs reakcijas posmi: DNS denaturācija, praimeru hibridizācija un DNS sintēze. Mutācijas rašanās rezultātā DNS secībā parādās vai pazūd kāda specifiska restrikcijas fermenta šķelšanas vieta (restrikcijas saits). Konkrētas mutācijas noteikšanai pavairotu PCR produktu šķeļ ar attiecīgo restrikcijas endonukleāzi un vizualizē elektroforēzē, kur restrikcijas fragmenti sadalās pēc garuma.

Ņemot vērā, ka vairāk kā 180 mutācijas *RYR1* gēnā ir saistītas ar MH un/vai CCD fenotipu, no kurām vairāk kā puse ir „privātā” – atrasta tikai vienā ģimenē, mērķtiecīga mutāciju meklēšana var būt ilgstoša, darbietilpīga un dārga (Rosenberg *et al.*, 2010).

RYR1 gēna mutācijas galvenokārt lokalizētas trīs reģionos starp 35. un 614. (N-termināls), 2163. un 2458. (sarkoplazmatiskā tīkla membrānā) un 4214. un 4806. aminoskābju atlikumiem (C- terminālajā starpmembrānu zonā) (Jurkat-Rott *et al.*, 2000; McCarthy *et al.*, 2000; Rueffert *et al.*, 2002; Monnier *et al.*, 2005.). Tomēr mutācijas MH ģimenēs ir sastopamas arī ārpus šiem reģioniem (Galli *et al.*, 2006). Tāpēc mutāciju analīzei heterogēnās populācijās ir lietderīgāk izmantot tiešās sekvenēšanas metodi, kas nosaka DNS fragmentu nukleotīdu secību un paaugstina mutāciju noteikšanas iespējas līdz 70%-80% [Sambuughin *et al.*, 2005; Galli *et al.*, 2006).

6. Malignās hipertermijas ārstēšana

Veiksmīgas ārstēšanas pamatā ir savlaicīga diagnoze. Aizdomīgos gadījumos rīcībai jābūt acumirklīgai un situācijas nopietnību nav iespējams pārvērtēt.

Gaistošo anestēzijas līdzekļu lietošana jāpārtrauc. Jāuzsāk pacienta „hiperventilācija” ar 100% skābekli, svaigo gāzu plūsmai un pacienta kontūra tipam jābūt tādām, kas veicina anestēzijas vielas izvadi no organisma. Anestēzija tiek turpināta ar intravenozi ievadāmiem medikamentiem. Operācija jābeidz iespējami ātri. Jāizmanto fizikālas atdzesēšanas metodes, t.i., aukstu šķīdumu intravenoza ievade, ledus pūšļi uz lielajām artērijām, dzesējoši palagi.

Lietderīga ir arī kuņģa skalošana un klizmas ar ledusūdeni. Jāseko, lai nerastos perifēra vazokonstrikcija, kas padara neefektīvus iepriekšminētos pasākumus. Ja ir iespējams smagos gadījumos var izmantot hemodialīzes vai mākslīgās asinsrites iekārtas temperatūras pazemināšanai.

Agrīni jāuzsāk Dantrolēna infūzija. Dantrolēns ir vienīgais medikaments, kas ierobežo kalcija jonu uzkrāšanos muskuļu šūnās kavējot Ca^{++} jonu pārvietošanos no sarkoplazmātiskā tīkla uz t-tubulu sistēmu. Vienā flakonā ir 20 mg dantrolēna un 3 g mannitola. Nepieciešams veikt atkārtotas dantrolēna infūzijas (20 mg pieaugušiem un 1mg/kg bērniem, kuru svars nepārsniedz 20 kg), līdz sāk samazināties tahikardija, temperatūra un $EtCO_2$. Parasti deva ir $2,5 - 3 \text{ mgkg}^{-1}$, bet tā var sasniegt 20 mgkg^{-1} . Var būt nepieciešamas atkārtotas dantrolēna devas turpmāko 48 stundu laikā, ja atjaunojas slimības simptomi. Savlaicīgi uzsākot ārstēšanu dantrolēns ir ļoti efektīvs.

Acidozi un hiperkaliēmiju ārstē ar Na bikarbonāta un glikozes ar insulīnu infūzijām. Diurēzi nodrošina ar aukstu kristaloīdu šķīdumu ievadi un mannitolu, ko ievada kopā ar dantrolēnu. Lai izvairītos no nieru kanālīšu bojājuma ar mioglobīnu, jānodrošina diurēze $2 \text{ mlkg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Vēlams, lai urīna reakcija būtu sārmaina. Ja urīna izvade ir nepietiekama, ieteicama papildus mannitola ievade. Koagulopātijas un aritmijas ārstē kā parasti, tikai jāizvairās no kalcija kanālu blokatoriem, jo kombinācijā ar dantrolēnu tie var izraisīt nopietnu miokarda depresiju.

Abos zināmajos gadījumos Latvijā pacienti mira 3 un 4 stundu laikā no anestēzijas sākuma. Otrajā gadījumā uzreiz radas aizdomas par MH un tika uzsākta adekvāta ārstēšana, izņemot dantrolēna ievadi, kas tobrīd un arī pašlaik nav pieejams Latvijas slimnīcās. Dantrolēna rezerves nepieciešamību apliecina arī Polijas pieredze, kur 2003. gadā bija 23 MH gadījumi, no kuriem 2 beidzās letāli. Abos gadījumos liktenīgs bija „pāra likums”, jo dantrolēns bija izlietots iepriekšējā pacienta ārstēšanai, bet rezerves vēl nebija atjaunotas.

Protams, vislabākā ārstēšana ir profilakse, izvairoties no potenciāli bīstamu medikamentu lietošanas. Vācijā pēc Sukcinilholīna lietošanas ierobežošanas, MH manifestācija dažos gados samazinājās desmitkārtīgi. Tāpat milzīga nozīme ir pacientu radnieku izmeklēšanai un diagnozes apstiprināšanai, lai novērstu potenciālo pacientu kontaktu ar gaistošiem anestēzijas līdzekļiem un Sukcinilholīnu. Rīcības secība apkopota 1. attēlā pielikumā.

7. Anestēzija pacientiem ar aizdomām par MH

Malignā hipertermija nav kontrindikācija anestēzijai. Šiem pacientiem nedrīkst lietot trigervielas – gaistošos anestētiķus un Sukcinilholīnu. Ja iespējams, jāizvēlas reģionālā anestēzija. Vispārējās anestēzijas gadījumā rūpīgi jā sagatavo anestēzijas iekārta – pirms anestēzijas uzsākšanas jānoņem iztvaikotāji, jānomaina pacienta kontūrs un izmantojot 100% skābekli ar maksimālu plūsmu jāveic kontūra ventilācija vismaz 20 līdz 30 minūtes. Drošie un bīstamie medikamenti uzskaitīti 5. tabulā pielikumā.

Monitorējamie parametri: temperatūra (perifēri un centrāli), EtCO₂, pulsa oksimetrija, jābūt pieejamām asins gāzu un elektrolītu analīzēm. Daži autori iesaka invazīvu asinsspiediena monitorēšanu ar artērijas kanulāciju.

Dantrolēnam un papildus ārstēšanas iespējām jābūt ātri pieejamām. Viena pacienta ārstēšanai vidēji nepieciešami 20 flakoni (400 mg) dantrolēna. Ja visi uzskaitītie pasākumi tiek veikti, anestēzija MH pacientiem nav bīstama. Dantrolēna profilaktiskai lietošanai nav nozīmes, jo nenotiek saskare ar trigervielām, iespējams tikai iegūt medikamenta izraisītās blaknes – nelabu dūšu, vemšanu, muskuļu vājumu un nedepolarizējošo miorelaksantu darbības pagarināšanos.

II MATERIĀLS UN METODES

1. Pacienti

Apkopojot LARA datus tika atrastas un apsekotas divas ģimenes (AN ģimene un AS ģimene), kuru piederīgajiem, iespējams, bija MH. Abos gadījumos pacienti mira 3 līdz 4 stundu laikā pēc anestēzijas sākuma ar MH tipiskiem simptomiem.

AS pacienta gadījumā tika novērota ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, straujš temperatūras pieaugums, sīnusa tahikardija, kas pēc MH klīniskā novērtējuma skalas atbilst 43 punktiem. AN gadījumā - ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, kreatīnkināzes pieaugums līdz 1616 vienībām, EtCO₂ - 80 mmHg, straujš temperatūras pieaugums līdz 40.8°C un sīnusa tahikardija līdz 150 reizēm minūtē. Abos gadījumos nebija pieejama asins gāzu analīze un terapija ar Dantrolēnu un AS gadījumā arī CO₂ koncentrācija izelpas gaisā. Abos gadījumos klīniskā aina liecina par ļoti augstu MH manifestācijas iespējamību.

No AS ģimenes pētījumā piedalījās divi iespējamā MH slimnieka asinsradinieki: probanda māte (II-1) un māsa (III-1).

No AN ģimenes piedalījās iespējamā MH slimnieka visi Latvijā dzīvojošie asinsradinieki: probanda māsa (II-3), dēls un meita (III-3 un III-4 attiecīgi), mazmeitas (IV-2 un IV-3), māsasmeita (III-7) un māsas mazmeita (IV-4).

2. Pacientu DNS paraugu molekulārā diagnostika

2.1. Ģenoma DNS izdalīšana

Ģenoma DNS izdalīšanai izmanto MBI "Fermentas" (Lietuva) ražotu reaģentu komplektu, kas paredzēts ģenoma DNS izdalīšanai no sasaldētām vai svaigām perifērām cilvēka asinīm. Izdalīto DNS izmanto PCR reakcijai, šķelšanai ar restriktāzēm, Sauzerna hibridizācijai, DNS sekvenēšanai.

Aparatūra un piederumi:

1. Centrifūga *IEC Micromax RF* ("International Equipment Company", USA)
2. Termostats TS-80 (PSRS)
4. Saldētava "IGNIS" (Norvēģija)
5. Maisītājs *Maxi-Mix 1* ("Barnstead/Thermolyne Corporation", USA)
6. Sterili stobriņi ar K3EDTA
7. Stobriņi 1.5 ml ("*Eppendorf*", Vācija)
8. Vienkanāla pipetes ar maināmu tilpumu Finntip Digital ("*Labsystems*", Somija)
9. Parastie uzgaļi un sterilie uzgaļi ar filtru pipetēm Finntip ("*Labsystems*", Somija)

Reaģentu saraksts :

1. Reaģentu komplekts genoma DNS izdalīšanai "Fermentas" (Lietuva):

- ✓ Lizēšanas šķīdums
- ✓ 10x nogulsnēšanas šķīdums
- ✓ 1.2 M NaCl šķīdums

2. 96° etanols

3. Sterils, dejonizēts ūdens

4. 1xTE buferšķīdums pH 7.5 (atšķaidīts 10 reizes 10xTE buferšķīdums pH 7.5)

Darba gaita:

Materiāls

5.0-7.0 ml venozās asinis vakutainērā ar K3EDTA

Parauga sagatavošana

1. Izmanto 600 µl svaigas asinis, lai izdalītu 10 -30 µg genoma DNS. Vienam pacientam paralēli izdala divus DNS paraugus.

2. 0.6 ml asins + 0.9 ml ddH₂O, samaisa un centrifugē 2 min pie 10 000 apg/min.

3. Noņem augšējo fāzi un pievieno 200 µl 1xTE bufera, samaisa un pievieno 400 µl lizēšanas šķīduma.

4. Inkubē 30 min pie 60°C līdz šūnu lizei, ja nepieciešams, tad līdz pilnīgai šūnu lizēšanai inkubē 12 stundas.

DNS izdalīšana

1. Pievieno 600µl hloroforma un samaisa ar vorteksu, centrifugē pie 12 000 apg/min 6 min

2. Pagatavo 1x precipitācijas šķīdumu: 80µl 10x precipitācijas šķīdums + 720µl sterils dsH₂O (vienam paraugam).

3. Augšējo fāzi, kas satur DNS, pārnes jaunā stobriņā un pievieno 800µl svaiga 1x precipitācijas šķīduma, samaisa un centrifugē pie 14 000 apg/min 6 min.

4. Augšējo fāzi pārnes stobriņā ar precipitācijas šķīdumu, samaisa un centrifugē 6 min. pie 14 000 apg/min.

5. Noņem supernatantu nost un nogulsnes izšķīdina 100 µl 1.2M NaCl.

6. Pievieno 300µl auksta 96% etanola (-20°C), samaisa un inkubē 10 min. pie -20°C.

7. Paraugus centrifugē 6 min. pie 14 000 apg/min., noņem nost augšējo fāzi un pievieno 100 µl auksta 75% etanola, centrifugē 6 min. pie 14 000 apg/min.

8. Noņem metanolu un paraugus žāvē 2 min pie 37°C vai 15 min pie ist. temperatūras.

9. Paraugiem pielej 50µl 1xTE buferšķīduma, inkubē 1-2 dienas pie istabas temp.

10. Genoma DNS atšķaidītu 1xTE buferšķīdumā glabā pie -20°C neierobežotu laiku.

Paraugus pārbauda 0.75% agarozes gēlā 1XTAE bufera ~100V.

2.2. Mutāciju noteikšana

Pa vienam DNS paraugam no katras ģimenes tika nosūtīts uz MH laboratoriju Nijmegenā (Nīderlande) – AS pacientes mātes un AN pacienta meitas un Leipcigā (Vācija) – AS pacientes māsas un AN pacienta māsas.

Nijmegenā tika veikta asins paraugu pārbaude izmantojot *SALSA MLPA kit P281/P282 RYR1* ar kura palīdzību pārlicinās par 33 specifisku punktveida mutāciju esamību cilvēka *RYR1* gēnā (4. tabula pielikumā). Analīzes tika veiktas atbilstoši *SALSA MLPA KIT P281-A2/P282-A2 RYR1* reaģentu komplekta protokolam (www.mrc-holland.com).

Leipcigā tika veikta pilna *RYR1* gēna sekvenēšanas analīze nosūtītajos DNS paraugos. Balstoties uz Leipcigas MH laboratorijas rezultātiem, pārējiem AN ģimenes locekļiem (probanda dēlam un meitai (III-3 un III-4 attiecīgi), mazmeitai (IV-2 un IV-3), māsasmeitai (III-7) un māsas mazmeitai (IV-4).) un 100 kontroles paraugiem sekvenēšanas analīze tika veikta Latvijā BKUS Medicīniskās ģenētikas klīnikā.

2.2.1. DNS paraugu tiešās sekvenēšanas analīze

DNS sekvenēšana ir kompleksa metode, kas sastāv no vairākiem secīgiem etapiem: PCR, PCR fragmentu attīrīšana, PCR amplifikācija ar vienu praimeru un fluorescentām iezīmēm, PCR produktu attīrīšana un tieša sekvenēšana (DNS fragmenta nukleotīdu secības noteikšana).

Aparatūra un piederumi:

1. Horizontālais mini-gelelektroforēzes aparāts (“*Sigma*”, USA)
2. Transiluminātors FX-20 M (“*Vilbers Lourmat*”, Francija)
3. Fotodokumentācijas sistēma *GeneSnap* (“*Syngene*”, UK)
4. PCR aparāts *Mastercycler* (“*Eppendorf*”, Vācija)
5. Maisītājs *Maxi-Mix 1* (“*Barnstead/ThermoLyne Corporation*”, USA)
6. Centrifūga *Micromax RF* (“*International Equipment Company*”, USA)
7. ABI PRISM 310 ģenētiskais analizators (“*Applied Biosystems*”, USA)
8. Vienkanāla pipetes ar maināmo tilpumu *Finnpipette*, *Thermo* (“*Labsystems*”, Somija)
9. Parastie uzgaļi un sterilie uzgaļi ar filtru pipetēm *Finntip* (“*Labsystems*”, Somija)
10. PCR stobriņi 0.5 ml /0.2 ml (“*Eppendorf*”, Vācija)
11. Stobriņi 1.5 ml (“*Eppendorf*”, Vācija)

Reāģenti:

1. *Thermus aquaticus* DNS polimerāze (5u/μl)/dabiskā ar vērša sēruma albumīnu/ ar reaģentu komplektu (MBI “*Fermentas*”, Lietuva):

- ✓ 10xPCR buferšķīdums pH 8.5
- ✓ 25 mM magnija hlorīda šķīdums (MgCl₂)
- ✓ 20 mg/ ml vērša sēruma albumīna šķīdums

2. 2 mM dezoksinnukleotīdtrifosfāta (dNTP) šķīdums (MBI “*Fermentas*”, Lietuva)

3. PCR fragmentu marķieris pUC19 DNS/MspI (MBI “*Fermentas*”, Lietuva)

4. 6xBromfenola zilās krāsas šķīdums (MBI “*Fermentas*”, Lietuva)

5. 10xTris-borata EDTA (TBE) buferšķīdums pH8.3 (“BioRad”, USA)

7. Praimeru komplekts (Tammaro *et al.*, 2003) (“*MWG*”, Vācija)

8. Agarozē (“*Roche*”, Vācija)

9. 1 mg/ml Etīdija bromīda šķīdums (“*Sigma*”, USA)

10. *BigDye[®] Terminator v3.1* standarta reaģentu komplekts sekvencēšanai (“*Applied Biosystems*”, USA)

11. Etanols 96% un 70%

12. ddH₂O

Darba gaita:

RYR1 gēna eksonu amplifikācija izmantojot atbilstošus praimerus un PCR režīmu (Tammaro *et al.*, 2003).

Materiāls

Amplifikācijai izmanto 1.5 μl genoma DNS.

PCR maisījums

50-100 ng genoma DNS (1.5 μl DNS) amplificē 25 μl amplifikācijas šķīdumā. Amplifikācijas šķīduma sastāvs vienam paraugam:

| <i>Reaģenti</i> | <i>Daudzums</i> |
|-------------------------------|-----------------|
| 10xPCR bufers | 2,5 μl |
| 25mM MgCl ₂ | 1,5 μl |
| 2mM dNTP | 2,5 μl |
| Praimers (atbilstoši eksonam) | 1,0 μl |
| Praimers (atbilstoši eksonam) | 1,0 μl |
| ddH ₂ O | 15,25 μl |
| DNS | 1,0 μl |
| <i>Taq</i> polimerāze | 0,25 |
| Kopējais tilpums | 25 μl |

PCR režīms:

| Temperatūra | Laiks |
|--------------------|--------------|
| 95°C | 10min |
| Viens cikls | |
| 95°C | 30sek |
| 56°C | 90sek |
| 68°C | 90sek |
| 30 cikli | |
| 68°C | 10min |
| Viens cikls | |

Amplifikācijas rezultātus vizuālizē UV gaismā ar transiluminātoru palīdzību. PCR produktu attīrīšanai pēc amplifikācijas no liekiem dNTP un praimeriem izmanto centrifugēšanu *Millipore* kolonnās.

Attīrīto paraugu amplifikācija

Attīrītos PCR produktus amplificē ar katru specifisku praimeru/oligonukleotīdu atsevišķi.

Amplifikācijas šķīduma sastāvs vienam paraugam:

| Reaģents | Daudzums |
|-------------------------------------|-----------------|
| 5x BigDye bufers | 4,0 µl |
| BigDye [®] Terminator v3.1 | 4,0 µl |
| Paraimers F/R | 1,0 µl |
| PCR produkts | 1-3 µl |
| ddH ₂ O | līdz 10 µl |
| Kopējais tilpums | 10 µl |

PCR režīms:

| Temperatūra | Laiks |
|--------------------|--------------|
| 96°C | 10`` |
| 50°C | 5`` |
| 60°C | 4` |
| 25 cikli | |
| 4°C | |

PCR produktu attīrīšana

- 20µl PCR produkta pievieno 5µl 125mM EDTA (1,25µl 0,5M EDTA + 3,75µl ddH₂O) un 62,5 µl 96% metanola. Samaisa ar vorteksu.
- Inkubē pie istabas temperatūras apmēram 1 stundu. Centrifugē 20 min. pie 14000 apg/min.

3. Noņem supernatantu un pievieno 120µl 70% etanola. Samaisa ar vorteksu un centrifugē 10 min pie 14 000 apg/min.
4. Noņem supernatantu un nogulsnes žāvē istabas temperatūrā 1 stundu. Paraugus glabā saldētavā pie -20°C.

Paraugu sekvenēšana

Izžāvētiem paraugiem pievieno 12-25 µl dejonizēta formamīda. Denaturē 5 min pie 95°C un atdzesē ledū vismaz 3 min. Paraugus ievieto ABI PRISM 310 ģenētiska analizatora statīvā un analīze sākas blokam sasniedzot 50°C.

Rezultāti: Katram paraugam noteikto nukleotīdu secību salīdzina ar *RYRI* gēna fragmenta standarta secību. Atrastas izmaiņas salīdzina ar aprakstīto mutāciju sarakstu *RYRI* gēna datu bāzē.

3. In vitro kontrakcijas tests

In vitro kontrakcijas tests tika veikts atbilstoši EMHG protokolam (Ording *et al.*, 1997) atbilstoši EMHG prasībām akreditētā Leipcigas Universitātes MH laboratorijā. Pēc rakstiskas pacientu informēšanas piekrišanas saņemšanas operāciju zālē sterilos apstākļos tika veikta labās puses augšstilba ādas dezinfekcija ar Cutasept šķīdumu, veikta ādas un zemādas audu infiltrācija ar 15ml 1% Xylanest šķīduma. Augšstilba vidējā trešdaļā atbilstoši *M. Vastus medialis* projekcijas vietai tika veikts ādas grieziens, pārdalīti zemādas taukaudi un atpreparēts muskulis. No tā tika paņemts muskuļa paraugs apmēram 1x1x2.5 cm, kurš tika ievietots Krebsa – Ringera šķīdumā, kura sastāvs aprakstīts sadaļā “Diagnozes apstiprināšana”, tam tika pievadīts skābeklijs ar plūsmas ātrumu 4 l/min un transportēts uz MH laboratoriju IVCT veikšanai.

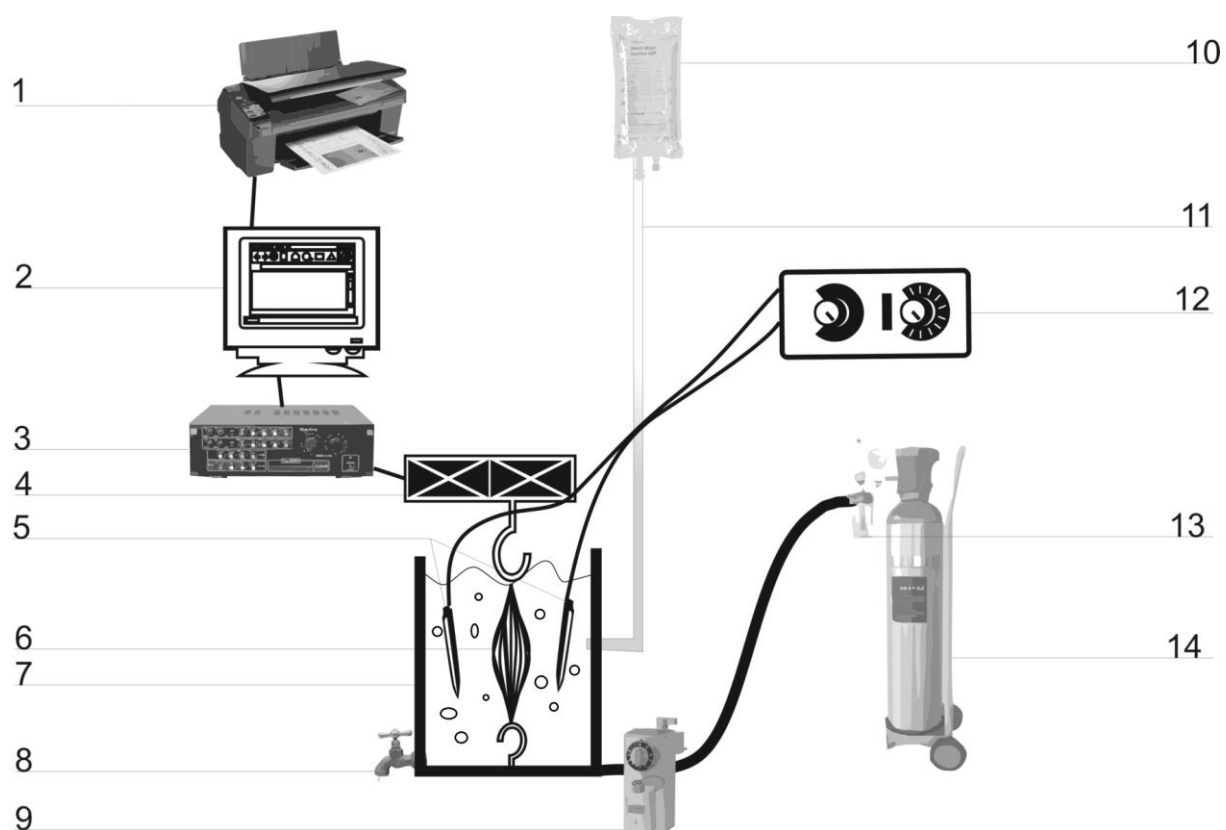
Laboratorijā muskuļa paraugs tika sadalīts 6 daļās- divas no tām tika izmantotas statiskā kofeīna testa, divas statiskā halotāna testa veikšanai, no vienas daļas tika iegūts materiāls miotubuļu kultūras audzēšanai, viens paraugs tika saglabāts MH laboratorijas audu bankā, lai, nepieciešamības gadījumā, varētu veikt atkārtotu molekulāro diagnostiku. IVCT tika veikts ar Leipcigas Universitātes MH laboratorijā izveidotu iekārtu, kuras uzbūves principi attēloti sekojošā shēmā:

3.1. IVCT diagnostiskās iekārtas uzbūve:

In vitro kontrakcijas testam izmantojām Leipcigas Universitātē būvēto iekārtu, kura sastāv no sekojošām daļām:

Muskuļu peldes ar Ringera-Krebsa šķīdumu, kur iestiprināts pacienta muskuļa paraugs. Muskuļu peldē ar termostata palīdzību pastāvīgi tiek uzturēta 37.0°C temperatūra un pievadīts skābekļa un ogļskābās gāzes maisījums. Peldē muskulim abās pusēs novietoti stimulācijas elektrodi, ar kuru palīdzību tiek nodrošinātas regulāras muskuļa kontrakcijas-impulsa garums 1 milisekunde un frekvence 0,2 Hz (1 impulss ik 5 sekundes).

Muskuļa saraušanās spēks tiek reģistrēts ar signāla pārveidotāja palīdzību. Iegūtā informācija tiek apstrādāta ar datorā ar speciālas programmas palīdzību un tiek pārveidota drukāšanai pieejamā formā. Pēc tam iegūtie rezultāti tiek analizēti, lai apliecinātu vai izslēgtu MHS. IVCT iekārtas shēma parādīta attēlā.



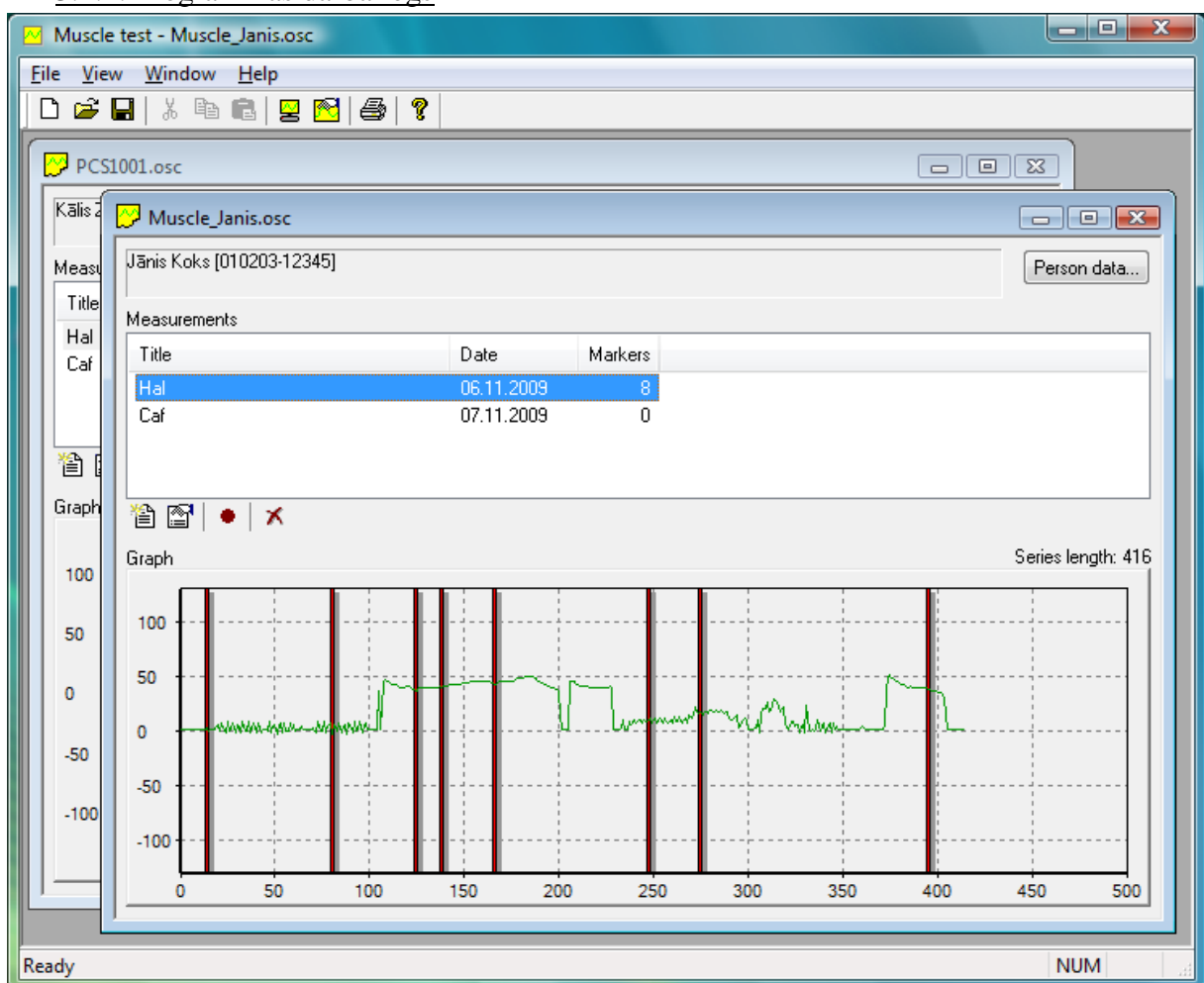
| | |
|-----|---|
| 1. | Drukas iekārta |
| 2. | Datu apstrādes iekārta (Dators ar speciālu programmu) |
| 3. | Analogā signāla pastiprinātājs un pārveidotājs par digitālo signālu |
| 4. | Signāla uztvērējs/pārveidotājs |
| 5. | Muskuļa stimulācijas elektrodi |
| 6. | Muskuļa paraugs |
| 7. | Muskuļa pelde |
| 8. | Novadkrāns |
| 9. | Halotāna iztvaikotājs |
| 10. | Atbilstošs šķīdums muskuļa peldei |
| 11. | Muskuļa peldes šķīduma pievade |

| | |
|-----|----------------------------|
| 12. | Elektroimpulsu ģenerators |
| 13. | Reduktors/plūsmas mērītājs |
| 14. | Gāzu maisījuma balons |

Darba laikā tika radīta muskuļu testu (IVCT) datu fiksēšanas datorprogramma, kas ļauj fiksēt oscilogrāfa mērījumus un veikt to analīzi. Programma paredzēta:

- oscilogrāfa signāla nolasīšanai,
- mērījumu apkopošanai,
- datu saglabāšanai saistot tos ar pacientu informāciju,
- mērījumi drukāšanai.

3.1.1. Programmas darba logs

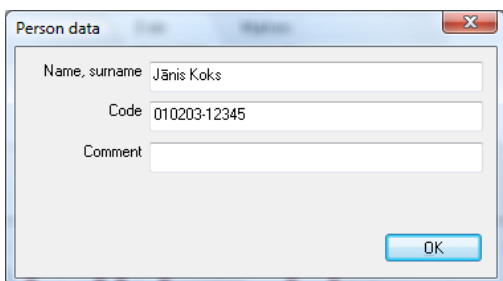




- Katram pacientam tiek veidots atsevišķs mērījumu fails, kurā iespējams saglabāt vairākus mērījumus.
- Mērījumu nolasīšanas gaitā, no mērījumu iekārtas saņemtie dati tiek atspoguļoti grafiskā veidā. Mērījumu grafiskā attēlojuma pārlūkošana pieejama arī vēlāk, izvēloties konkrēto mērījumu.
- Katram mērījumam to gaitā ir patvaļīgi pievienojami marķieri, spiežot tastatūras taustiņu (*space*), šādi atzīmējot katru testa etapu. Atzīmētie marķieri turpmāk tiek izmantoti testa


rezultātu analīzē, lai izvērtētu muskuļa parauga reakciju uz atbilstošo trigervielas koncentrāciju.


- Visi mērījumi un marķieri tiek saglabāti vienā datu failā un ir lietojami vēlāk iegūto datu analīzei un mērījumu korekcijai.
- Iegūtos mērījumu iespējams drukāt ar jebkuru tipveida drukas iekārtu.

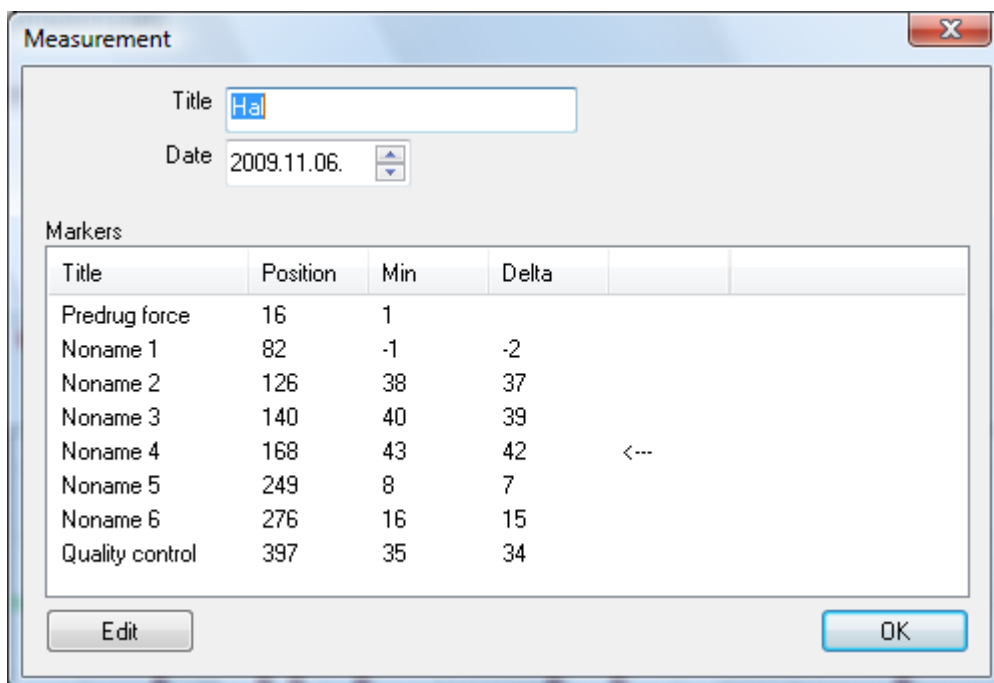
Pacienta datu rediģēšanai paredzēts atsevišķs logs, izvēloties ekrāna pogu „Person data...”:



Jauna mērījuma pievienošanai lietojams taustiņš , bet dzēšanai taustiņš .

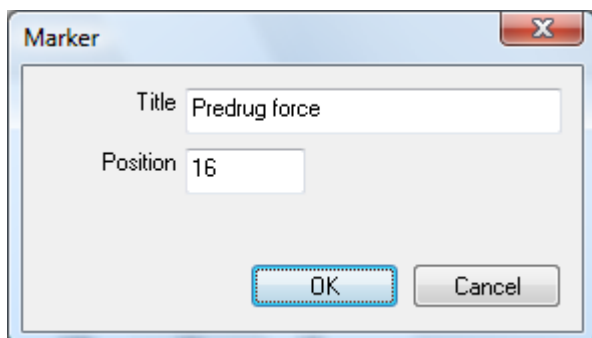
Lai uzsāktu mērījumu nolasīšanu, lietojams taustiņš . Lai apturētu mērījumu nolasīšanu, šo taustiņu nospiež vēlreiz.

Katra mērījuma dati ir rediģējami izmantojot šādu programmas dialogu (poga ):



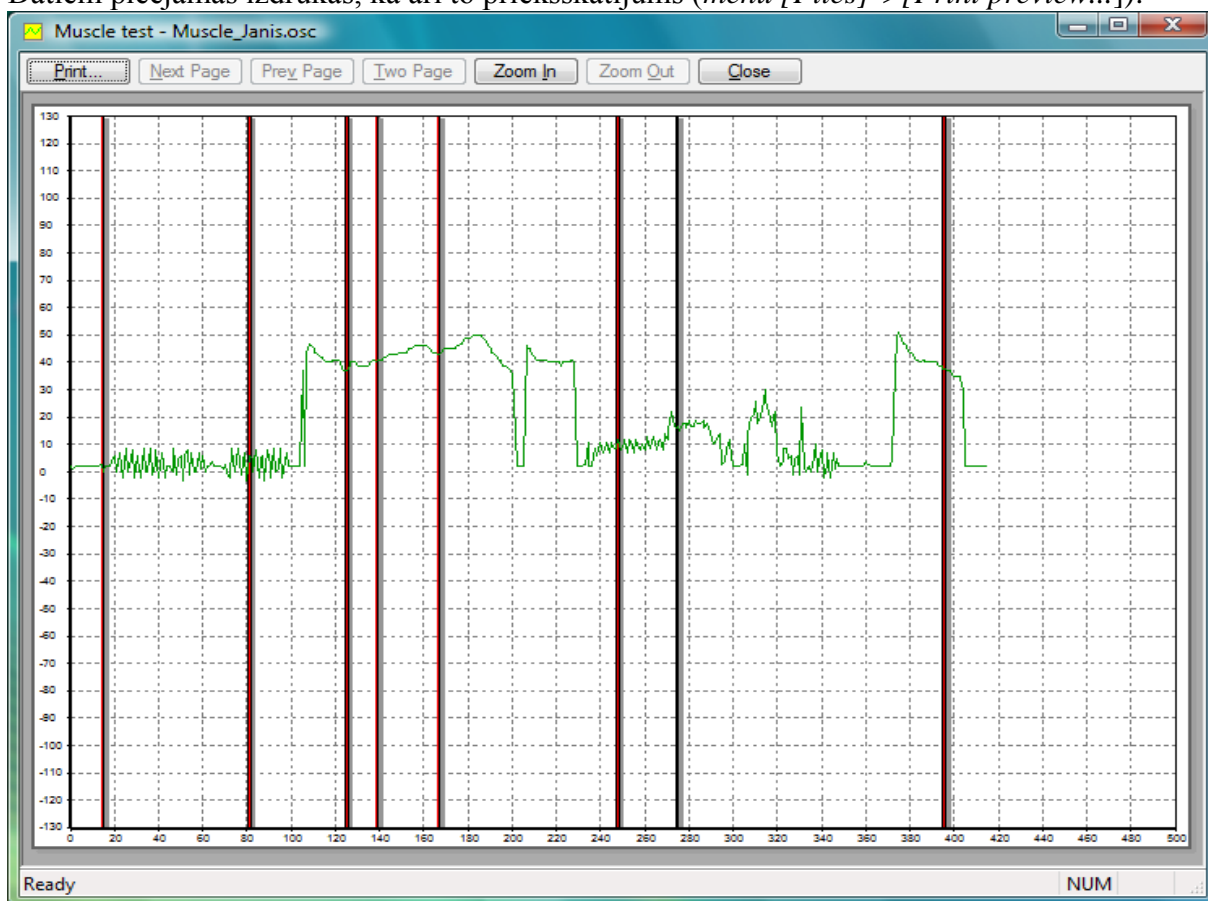
| Title | Position | Min | Delta | | |
|-----------------|----------|-----|-------|-----|--|
| Predrug force | 16 | 1 | | | |
| Noname 1 | 82 | -1 | -2 | | |
| Noname 2 | 126 | 38 | 37 | | |
| Noname 3 | 140 | 40 | 39 | | |
| Noname 4 | 168 | 43 | 42 | <-- | |
| Noname 5 | 249 | 8 | 7 | | |
| Noname 6 | 276 | 16 | 15 | | |
| Quality control | 397 | 35 | 34 | | |

Šajā logā ir uzstādāmi gan mērījumu kopējie dati (nosaukums, datums) gan pārlūkojami vai rediģējami fiksēto marķieru dati. Marķieru datus iespējams rediģēt, nospiežot ekrāna pogu „*Edit*”:




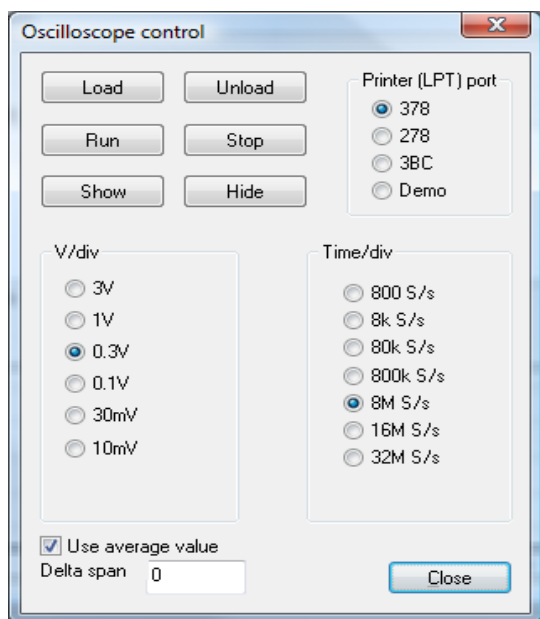
3.1.2. Izdrukas


Datiem pieejamas izdrukas, kā arī to priekšskatījums (*menu [Files]->[Print preview...]*):



3.1.3. Uzstādījumi

Iespēja kontrolēt oscilogrāfa darba parametrus, norādot datu nolasišanas biežumu un fizisko datu kabeļa pieslēgumu (rīkjostas poga ):



Ir iespējams attēlot arī oscilogrāfa kontroles dialogu (rīkjostas poga ).

4. Kalcija vielmaiņas funkcionālā analīze

Kalcija vielmaiņas funkcionālā analīze tika veikta no AN ģimenes probandu II-3 un III-7 muskuļu parauga kultivētās šūnu kultūrās pēc Leipcigas Universitātes MH laboratorijā izstrādātas metodikas (Wehner *et al.*, 2002). Miotubuļu kultūrām tika izmantoti muskuļu biopsijā iegūtie audi. Tos vispirms atbrīvoja no saistaudiem un taukiem, tad iegūtie muskuļi tika sasmalcināti. No tiem enzimatiskā ceļā atdalīti mioblasti tika kultivēti modificētā šūnu kultūrā ar 1.5mg/ml kollagenāzi IA (*Sigma*, Taufkirchen, Germany) un 1mg/mL vērša seruma (BSA; *Sigma*) 37°C temperatūrā un 5% CO₂ 30–45min. Izolētās šūnas 2 reizes skaloja izotoniskajā šķīdumā (HBSS; *Invitrogen/Life Technologies*, Karlsruhe, Germany) un ievietoja atklātājās barotnēs (*Greiner*, Frickenhausen, Germany) uz 2h, lai samazinātu fibroblastu skaitu kultūrā veidā Dulbecco modifikācijas neitrālā šūnu barotnē (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)), pievienojot 1,5 mg/ml kollagenāzi IA (*Sigma*, Taufkirchen, Germany) un 1 ml liellopu plazmas albumīnu (BSA; *Sigma*) 37°C temperatūrā un 5% CO₂ vidē uz 30- 45 minūtēm tika izolēti mioblasti, jo fibroblasti daudz labāk saistās pie plastmasas virsmām kā citas šūnas (Neville *et al.*, 1998). Izolētās šūnas divas reizes skaloja Henka (Hank) buferēto sāls šķīdumu (HBSS; *Invitrogen/Life Technologies*, Karlsruhe, Germany) un ievietoja nepārklātās barotnēs (*Greiner*, Frickenhausen, Germany) uz divām stundām. Attīrītās šūnas tika pārceļtas ar kolagēnu pārklātās audu barotnēs (collagen A; *Biochrom*, Berlin, Germany) un inkubētas 3- 4 dienas 37°C 5% CO₂ vidē. Pēc tam šūnas tika

2 nedēļas kultivētas proliferācijas barotnē ar augstu seruma koncentrāciju. Kad šūnu blīvums sasniedza 60 līdz 70%, tās inkubēja diferenciācijas barotnē I uz 3- 5 dienām. Šai laikā mioblasti sāk veidot miotubuļus. Galīgā pārveidošanās tika pabeigta diferenciācijas barotnē II ar zemu seruma koncentrāciju uz vismaz divām dienām. Intracelulārā kalcija jonu koncentrācija tika noteikta 2 līdz 10 dienu laikā pēc ievietošanas diferenciācijas barotnē II (*Growth and Differentiation Medium; PromoCell, Heidelberg, Germany*).

Intracelulārā kalcija koncentrācija miotubuļu kultūrās tika noteikta ar iekārtu Fura 2-AM (Molecular probes, Eugene, USA) fluorescences attēla komplektā Polychrom IV (Till Photonics, Gräfelfing, Germany), kas bija savienots ar mikroskopu Axioskop (Zeiss, Jena, Germany). Kalcija koncentrācijas pieaugums citosolā $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ tika kalkulēts no starpības starp maksimālo kalcija koncentrāciju un bāzes koncentrāciju izmeklējuma laikā. Lai iegūtu devas/atbildes reakcijas līknes, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ tika normalizēts atbilstoši maksimālai atbildes reakcijai pie 4-Hloro-m-krezola (*4-chloro-m-cresol* 4CmC) 1mM koncentrācijas ($\Delta\text{Ca}/\Delta\text{Ca}_{\text{max}}$). Kalcija jonu koncentrācijas pieaugumu citosolā $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ reķināja no maksimālās kalcija jonu koncentrācijas atņemot sākotnējo koncentrāciju. Lai aprēķinātu devas- atkarības līkni $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ maksimālā atbildes koncentrācija tika normalizēta atbilstoši reakcijai pie 1 mMCMC ($\Delta\text{Ca}/\Delta\text{Ca}_{\text{max}}$). EC_{50} tika noteikts analizējot atsevišķa miotubuļa devas/atbildes reakcijas līkni ar Hill vienādojumu.

Statistiskā analīze un līkņu salīdzinājums tika veikts izmantojot SigmaStat un SigmaPlot (SPSS) datorprogrammu. Datu atbilstību normālajam sadalījumam pārbaudīja izmantojot Kolmogorova- Smirnova testu un asimetrijas ekscesa testu. Tā kā dati neatbilda normālajam sadalījumam pielietojām neparametriskās statistiskās analīzes metodes. Multiplai salīdzināšanai izmantojām Kruskal- Wallis dispersijas analīzi (Kruskal-Wallis ANOVA). Atšķirību starp konkrētām grupām pārbaudījām izmantojot Mann- Whitney U testu. Atšķirības uzskatījām par būtiskām, ja $p < 0.05$. Rezultāti tika izteikti kā mediāna ar 25% un 75% kvartillēm.

Kalcija jonu koncentrācijas izmaiņu salīdzinošai analīzei tika izmantota kontroles grupa, kas sastāvēja no 14 pacientiem, kuri tika izmeklēti sakarā ar aizdomām par MH vai kuri bija radinieki kādam MH pacientam. Šiem pacientiem iepriekš tika veikts IVCT, kurš bija negatīvs (MHN). Kontroles grupā bija iekļauti 8 vīrieši un 6 sievietes vecumā no 3 līdz 61 gadam, kuru vidējais vecums bija 36.5 gadi.

Pētījums tika veikts atbilstoši Helsinku konvencijai un akceptēts Leipzigeras Universitātes slimnīcas Ētikas komitejā. Simts voluntieru asins paraugi tika izmeklēti, uz šīs DNS aminoskābju secības esamību, lai izslēgtu Latvijas iedzīvotājiem specifisku polimorfismu.

III REZULTĀTI

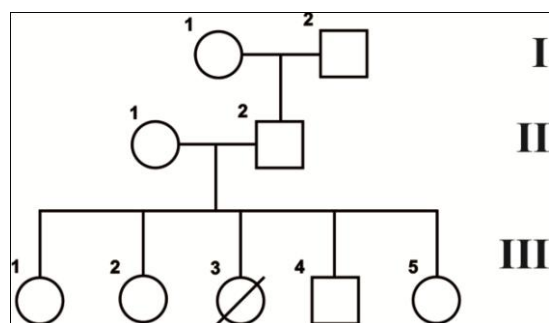
Analizējot AS un AN pacientu slimības vēstures pēc MH klīniskā novērtējuma skalas, MH iespējamība tika novērtēta kā „ļoti ticama” ar 43 punktiem AS un „visticamākā” ar 58 punktiem AN pacienta gadījumā. Novērtējuma kritēriji parādīti tabulā III-1.

III-1. tabula

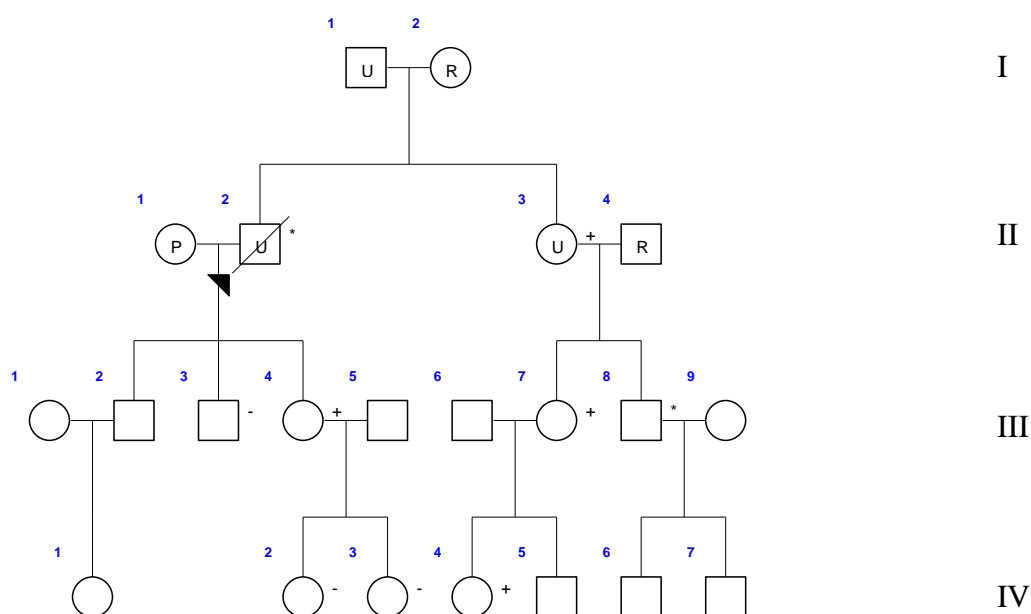
MH klīniskā novērtējuma skala

| | <i>Simptomi un pazīmes</i> | <i>Punkti</i> | <i>AS</i> | <i>AN</i> |
|------------------------------|--|---------------|-----------|-----------|
| I. Rigiditāte | Ģeneralizēta rigiditāte bez drebuļiem | 15 | 15 | 15 |
| II. Muskuļu bojājums | Tumšs urīns (Cola colored) | 15 | 10 | 10 |
| III. Respiratora acidoze | pETCO ₂ >55mmHg veicot adekvātu kontrolētu ventilāciju | 15 | Nav datu | 15 |
| IV. Temperatūras pieaugums | Neatbilstoši straujš temperatūras pieaugums (anesteziologa viedoklis) | 15 | 15 | 15 |
| V. Kardioloģiskais stāvoklis | Neatbilstoša sīnusa tahikardija | 3 | 3 | 3 |
| VI. Citas pazīmes | a. Arteriālais bāzu ekscess negatīvāks par -8mEq/l b. Arteriālais pH <7.25 c. Ātri atgriezenisks ar dantrolēnu | 10 10 5 | Nav datu | Nav datu |
| Kopā | | | 43 | 58 |

AS pacienta gadījumā tika novērota ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, straujš temperatūras pieaugums, sīnusa tahikardija, AN gadījumā - ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, kreatīnkināzes pieaugums, EtCO₂ - 80 mmHg, straujš temperatūras pieaugums un sīnusa tahikardija, kas atbilst 43 un 58 punktiem pēc MH klīniskā novērtējuma skalas (Larach, 1994) un liecina, ka MH iespējamība AS gadījumā ir un AN- Abos gadījumos nebija pieejama asins gāzu analīze un terapija ar Dantrolēnu un AS gadījumā arī CO₂ koncentrācija izelpas gaisā, kas varētu dot papildus atbilstoši 25 un 40 punktus. Tika sameklēti abu pacientu piederīgie, lai iegūtu anamnēzes datus, kas varētu liecināt par iespējamām MH izpausmēm. Abām ģimenēm tika izveidoti ciltskoki, kuros izmantotie personu apzīmējumi tika lietoti aprakstot klīniskās pazīmes, veiktos izmeklējumus un iegūtos rezultātus. Ciltskoki parādīti attēlos III-1 un III-2.



III-1. att. AS ģimenes ciltskoks. Ar nosvītoto apli apzīmēta persona, kura mira ar MH līdzīgiem simptomiem.

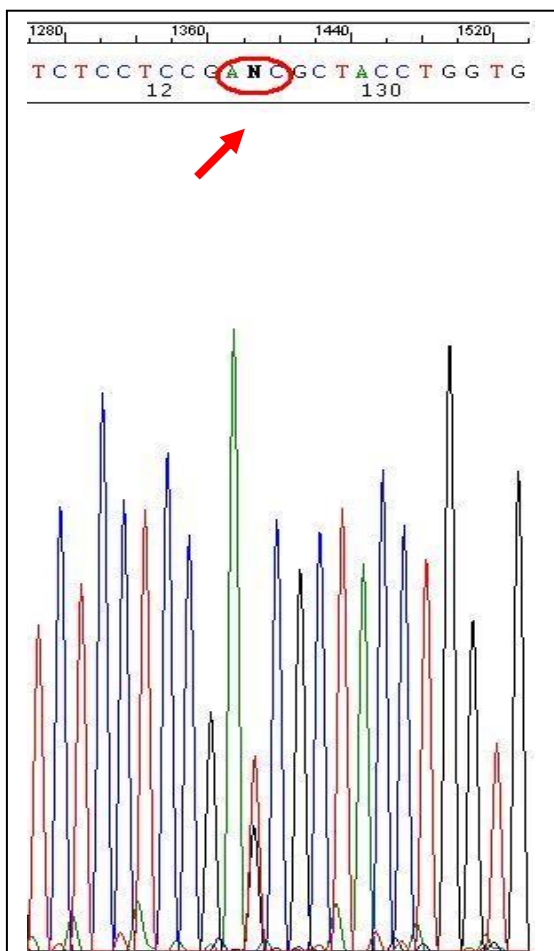


III-2. att. AN ģimenes ciltskoks. Ar apzīmējumiem “+” un “-” parādītas personas, kurām veikta DNS pārbaude un konstatēta vai nav konstatēta mutācija G528T (Glu-176-Asp) 6. eksonā); “*” – persona ar MH līdzīgu epizodi anamnēzē; U, R un P – pacientu tautība: atbilstoši ukraiņu, krievu un poļu.

AS ģimenes piederīgie nebija ieinteresēti sadarboties ģimenes iekšējo problēmu dēļ un izdevās iegūt tikai 2 ģimenes locekļu asins paraugus, kuriem veica izmeklējumus uz šobrīd zināmām MH izraisošām mutācijām. Veicot DNS paraugu molekulāro diagnostiku uz jau zināmajām mutācijām *RYR1* gēnā patoloģija netika konstatēta, arī sekvenējot pilnu *RYR1* gēnu Leipcigas MH laboratorijā, neatrada izmaiņas DNS secībā.

Pārējie ģimenes locekļi, starp kuriem bija arī tādi, kam anamnēzē bija ar muskuļu patoloģiju saistītas pazīmes, bija izbraukuši uz ārzemēm vai nevēlējās sadarboties. Nebija iespējams arī veikt abu vecāku asins paraugu izmeklējumus, jo viņi nebija kooperatīvi.

Veicot molekulāro diagnostiku AN pacienta ģimenes locekļiem (probanda māsa) Leipcigas MH laboratorijā tika konstatēta jauna *missense* mutācija *RYR1* gēna 6. eksonā G528T (Glu-176-Asp) (III-3. un III-4. att.).



III-3.att. DNS sekvenēšanas elektroforegramma ar izmaiņām nukleotīdu secībā *RYR1* gēna 6. eksonā - G528T (Glu-176-Asp). Aizvietotais nukleotīds ir norādīts ar bultu.

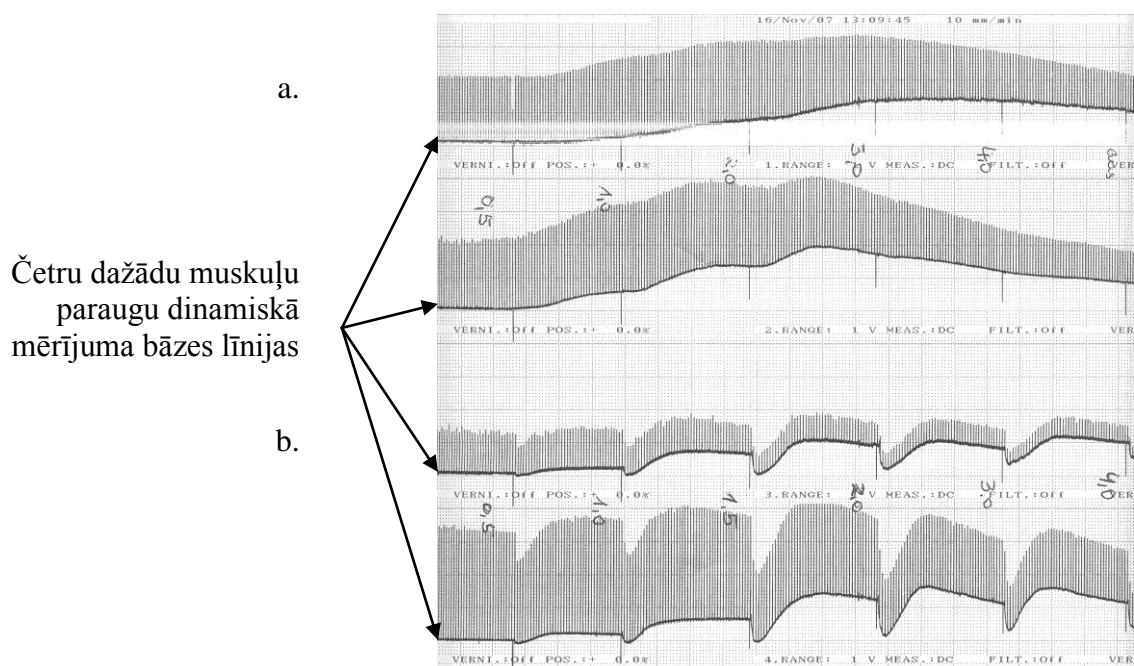
| | |
|--|--|
| 6. eksons nukleotīdi: 425 - 537 | GA GAG GCT TGC TGG TGG ACC ATG CAC CCA GCC TCC AAG CAG AGG TCT GAA GGA GAA AAG GTC CGC GTT GGG GAT GAC ATC ATC CTT GTC AGT GTC TCC TCC GAG CGC TAC CTG |
| aa: 142 - 179 | Gly Glu Ala Cys Trp Trp Thr Met His Pro Ala Ser Lys Gln Arg Ser Glu Gly Glu Lys Val Arg Val Gly Asp Asp Ile Ile Leu Val Ser Val Ser Ser Glu Arg Tyr Leu |
| Izmaiņas nukleotīdu un aminoskābju secībā | c.463C>A p.Gln155Lys c.467G>A p.Arg156Lys c.479A>G p.Glu160Gly c.487C>T p.Arg163Cys c.488G>T p.Arg163Leu c.488G>A p.Arg163Leu c.493G>A p.Gly165Arg c.496G>A p.Asp166Asn c.497A>G p.Asp166Gly c.528G>T p.Glu176Asp c.529C>T p.Arg177Cys c.533A>T p.Tyr178Cys |

III-4. att. 6. eksona nukleotīdu secība ar atbilstošo aminoskābju secību. Jaunā nukleotīdu aizvietošanas mutācija ar atbilstošo aminoskābju aizvietošanu ir iezīmēta sarkanā krāsā.

Izmeklējot pārējos ģimenes locekļus, jaunā nukleotīdu aizvietošana *RYR1* gēna 6. eksonā tika konstatēta četriem ģimenes locekļiem (II-3, III-4, III-7 un IV-4), bet III-3, IV-2 un IV-3 ģimenes locekļiem šī mutācija netika atrasta. Jaunatkārtas DNS secības izmaiņas *RYR1* gēnā netika atrastas arī 100 DNS kontroles paraugos (brīvprātīgie Latvijas Jūras Medicīnas centra pacienti un studenti), kas izslēdz Latvijas populācijai raksturīgo polimorfismu.

Veicot IVCT testu AN ģimenes locekļiem II-3 un III-7 tika konstatēti MHs rezultāti. Tika izmeklēti četri muskuļu paraugi. Katra pacienta viens muskuļu paraugs tika izmeklēts peldē ar halotānu (a) un viens ar kofeīnu (b). Visi četri paraugi uzrādīja pozitīvus IVCT rezultātus- muskuļa biopsijas materiāla relaksācijas traucējumus veicot testu gan ar halotānu,

gan ar kofeīnu.IVCT izmeklēšanas rezultāti redzami III-5. Attēlā, kur uz augšu novirzītā bāzes līnija pārliecinoši uzrāda muskuļu relaksācijas problēmas.



III-5. att. Pacientu II-3 un III-7 IVCT līknes. Četri muskuļu paraugi tika izmeklēti peldē ar halotānu (a) un kofeīnu (b). Visi četri paraugi uzrādīja pozitīvus IVCT rezultātus- muskuļa biopsijas materiāla relaksācijas traucējumus veicot testu gan ar halotānu, gan ar kofeīnu.

Miotubuļu kultūrās tika veikti Ca²⁺ vielmaiņas mērījumi, kas atspoguļoti III-2 tabulā.

III-2. tabula

| Kalcija koncentrācijas mērījumu miera stāvoklī analīzes rezultāti | | | | | | |
|---|-----|----------|--------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Grupa | N | Anulētie | Vid. aritmētiskais | Standarta novirze | Standarta kļūda | Vid. aritm. 95% ticamības intervāls |
| MHN | 320 | 0 | 54,916 | 23,411 | 1,309 | 2,575 |
| P420 | 14 | 0 | 74,083 | 12,405 | 3,315 | 7,162 |
| P421 | 20 | 0 | 93,173 | 48,793 | 10,910 | 22,836 |

| Grupa | Diapazons | Maksimālā vērtība | Minimālā vērtība | Mediāna | 25% kvartile | 75% kvartile |
|-------|-----------|-------------------|------------------|---------|--------------|--------------|
| MHN | 166,623 | 175,758 | 9,135 | 50,778 | 41,480 | 68,798 |
| P420 | 50,821 | 105,675 | 54,854 | 74,036 | 64,017 | 77,880 |
| P421 | 187,637 | 233,639 | 46,002 | 76,469 | 62,203 | 111,319 |

| Grupa | Asimetrija | Ekscess | Asimetrijas-ekscesa | Asimetrijas-ekscesa | Summa | Kvadrātu summa |
|-------|------------|---------|---------------------|---------------------|-------|----------------|
| | | | | | | |

| | | | distance | būtiskums | | |
|------|-------|-------|-----------------|------------------|-----------|-------------|
| MHN | 0,890 | 2,277 | 0,0974 | <0,001 | 17573,265 | 1139896,764 |
| P420 | 0,987 | 2,410 | 0,165 | 0,354 | 1037,159 | 78836,149 |
| P421 | 1,717 | 2,848 | 0,225 | 0,009 | 1863,463 | 218858,195 |

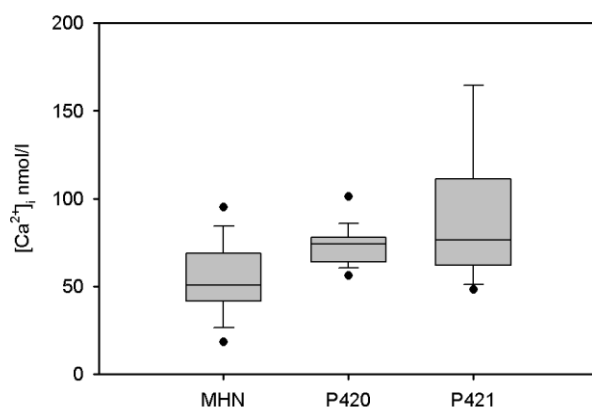
Datu atbilstību normālajam (Gausa) sadalījumam pārbaudīja ar Kolmogorova-Smirnova normalitātes testu. Divām grupām sadalījums neatbilda normālā sadalījuma kritērijiem (attiecīgi $p < 0.001$ un $p = 0.009$), tādēļ pielietojām neparametrisko *Mann-Whitney U* testu (III-3. tabula).

III-3. tabula

Kolmogorova- Smirnova tests

| MHN: | K | S Dist. = 0,097 | P < 0,001 | Failed |
|-------------|----------|------------------------|---------------------|---------------|
| P420: | K | S Dist. = 0,165 | P > 0,200 | Passed |
| P421: | K | S Dist. = 0,225 | P = 0,009 | Failed |

Kontroles grupā MHN pacientiem miera kalcija koncentrācija bija 50,7 nmol/l (mediāna) (no 41,4 līdz 68,8 nmol/l, kas atbilst 25% un 75% kvartillēm), savukārt jaunatklātās mutācijas nēsātājiem miera kalcija koncentrācija atbilstoši bija 74,0 nmol/l (no 64,0 līdz 77,9 nmol/l) un 76.5 (no 62,2 līdz 111,3 nmol/l). Atšķirība starp kontroles grupu (MHN) un mutācijas nēsātājiem (P420; P421) bija ticama- $p < 0,001$ (*Mann-Whitney-Test*), kas ir raksturīgi pacientiem, kuri ir MHS mutācijas nēsātāji. Rezultāti parādīti III-6. attēlā.



III-6. att. Miera kalcija jonu koncentrācijas mērījumi. Mērījumu mediāna (vidējā līnija), kvadrille (taisnstūris), maksimālās un minimālās vērtības un punkti attēlo ekstrēmus (vislielākās un vismazākās vērtības) miotubuļu kultūrās MHN kontroles grupai un pacientiem ar jauno mutāciju *RYR1* gēnā.

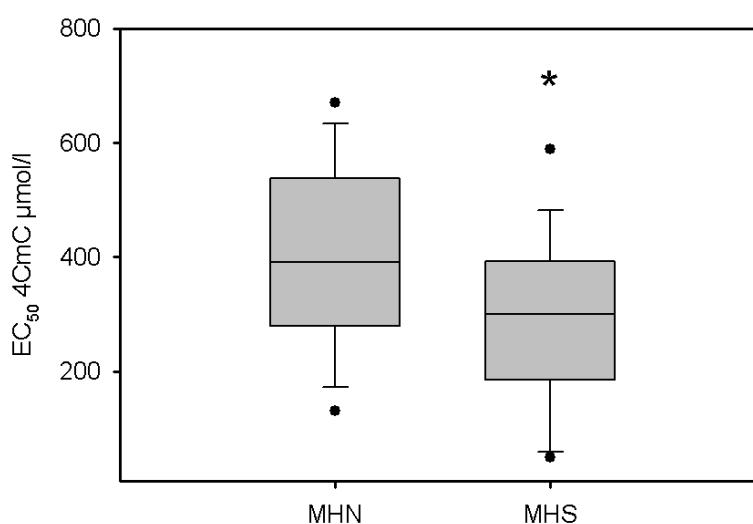
4Chloro-m-krezola (4CmC) pusmaksimālā efektīvā koncentrācija (EC50) tika aprēķināta ar Hill vienādojuma palīdzību izmantojot miotubuļu reakcijas mērījumus atkarībā no 4CmC devas.

EC50 ir samazināta no mutācijas nēsātājiem iegūtajos miotubuļos, salīdzinot ar kontroles grupu. Atšķirība ir statistiski ticama (*Mann-Whitney U test*, $p=0,002$). Rezultāti atspoguļoti III-4. tabulā un III-7. attēlā.

III-4.tabula

4CmC pusmaksimālās efektīvās koncentrācijas mērījumu analīze

| Grupa | N | Anulētie | Diapazons | Maksimālā vērtība | Minimālā vērtība | Mediāna | 25% kvartile | 75% kvartile |
|-------|-----|----------|-----------|-------------------|------------------|----------------|--------------|--------------|
| MHN | 308 | 0 | 807,937 | 819,958 | 12,021 | 391,125 | 279,870 | 538,044 |
| MHS | 34 | 0 | 633,504 | 676,517 | 43,013 | 300,432 | 184,760 | 392,252 |



III-7. att. 4Chloro-m-krezola (4CmC) pusmaksimālā efektīvā koncentrācija (EC50) (* $p=0,002$ salīdzinot ar kontroles grupu)

Ciltskokā, kurš parādīts III-6. attēlā redzami ģimenes locekļi, kuri ir izmeklēti uz mutācijas - G528T (Glu-176-Asp) 6. eksonā esamību. Ar “+” atzīmēti tie ģimenes locekļi, kuriem ir konstatēta šī mutācija, ar “-“ tie, kuri nav jaunatklātās mutācijas nēsātāji. Persona (III-8) atzīmēta ar “*”, jo tai bērībā pēc apendektomijas operācijas novērotas MH raksturīgas pazīmes (trīs dienas pēc operācijas vispārējā anestēzijā bijusi paaugstināta temperatūra un pacients ārstēts intensīvajā terapijā). Šīs personas DNS paraugs izmeklēšanai nebija pieejams, jo šī persona nedzīvo Latvijā.

Ar U, R un P apzīmētas atbilstošo personu tautības (attiecīgi U- ukraiņu, R- krievu un P- poļu), kas turpmākos pētījumos ļautu konstatēt no kurienes ieradušies pacienti ar šo mutāciju un kuros reģionos būtu meklējami citi pacienti ar tādu pašu mutāciju *RYR1* gēnā.

IV DISKUSIJA

MH ir iedzimta slimība, kura tiek pārmantota autosomāli dominantā veidā. To izraisa mutācija rianodīna receptoru kodējošajā gēnā *RYR1*, kas atrodas 19. hromosomas garajā plecā (19q13.1). Pirmā tipa rianodīna receptors atbildot uz kairinājumu atver L- tipa kalcija kanālus, kas izraisa strauju kalcija līmeņa pieaugumu muskuļu šūnās un sekojošu muskuļa šūnas kontrakciju. MH gadījumā, saistoties ar trigervielām, receptors ilgstoši paliek uzbudinājuma stāvoklī un izraisa pastāvīgu Ca^{2+} izviedi no sarkolemmas, kas izraisa ievērojamu un pastāvīgu kalcija jonu koncentrācijas pieaugumu šūnā un tai sekojošu muskuļa šūnas kontrakciju, kas noved pie hipermetabola stāvokļa, kas izpaužas ar tahikardiju, CO_2 retenci, hipertermiju, elektrolītu disbalansu un var novest pie pacienta nāves. Literatūrā sastopami stipri atšķirīgi dati par slimības izplatību. Rianodīna receptora 1 (*RYR1*) gēna mutāciju izplatība populācijā ir no 1:5000 līdz 1: 15000. Cits sastopamības mērījums ir 1: 40 000 līdz 1: 100 000 anestēziju. Mutāciju izplatība populācijā ir relatīvi bieža, bet nelielais manifestāciju skaits anestēzijā saistīts ar vairākiem faktoriem. Ne katram cilvēkam tiek veikta anestēzija, tātad ir pietiekoši liela daļa mutāciju nēsātāju, kuri nav saņēmuši anestēziju un daļa no tiem saņēmuši anestēziju bez trigervielām- tātad bez manifestācijas riska. Jāņem vērā, ka MH ne vienmēr manifestējas saņemot anestēziju ar trigervielām. Zīmīgs ir Halsall pētījums, ka aptuveni 50% no MH aizdomīgiem pacientiem, pirms diagnozes uzstādīšanas, saņēmuši anestēziju ar trigervielām, bet slimības simptomi nav manifestējušies. Tas arī samazina MH manifestācijas biežumu. Tāpat slimības norise ir smagāka jauniem cilvēkiem, bet vecākiem pacientiem un zīdaiņiem simptomi ir mazāk izteikti un vieglu formu gadījumā simptomi tiek uzskatīti kā citas problēmas pazīmes. MH bez specifiskas ārstēšanas ir potenciāli letāla slimība. Pateicoties pacientu monitorēšanas un ārstēšanas iespējām, medicīnas personāla informētībai, funkcionālās un molekulārās diagnostikas iespējām un Dantrolēna pieejamībai MH letalitāte attīstītajās valstīs samazinājās no sākotnējiem 70 – 80% līdz 1.4 – 3%.

Diemžēl Latvija pieder pie valstīm, kur šai problēmai netiek pievērsta nepieciešamā uzmanība, kas potenciāli apdraud pacientu dzīvību. Oficiāli nav dokumentēts neviens MH gadījums un līdz ar to statistiskā uzskaitē netiek veikta. Datus par iespējamiem MH gadījumiem bija iespējams iegūt no LARA, kur tika analizēti minētie pacientu nāves gadījumi. Tā kā zināmie slimības manifestācijas gadījumi ir nedaudz, MH netiek uzskatīta par nopietnu problēmu. Skaitot dokumentētos gadījumus pašlaik zināmā letalitāte valstī no MH ir 100%. Šobrīd Latvijas anesteziologi ir informēti par slimības izpausmēm un nepieciešamo ārstēšanu, bet pagaidām verifikācija ar laboratoriskām metodēm ir tikai sākuma stadijā un finansiālu apsvērumu dēļ vēl nav pilnībā attīstīta. Tāpat nav pieejama adekvāta ārstēšana ar

šobrīd vienīgo efektīvo medikamentu dantrolēnu. Šogad vismaz daļēji tika atrisināta iespēja nodrošināt ar Dantrolēnu Latvijas medicīnas iestādes. Tāpat arī kolēģu vidū ir nepietiekošas zināšanas par MH norisi un tās iespējamām manifestācijas pazīmēm netiek pievērsta pienācīgā uzmanība. Diskusijās pēc informatīvām lekcijām par maligno hipertermiju anesteziologi atceras par aizdomīgām klīniskām situācijām, kuras varēja būt MH izpausmes, bet viņi tām nav pievērsuši uzmanību, jo uzskatīja, ka MH vienmēr izpaužas ar klasisku klīnisko gaitu un letālu iznākumu. Viņi parasti atceras klīnisko situāciju, bet nevar atcerēties pacientu un arī operācijas laiku, tādēļ nevar sameklēt pacientu, kuram, iespējams, bijusi MH manifestācija.

Izmantojot LARA datus ir atrastas un daļēji apsekotas divas ģimenes, kuru piederīgajiem, iespējams, bija MH. Abos gadījumos pacienti mira 3 līdz 4 stundu laikā pēc anestēzijas sākuma ar MH tipiskiem simptomiem. Analizējot slimības klīnisko gaitu pacientu vēsturēs un intervējot anesteziologus, kuri veica šīs anestēzijas tika izvērtēts, cik liela ir varbūtība, ka attiecīgo klīnisko ainu izraisījusi malignā hipertermija. AS gadījumā tika novērota ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, straujš temperatūras pieaugums, sīnusa tahikardija, kas pēc MH klīniskā novērtējuma skalas atbilst 43 punktiem. AN gadījumā - ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, kreatīnkināzes pieaugums līdz 1616 vienībām, EtCO₂ - 80 mmHg, straujš temperatūras pieaugums līdz 40.8°C un sīnusa tahikardija līdz 150 reizēm minūtē, kas atbilst 58 punktiem pēc MH klīniskā novērtējuma skalas (Larach 1994) un liecina, ka MH ir „ļoti ticama” ar 43 punktiem AS un „visticamākā” ar 58 punktiem AN gadījumā. Abos gadījumos nebija pieejama asins gāzu analīze un terapija ar Dantrolēnu un AS gadījumā arī CO₂ koncentrācija izelpas gaisā, kas varētu dot papildus atbilstoši 25 un 40 punktus. Abos gadījumos klīniskā aina liecina par ļoti augstu MH manifestācijas iespējamību. Atbilstoši Malignās hipertermijas diagnostikas vadlīnijām pacientiem un to vecākiem vai radniekiem būtu nepieciešams veikt IVCT, lai apstiprinātu MH diagnozi. Mūsu gadījumā abi indeksa pacienti operācijas laikā bija miruši un vecāku izmeklēšana nebija iespējama, jo tie bija miruši vai nebija ieinteresēti.

Tika sameklēti abu pacientu piederīgie, lai iegūtu anamnēzes datus, kas varētu liecināt par iespējamām MH izpausmēm. Viena no ģimenēm nebija kooperatīva un pēc divu ģimenes locekļu ģenētiskā skrīninga no turpmākās sadarbības atteicās. Otras ģimenes pārstāvji bija ieinteresēti noskaidrot vai viņu ģimenē ir MH izraisošā mutācija *RYR1* gēnā. Septiņām šīs ģimenes personām tika veikti DNS izmeklējumi un divām IVCT. Netika izmeklēti 6 dzīvi esošie asinsradnieki- pieci, jo dzīvo ārzemēs un sestais, jo ir mazs bērns un māte nevēlējās, ka pagaidām tiek veiktas kādas invazīvas manipulācijas.

Abu ģimeņu piederīgajiem izmeklēšana tika uzsākta ar molekulāro diagnostiku, jo nebija pilnīgas pārliecības par MH esamību un bez pārliecinoša iemesla viņi nevēlējās veikt muskuļu biopsiju. *RYR1* gēns ir viens lielākajiem gēniem (15.5 kb cDNS, kas kodē 5035 aminoskābes ar molekulmasu 563.5 kD). Tajā ir atrastas vairāk kā 90 mutācijas, bet tikai 30 atzītas par MH izraisošām mutācijām. Nav konstatētas mutācijas, kuras sastopamas visbiežāk, tādēļ to diagnostika ir samērā sarežģīta un darbietilpīga. Šī iemesla dēļ sākotnēji tika veiktas DNS pārbaudes uz, mūsuprāt, iespējamākajām MH izraisošajām mutācijām. Tās tika atlasītas analizējot mutāciju biežumu tuvākajās kaimiņvalstīs, kur bija pieejami dati par MH epidemioloģiju. Par pamatu tika izmantoti EMHG dati un Zviedrijas un Vācijas epidemioloģiskie dati. Augstāk minētās valstis tika izvēlētas pamatojoties uz ģeogrāfiskām un vēsturiskām saitēm. Sākotnējie izmeklējumi bija negatīvi, tādēļ, sadarbojoties ar partneriem ārzemēs, tika veikta paplašināta to analīze divās MH laboratorijās. Pa vienam DNS paraugam no katras ģimenes tika nosūtīts uz MH laboratoriju Nijmegenā (Nīderlande) – AS pacientes mātes un AN pacienta meitas un Leipcigā (Vācija) – AS pacientes māsas un AN pacienta māsas.

Nijmegenā tika veikta asins paraugu pārbaude izmantojot SALSA MLPA kit P281/P282 *RYR1* ar kura palīdzību pārliecinās par 33 specifisku punktveida mutāciju esamību cilvēka *RYR1* gēnā. Šī pārbaude neuzrādīja nevienu no zināmajām MH izraisošajām mutācijām abu ģimeņu locekļiem.

Leipcigā tika veikta pilna *RYR1* gēna sekvenēšanas analīze nosūtītajos DNS paraugos. Vienā no paraugiem (AN pacienta mātai) tika atrasta līdz šim nezināma mutācija *RYR1* gēnā 6. eksonā – G528T (Glu-176-Asp). Šī mutācija tika konstatēta četriem no septiņiem izmeklētajiem ģimenes locekļiem. Izmeklējot AS māsas DNS paraugu mutācija *RYR1* gēnā netika atrasta.

Mūsu veikto izmeklējumu negatīvie rezultāti AS ģimenē neaplicina, ka šai pacientei nav bijusi MH manifestācija, jo mums nebija pieejams mirušās pacientes DNS paraugs un pacientes vecāki netika pilnībā izmeklēti kooperācijas trūkuma dēļ. Tas, ka mutācija netika atrasta izmeklētajos paraugos neizslēdz MH iespējamību konkrētajā klīniskajā gadījumā, jo netika izmeklēti probandi ar lielāko mutācijas iespējamības risku – tika izmeklēti tikai pacientes mātes un vienas māsas asins paraugi, nebija iespējams iegūt tēva un citu māsu asins paraugus. Vislietderīgāk būtu izmeklēt mirušās pacientes vecākus atbilstoši EMHG vadlīnijām, it īpaši tēvu, jo viņa mātei ir bijusi skolioze, kas ir viena no slimībām, kas bieži kombinējas ar MH. Diemžēl AS ģimenes locekļi nebija ieinteresēti veikt plašākus izmeklējumus, meklējot problēmas cēloņus citos faktoros. Jāatzīst, ka mūsu sabiedrībā pacienti ne vienmēr ir gatavi atzīt, ka slimība var būt fatāla un nenovēršama, tāpēc tiek

meklēti „vainīgie” ģimenē, medicīnas personālā vai apstākļu sakritībā. Šādā situācijā pieļaut domu, ka esi kādas potenciāli bīstamas gēnu mutācijas nēsātājs, ko iespējams nodot pēcnācējiem, tos potenciāli apdraudot, šķiet nepieņemama. Iespējams, ka šī iekšējā vainas apziņa vai neuzticēšanās medicīnas personālam arī radīja problēmas komunikācijā starp ģimeni un medicīnas personālu. Otra iespēja negatīvajam izmeklējumu rezultātam varētu būt vēl nezināma mutācija, kas visticamāk būtu jāmeklē pa tēva līniju izmantojot pilnu gēna sekvenēšanu. Lai gan visa gēna sekvenēšana tika veikta AS pacientes māšai, pastāv iespēja, ka viņa nav mantojusi mutāciju, kura varētu būt pārmantota pa tēva līniju.

Pacientes māšas DNS paraugs, kuram veica pilnu *RYR1* gēna sekvenēšanu neuzrādīja mutāciju šai ģēnā, kas apliecina, ka viņa ir vesela, bet tas neizslēdz iespēju, ka citi šīs ģimenes locekļi ir kādas mutācijas nēsātāji. Ja būtu bijusi iespējama pilnīga šīs ģimenes locekļu izmeklēšana, būtu iespējams izdarīt secinājumus par MH izraisošas mutācijas klātbūtni vai neesamību šai ģimenē. Iespējams, ka būtu bijis lietderīgāk veikt pilnu gēna sekvenēšanu pacientes mātei, nevis māšai, bet iespējamība abos gadījumos ir tikai 50%. Autori izvēlējās veikt pilnu *RYR1* gēna sekvenēšanu pacientes māšai, jo no ģimenes anamnēzes bija zināms, ka vecmāmiņai pa tēva līniju ir bijusi skolioze. Skolioze ir viena no slimībām, kas daļēji saistīta ar muskuļu disfunkciju un ir konstatēta biežāka MH sastopamība pacientiem ar skoliozi. Tādēļ ierobežota finansējuma apstākļos izvēlējāmies veikt pacientes māšai, pieļaujot, ka MH tiek pārmantota pa tēva līniju. Šāds lēmums tika pieņemts, jo nebija iespējams veikt abu vecāku pārbaudi, kā to rekomendē MH diagnostikas vadlīnijas.

AN ģimene bija vairāk ieinteresēta slimības cēloņu noskaidrošanā, tādēļ tika izmeklēti gandrīz visi Latvijā dzīvojošie šīs ģimenes locekļi. Latvijā dzīvo astoņi no 13 AN asinsradiniekiem un septiņiem no tiem (I, II un III pakāpes radiniekiem) tika veikta molekulārā diagnostika. Pēc mutācijas atrašanas *RYR1* ģēnā, diviem ģimenes locekļiem (II-3 un III-7) ar jaunatklāto mutāciju tika veikta IVCT ar sekojošu miotubuļu funkcionālo pārbaudi Leipzigeras MH laboratorijā, lai konstatētu vai šī mutācija ir saistīta ar MHS fenotipu. Abu pacientu gadījumā IVCT bija pozitīvs- muskuļa biopsijas materiāla relaksācijas traucējumus veicot testu gan ar halotānu, gan ar kofeīnu. Turpmāk veiktie kalcija jonu vielmaiņas funkcionālie mērījumi ticami atšķīrās no mērījumiem MHN indivīdu kontrolgrupā, kas apliecina šī genotipa saistību ar MHS fenotipu. Pārējo ģimenes locekļu izmeklēšana ar IVCT nav nepieciešama, jo šie indivīdi kā mutācijas nēsātāji uzskatāmi par MHS veicot ķirurģisku iejaukšanos. Pie tam In vitro kontrakcijas tests ir invazīvs, dārgs un ir nelietderīga ķirurģiska iejaukšanās, kas rada pacientam nevajadzīgu stresu.

EMHG ir izstrādājusi kritērijus pēc kādiem jaunatklātās mutācijas tiek iekļautas MH izraisīto mutāciju sarakstā.

Atbilstoši EMHG vadlīnijām katrai mutācijai jāsniedz pilnīgs ģenētisks un funkcionāls raksturojums ar sekojošu rezultātu publikāciju zinātniskajā literatūrā.

Mutācijas ģenētiskais raksturojums iekļauj sevī sekojošus kritērijus: (a) pilnīgu mutācijas aprakstu DNS un olbaltuma līmenī, kas raksturo aminoskābju aizvietošanu, mutācijas atrašanās vietu un polaritāti; (b) mutācijas saistību ar slimību vismaz 2 ģimenēs un (c) 100 kontroles paraugu pārbaudi, lai izslēgtu vietējās populācijas polimorfisma iespējamību.

AN ģimenē atrastā mutācija atrodas *RYR1* gēna kodējošās secības 528. pozīcijā, kur guanīns tiek nomainīts ar timīnu kā rezultātā aminoskābju 176. pozīcijā glutamīnskābe tiek aizvietota ar asparagīnskābi.

Pierādīt šīs mutācijas saistību ar MHS vēl vienā ģimenē šobrīd ir maz iespēju, ņemot vērā Latvijas populācijas lielumu un heterogenitāti. AN pacienta vecāki pieder pie dažādām etniskām grupām- tēvs ir ukraiņu izcelsmes, bet māte- krievu tautības, kuras vecāki un vecvecāki jau dzīvoja Latgalē. Tā kā pacienta vecākus nebija iespējams izmeklēt, nav zināms pa kuru līniju mutācija tika pārmantota. Ne Ukrainā, ne Krievijā šobrīd MH diagnostika netiek veikta un nav zināms katrai populācijai raksturīgs *RYR1* gēna mutāciju spektrs.

Lai izslēgtu, ka mutācija G528T (Glu-176-Asp) ir Latvijas populācijai raksturīgs polimorfisms, tika veikta DNS analīze 100 kontroles paraugos. Kontrolgrupa, atbilstoši EMHG prasībām, tika izvēlēta pēc nejaušības principa. Kontroles grupas indivīdiem anamnēzē nebija datu par komplikācijām saistībā ar anestēziju. Nevienā no kontroles paraugiem augstāk minētā mutācija netika atrasta.

Balstoties uz jaunatklātās mutācijas ģenētisko raksturojumu var secināt, ka tā ir iespējams MH cēlonis.

Katras *RYR1* gēna mutācijas ietekmi uz RYR1 proteīna funkciju jāpierāda vismaz ar vienu no divām testu sistēmām- rekombinanto *in vitro* ekspresiju vai RYR1 proteīna funkcijas mērījumiem *ex vivo* audu kultūrās. Rekombinantā *in vitro* ekspresija ir mutācijas integrācija standartizētā *RYR1* gēnā (peles vai truša) ar sekojošu kalcija jonu plūsmas fluorometriskiem mērījumiem pēc ekspozīcijas ar trigervielām.

Latvijā nebija iespējams veikt RYR1 proteīna funkcionālo pārbaudi, tādēļ to veica sadarbībā ar Leipciņas Universitātes MH laboratoriju, izmantojot *ex vivo* audu kultūras no pacientu II-3 un III-7 muskuļu biopsijā iegūtā materiāla.

MHS pacientu audu kultūrās tika veikti kalcija jonu saistīšanas mērījumi miotubuļos. Mērītie parametri ir Ca_{2+} plūsma un miera stāvokļa kalcija jonu koncentrācija citosolā [Ca_{2+}]. Miotubuļi tiek izdalīti no pacienta audiem, tādēļ netiek izslēgta individuālu ģenētisku faktoru (citas izcelsmes kalcija jonu vielmaiņas traucējumi) ietekmes iespējamība. Lai izvairītos no ģenētisko faktoru interferences izmeklējums tika veikts pacientiem II-3 un III-7 ar mutāciju

G528T (Glu-176-Asp). Mūsu gadījumā tika izmantota kalcija jonu koncentrācijas mērīšana miotubuļu kultūrās. Metode tika pielietota, jo to izstrādāja un aprobēja Leipcigas MH laboratorija. Kontroles grupā MHN pacientiem miera kalcija koncentrācija bija 50,7 nmol/l (mediāna), savukārt jaunatklātās mutācijas nēsātājiem miera kalcija koncentrācija bija 74,0 nmol/l (II-3) un 76.5 mmol/l (III-7). Rezultātu atšķirība starp kontroles grupu (MHN) un mutācijas nēsātājiem bija statistiski ticama- $p < 0,001$ (Mann-Whitney-Test), kas ir raksturīgi MHS pacientiem ar *RYR1* gēna mutāciju. Iegūtie rezultāti uzrādīja arī ticamu atšķirību 4Chloro-m-krezola (4CmC) pusmaksimālajā efektīvajā koncentrācijā (EC50) (* $p = 0,002$ salīdzinot ar kontroles grupu). Tas apliecina, ka pacientiem ar mutāciju G528T (Glu-176-Asp) gēnā *RYR1* jau miera stāvoklī muskuļu šūnās ir paaugstināta kalcija jonu koncentrācija un 4CmC mazākā koncentrācijā spēj izraisīt miocīta kontrakciju. Kalcija jonu homeostāzes mērījumu rezultāti pierāda jaunatklātās mutācijas

Atbilstoši EMHG vadlīnijām, mutāciju iekļaušanai MH izraisošo mutāciju sarakstā, jaunatklātās mutācijas ģenētiskajam un funkcionālajam raksturojumam jābūt publicētam zinātniskajā literatūrā.

Pētījumā iegūtie rezultāti tika publicēti Latvijas Zinātņu akadēmijas Vēstīs, Latvijas Universitātes Rakstos un iesniegti publikācijai Eiropas Anestēzijas žurnālā (*European Journal of Anesthesia*).

Tā kā tas kļūst arvien sarežģītāk, jo zinātniskie žurnāli nav ieinteresēti tāda tipa publikācijās, EMHG plāno izstrādāt protokolu prasībām ziņu iesniegšanai par jaunām mutācijām (www.emhg.org).

Atbilstoši EMHG prasībām ir veikti visi nepieciešamie izmeklējumi, kas pierāda mutācijas G528T (Glu-176-Asp) saistību ar MHS fenotipu, bet, lai iekļautu minēto mutāciju MH izraisošo mutāciju sarakstā, nepieciešams konstatēt šo pašu mutāciju vēl vienā ģimenē ar MHS fenotipu. Ņemot vērā, ka MHS pacientu vecāki ir ukraiņu un krievu izcelsmes, ar vislielāko varbūtību šīs mutācijas nēsātāji būtu jāmeklē šajos reģionos. Diemžēl šajās valstīs MH diagnostika netiek veikta, kas samazina iespēju atrast citas ģimenes ar šo pašu mutāciju. Visā austrumu bloka teritorijā ir tikai viena MH laboratorija Čehijā, kas konsultē un izmeklē Čehijas un Slovākijas pacientus.

Arī Latvijā un Baltijā malignai hipertermijai netiek pievērsta pietiekoša uzmanība un par tās iespējamību iedomājas tikai tad, kad ilgstoši pieturas neskaidras izcelsmes drudzis vai klīnika attīstās dramatiski strauji un iestājas pacienta nāve. Vienam AN ģimenes loceklim (III-8) bērnībā pēc apendektomijas operācijas attīstījās komplikācijas - trīs dienas bijusi ļoti augsta temperatūra un viņš kritiskā stāvoklī ārstējies reanimācijas nodaļā, ko retrospektīvi var saistīt

ar malignās hipertermijas izpausmi. Diemžēl šo pacientu neizdevās izmeklēt, jo viņš ir atstājis valsti.

Pēc noklausītām lekcijām par MH, kolēģi atceras klīniskus gadījumus ar pazīmēm, kas raksturīgas vieglai malignās hipertermijas norisei, kuriem viņi nav pievērsuši uzmanību. Tai pat laikā vērojamas nepamatotas bailes veikt anestēziju MH pacientiem- pacientiem tiek atteikta operācija, līdzko anesteziologs uzzina par MHS. Tas liecina, ka nepieciešams plašāks izglītības darbs Latvijas Anesteziologu un Reanimatologu asociācijas (LARA) ietvaros. Izglītojot kolēģus jāuzsver par MH klīniskās norises izmaiņām izmantojot modernos anestēzijas līdzekļus- klīniskā aina vairs nav tik izteikta un pēdējā laika publikācijas rāda, ka vairāk kā 90% gadījumu vērojama abortīva klīniskā aina ar nepilnīgi izteiktām klīniskajām pazīmēm. Klīniski tā izpaužas ar tahikardiju, EtCO₂ pieaugumu un mērenu hipertermiju, kuru atsevišķos gadījumos pat nenovēro. Laboratoriskās izmaiņas (kreatīnkināzes, mioglobīna, kālija koncentrācijas pieaugums serumā) pie tam var būt maz izteiktas.

Ziemeļamerikā no 1987. līdz 2006. gadam no 291 MH gadījumu tikai 8 (2.7%) gadījumos konstatēta sirdsdarbības apstāšanās un 4 (1.4%) iestājās pacienta nāve (Green *et al.*, 2008). Šis pētījums parādīja, ka vairāk kā 95% gadījumu vērojama abortīva klīniskā aina ar nepilnīgi izteiktām klīniskajām pazīmēm. Par to liecina arī vairāk ziņojumu literatūrā, kur apraksta vieglu MH izpausmi ar tahikardiju līdz 95 reizēm minūtē, EtCO₂ pieaugumu no 4.8 līdz 5.2 kPa un rektālās temperatūras paaugstināšanos līdz 39.6°C. Tika konstatēts neliels CK līdz 151 vien/l un kālija līdz 6.1 mmol/l pieaugums, tomēr vēlāk veiktais IVCT tests bija pozitīvs (Bonciu *et al.*, 2007).

Veiktais darbs liecina, ka informētība anesteziologu sabiedrībā par MH ir nepietiekama, lai varētu efektīvi diagnosticēt slimības izpausmes un savlaicīgi sniegt palīdzību pacientiem. Viens no cēloņiem ir arī ne gluži skaidrais MH krīzes palaišanas mehānisms, jo aptuveni 50% no MHS pacientiem, pirms diagnozes uzstādīšanas, saņēmuši anestēziju ar trigervielām. Tātad anamnēzē saņemta anestēzija ar trigervielām negarantē drošību turpmākajās anestēzijās. Jāņem vērā, ka MH bieži ir abortīvas formas, kas izpaužas tikai ar dažiem simptomiem. Iespējams, ka tā cēlonis ir pirmā, otrā un trešā tipa rianodīna receptoru dažādā ekspresija dažādās muskuļu šūnās. Šī iemesla dēļ būtu lietderīgi pievērst lielāku uzmanību sīkajai simptomātikai, par ko arī vairāk parādās regulāras publikācijas medicīniskajā literatūrā. (Chen PL *et al* 2007; Bonciu M., *et al* 2007; Hsu SC, *et al* 2007).

Mūsu veiktā darba rezultātā Latvijā ir aktualizēta MH problēma Latvijā, kā arī izstrādāts un apstiprināts algoritms ārstu rīcībai MH manifestācijas gadījumā. Iespēju robežās apzināti MH pacienti, veikta slimības diagnostika un jaunatklātās mutācijas saistības apstiprināšana ar MHS fenotipu. Noskaidrojot mutācijas nēsātājus un informējot viņus par slimības būtību, viņi

tiek pasargāti no iespējamās slimības manifestācijas, saņemot medicīnisko palīdzību, tā novēršot iespējamu nāvi perioperatīvajā periodā. Izstrādātais rīcības algoritms MH gadījumā ir publicēts LARA vadlīniju apkopojumā. Ir radīta iespēja pacientam MH manifestācijas gadījumā saņemt terapiju ar Dantrolēnu. Latvijā iespējams veikt arī IVCT un molekulāro diagnostiku, bet vēl nav atrisināts jautājums par šo pakalpojumu apmaksas sistēmu. Visi uzskaitītie pasākumi paaugstina pacientu drošību saņemot operatīvu palīdzību, kā arī rada drošākus darba apstākļus ārstiem.

Mūsu radītā diagnostikas sistēma ir sākums malignās hipertermijas diagnostiskās laboratorijas izveidei, kuru pilnveidojot būtu iespējams kvalitatīvi veikt IVCT testus un veikt paplašinātu molekulāro diagnostiku, kā arī radīt atbalsta bāzi Latvijas anesteziologiem. Turpinot šo projektu būtu lietderīgi, ja izveidotā MH laboratorija veiktu MH diagnostiku visās Baltijas valstīs. Tas nodrošinātu pietiekamu pacientu plūsmu, lai tajā strādājošais personāls būtu atbilstoši kvalificēts un pieredzējis un ļautu racionālāk izmantot resursus. Svarīgi būtu panākt, lai valsts apmaksātu šo pakalpojumu. Pagaidām pacientu izmeklēšana iespējama tikai ārzemēs, kur pakalpojumu sadārdzina ceļa izdevumi. Šo iemeslu dēļ Igaunijā dzīvojošs pacients, kuram pirms diviem gadiem bija MH epizode un viņa piederīgie vēl joprojām nav izmeklēti uz MH esamību. Interesei par iespējamu sadarbību izrādījuši arī Pēterburgas kolēģi, kas ļautu paplašināt MH laboratorijas apkalpojamo reģionu.

Paralēli diagnostikas sistēmas izveidošanai un pilnveidošanai jāveic plašs izglītojošais darbs medicīnas personāla starpā, lai slimība tiktu diagnosticēta arī vieglāku un abortīvu formu gadījumā. Tas ļautu veikt profilakses pasākumus, veicot operāciju pacientiem ar zināmu MH diagnozi, tādejādi samazinot novēršamo nāves gadījumu skaitu saistībā ar anestēziju. Liels darba apjoms veicams arī izglītojot Veselības ministrijas amatpersonas un ārstniecības iestāžu administrāciju. Pagaidām šai līmenī neuzskata par lietderīgu ieguldīt naudu Dantrolēna iegādei, lai tas būtu pieejams katrā slimnīcā, kur tiek veiktas operācijas vispārējā anestēzijā. Pamatojums ir – MH manifestācijas risks ir zems un nav lietderīgi ieguldīt līdzekļus. Šobrīd ir atrasts kompromisa variants, izveidojot Dantrolēna rezervi viena līdz divu pacientu ārstēšanai, kura atrodas Katastrofu medicīnas centrā (KMC). Tas daļēji atrisina problēmu Rīgā un tās tuvākajā apkārtnē, bet neatrisina problēmu tālākos lauku rajonos. Tur nebūtu iespējams saņemt Dantrolēnu slimības manifestācijas sākumā, bet tikai vēlākā periodā, kad terapija jau, iespējams būtu neefektīva, jo multiorgānu bojājums jau būtu neatgriezenisks. Tāpēc LARA piedāvāja kompromisa risinājumu izvietojot Dantrolēnu ne vien KMC, bet arī reģionālajās slimnīcās. Tas būtiski samazinātu nepieciešamo laiku, kas nepieciešams, lai nogādātu Dantrolēnu tai slimnīcā, kur notikusi MH klīniskā manifestācija. Diemžēl šādam risinājumam šobrīd nepietiek līdzekļu.

Darbs ir pierādījis, ka Latvijā ir pietiekošs potenciāls, lai izveidotu MH laboratoriju, kur tiks veikta savlaicīga un kvalitatīva MH diagnostika ne vien Latvijas pacientiem, bet arī pacientiem no visām Baltijas valstīm. Izmaiņas mācību procesā nodrošinās medicīnas personāla informētību par malignās hipertermijas problēmu un kvalitatīvu rīcību MH manifestācijas gadījumā. Neskatoties uz esošo ekonomisko situāciju, ir jātiecas uz kvalitatīvu medicīnisko aprūpi, kas nerada pacientam papildus draudus ārstēšanas laikā.

Mūsu darba rezultātā ir atklāta jauna *missense* mutācija *RYR1* gēna 6. eksonā G528T (Glu-176-Asp). Pacientiem tika dokumentēta nukleotīdu un aminoskābju secība, pierādīta MHS ar *in vitro* kontrakcijas testu. No muskuļu biopsijas materiāla tika kultivēti miotubuļi, šajās kultūrās veikti Ca²⁺ homeostāzes mērījumi, kas apliecināja kalcija homeostāzes traucējumus. Simts brīvprātīgiem voluntieriem tika veikta molekulārā diagnostika par šādas nukleotīdu secības esamību, lai izslēgtu Latvijas populācijai raksturīgu polimorfismu. Rezultātā šīs mutācijas iekļaušanai MH izraisīto mutāciju sarakstā ir veikti visi nepieciešamie izmeklējumi, kuri bija iespējami. Mēs esam pārliecināti, ka augstāk minētā mutācija ir cēlonis MHS un šīs mutācijas nēsātājiem jāizvairās no anestēzijas ar trigervielām, kas tiem arī ir rekomendēts. Ar šīs ģimenes locekļiem tiek uzturēti regulāri kontakti un tiem tiek sniegta konsultatīvā palīdzība, tāpat tiek konsultēti anesteziologi, kuri nodrošina minēto pacientu aprūpi operāciju laikā.

SECINĀJUMI

1. Izmantojot Latvijas Anesteziologu un reanimatologu asociācijas datus izdevās noskaidrot divu pacientu AS un AN nāves gadījumus, kur par iespējamo nāves iemeslu tika uzskatīta malignā hipertermija. AS gadījumā tika novērota ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, straujš temperatūras pieaugums, sīnusa tahikardija, AN gadījumā - ģeneralizēta rigiditāte, tumšs urīns, kreatīnkināzes pieaugums, EtCO₂ - 80 mmHg, straujš temperatūras pieaugums un sīnusa tahikardija, kas atbilst 43 un 58 punktiem pēc MH klīniskā novērtējuma skalas (Larach 1994) un liecina, ka MH iespējamība AS gadījumā ir „ļoti ticama” un AN- „visticamākā”. Abos gadījumos nebija pieejama asins gāzu analīze un terapija ar Dantrolēnu un AS gadījumā arī CO₂ koncentrācija izelpas gaisā, kas varētu dot papildus atbilstoši 25 un 40 punktus. Tika sameklēti abu pacientu piederīgie, lai iegūtu anamnēzes datus, kas varētu liecināt par iespējamām MH izpausmēm.
2. Abos zināmajos gadījumos pacientiem tika novērota ģeneralizēta muskulatūras rigiditāte, straujš temperatūras pieaugums virs 40°C, tumšas krāsas urīns, tahikardija vairāk kā 150 reizes minūtē, sirds ritma traucējumi, AN gadījumā arī izteikti paaugstināts kreatīnkināzes līmenis asinīs- 1616 vienības un CO₂ koncentrācija izelpojamā gaisā- virs 80 mmHg. Pacientu nāve iestājās piecu stundu laikā no anestēzijas sākuma. Tā kā abi pacienti bija miruši, tika izmeklēti viņu ģimenes locekļi. AS (II-1) ģimenē pētījumā piedalījās mirušās pacientes māte un māsa (I-1 un II-3), kurām anamnēzē nav anestēzijas ar trigervielām un nav muskuļu distrofijas pazīmju. AN (II-2) ģimenē pētījumā piedalījās dēls (III-3), meita (III-4) un viņas dēli (III-2 un III-3) kā arī pacienta māsa (II-3), viņas meita (III-7) un mazmeita (III-4). Māsasmeitai (III-7) novēroja vieglas muskuļu distrofijas pazīmes- ātru nogurdināmību, pastiprinātas muskuļu sāpes un pseidohipertrofiju pēc slodzes. Nevieni no ģimenes locekļiem anamnēzē nav saņēmis anestēziju ar trigervielām.
3. Molekulārā diagnostika atklāja jaunu punktveida mutāciju G528T (Glu-176-Asp) *RYR1* gēnā AN ģimenes locekļiem: II-3, III-4, III-7 un IV-4. Personām II-3 un III-7 tika veikts *In vitro* kontrakcijas tests, kurš uzrādīja uzņēmīgumu pret maligno hipertermiju (MHS). Turpmāk šo personu biopsijā iegūtie muskuļaudi tika kultivēti, lai izaudzētu miotubuļu kultūru, kurā veiktie kalcija jonu koncentrācijas mērījumi citosolā uzrādīja statistiski ticamu kalcija jonu koncentrācijas atšķirību MHS un kontrolgrupas paraugos. Veiktie izmeklējumi apstiprināja jaunatklātās mutācijas

G528T (Glu-176-Asp) saistību ar MHS fenotipu. AS ģimenes locekļiem mutācija *RYR1* gēnā netika atrasta un IVCT netika veikts.

4. Pacienti ar apstiprināto MH diagnozi tika informēti par iespējamiem ar anestēziju saistītajiem sarežģījumiem un kā no tiem izvairīties. Pacientiem nodrošināta iespēja saņemt konsultācijas un atbalstu, ja tiem nepieciešama operatīva terapija. Latvijas MHS pacienti tiks pārstāvēti arī jaundibinātajā Eiropas malignās hipertermijas asociācijā (EMHA). EMHG mājas lapā ir ievietota kontaktinformācija, kas ārvalstu MHS pacientiem ļauj iegūt nepieciešamo informāciju par iespējām saņemt drošu veselības aprūpi Latvijā.
5. Ir izstrādātas un apstiprinātas rekomendācijas rīcībai MH manifestācijas gadījumā, kuras publicētas LARA vadlīnijās. Panākta vienošanās ar Veselības ministriju, Veselības norēķinu centru un Neatliekamās medicīniskās palīdzības dienestu Dantrolēna pieejamības nodrošināšanai Latvijas slimnīcās.

VĚRES

1. Aitkenhead AR. Injuries associated with anaesthesia. A global perspective. *Br J Anaesth*. 2005 Jul;95(1):95-109. Epub 2005 May 20.
2. Aleksic, V., Radulovic, D., Milakovic, B., Nagulic, M., Vucovic, D., Antunovic, V., et al. (2009). A retrospective analysis of anesthesiologic complications in pediatric neurosurgery. *Paediatric Anaesthesia*, 19(9), 879-886.
3. Allen DG, Westerblad H. Role of phosphate and calcium stores in muscle fatigue. *J Physiol*. 2001 Nov 1;536(Pt 3):657-65. Review.
4. Anetseder M, Hartung E, Klepper S, Reichmann H. Gasoline vapors induce severe rhabdomyolysis. *Neurology* 1994;44(12):2393-2395.
5. Avila G, O'Connell KM, Groom LA, Dirksen RT. Ca²⁺ release through ryanodine receptors regulates skeletal muscle L-type Ca²⁺ channel expression. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):17732-8.
6. Avila G, O'Connell KM, Dirksen RT. The pore region of the skeletal muscle ryanodine receptor is a primary locus for excitation-contraction uncoupling in central core disease. *J Gen Physiol*. 2003 Apr;121(4):277-86. Epub 2003 Mar 17.
7. Balog E, Fruen B, Shomer N, Louis C. Divergent effects of the malignant hyperthermia-susceptible Arg(615)-->Cys mutation on the Ca(2+) and Mg(2+) dependence of the RyR1. *Biophys J* 2001;81 (4): 2050-8.
8. Bellinger AM, Mongillo M, Marks AR. Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *Journal of Clinical Investigation*; Feb 2008; 118, 2.
9. Bendahan D, Guis S, Monnier N, Kozak-Ribbens G, Lunardi J, Ghattas B, Mattei JP, Cozzone PJ. Comparative analysis of in vitro contracture tests with ryanodine and a combination of ryanodine with either halothane or caffeine: a comparative investigation in malignant hyperthermia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004 Sep;48(8):1019-27.
10. Benumof JL, Saidman LJ. *Anesthesia & Perioperative Complications* 2000; 349-53.
11. Bonciu, M., Chapelle, A., Delpech, H., Depret, T., Krivosic-Horber, R., Aime, MR. (2007) Minor increase of endtidal CO₂ during sevoflurane induced malignant hyperthermia. *Pediatric Anesthesia*, **17**, 180-182.
12. Braz LG, M3dolo NSP, Nascimento P. Jr, Bruschi BAM, & et al. (2006). Perioperative cardiac arrest: a study of 53 718 anaesthetics over 9 yr from a Brazilian teaching hospital. *British Journal of Anaesthesia*, 96(5), 569-75.)

13. Brinkmeier H, Krämer J, Krämer R, Iaizzo PA, Baur C, Lehmann-Horn F, Rüdell R. Malignant hyperthermia causing Gly2435Arg mutation of the ryanodine receptor facilitates ryanodine-induced calcium release in myotubes. *Br J Anaesth*. 1999 Dec;83(6):855-61.
14. Cabello A, Ricoy-Campo JR. Congenital myopathies. *Rev Neurol*. 2003 Oct 16-31;37(8):779-86.
15. Catterall WA. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell*. 1991 Mar 8;64(5):871-4. Review.
16. Chamley D, Pollock AN, K.M. S, Brown RL. Malignant Hyperthermia in Infancy and Identification of a novel RYR1 mutation. *Br Journal Anaesth* 2000;84:500-504.
17. Chen PL, Day YJ, Su BC, Lee PC, Chen CY. Delayed onset of sevoflurane-induced juvenile malignant hyperthermia after second exposure. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2007 Sep;45(3):189-93.
18. Chin ER, Allen DG. The role of elevations in intracellular [Ca²⁺] in the development of low frequency fatigue in mouse single muscle fibres. *J Physiol*. 1996 Mar 15;491 (Pt 3):813-24.
19. Denbrough MA, Lovell RRH. Anaesthetic deaths in a family. *Lancet* 1960; 2:45.
20. Denbrough M. Malignant hyperthermia. *Lancet* 1998; 1131-6.
21. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*. 2007 Jan;36(1):1-7. Review.
22. Dirksen RT, Avila G. Distinct effects on Ca²⁺ handling caused by malignant hyperthermia and central core disease mutations in RyR1. *Biophys J*. 2004 Nov;87(5):3193-204. Epub 2004 Sep 3.
23. Edwards RH, Hill DK, Jones DA, Merton PA. Fatigue of long duration in human skeletal muscle after exercise. *J Physiol*. 1977 Nov;272(3):769-78.
24. *Eu, J.P., Xu, L., Stamler, J.S., Meissner, G. 1999.* Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species. *Biochem. Pharm.* 57:1079±1084.
25. European MH Group. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anaesth* 1984; 56: 1267 – 9.
26. Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*. 2002 Oct;82(4):893-922. Review.
27. Fitts RH. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev*. 1994 Jan;74(1):49-94. Review.

28. Flück M., Mund SI., Schittny JC., Klossner S., Durieux AC., Giraud MN. Mechano-regulated tenascin-C orchestrates muscle repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 9; Vol. 105 (36), pp. 13662-7.
29. Fodale V., Santamaria L.B., Schifilliti D., Mandal P. K. Anaesthetics and post-operative cognitive dysfunction: a pathological mechanism mimicking Alzheimer's Disease. *Anesthesia Journal* (Vol 65(4) page 388-395, April 2010).
30. Fryer MW, Owen VJ, Lamb GD, Stephenson DG. Effects of creatine phosphate and P(i) on Ca²⁺ movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1995 Jan 1;482 (Pt 1):123-40.
31. Galli L, Orrico A, Lorenzini S, Censini S, Falciani M, Covacci A, Tegazzin V, Sorrentino V. Frequency and localization of mutations in the 106 exons of the RYR1 gene in 50 individuals with malignant hyperthermia. *Hum Mutat.* 2006;27 (8): 830.
32. Girard T, Ginz HF, Urwyler A. Die Maligne Hyperthermie. *Anaesthesist* 1994;42:557-562.
33. Girard T, Urwyler A, Censier K, Mueller CR, Zorzato F, Treves S. Genotype-phenotype comparison of the Swiss malignant hyperthermia population. *Hum Mutat.* 2001; 18: 357-8.
34. Gommans IM, Vlaskovits MH, de Haan A, van Engelen BG. Calcium regulation and muscle disease. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23(1):59-63.
35. Gonzalez-Serratos H, Valle-Aguilera R, Lathrop DA, Garcia MC. Slow inward calcium currents have no obvious role in muscle excitation-contraction coupling. *Nature.* 1982 Jul 15;298(5871):292-4.
36. GRIFFITHS, R. & NORMAN, R.I. (1993). Effects of anaesthetics on uptake, synthesis and release of transmitters. *Br. J. Anaesth.*, 71, 96-107.
37. Halsall PJ, Cain PA, Ellis FR. Retrospective analysis of anaesthetics received by patients before susceptibility to malignant hyperpyrexia was recognised. *Br J Anaesth* 1979;51: 949-54.
38. Halsall PJ, Hopkins PM. Malignant hyperthermia, *BJ of Anaesthesia*, CEPD reviews 2003 Vol.3; 381-5
39. Hsu SC, Huang WT, Yeh HM, Hsieh AY. Suspected malignant hyperthermia during sevoflurane anesthesia. *J Chin Med Assoc.* 2007 Nov;70(11):507-10.
40. Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F. Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve.* 2000 Jan;23(1):4-17.

41. Kaulins T, Pronina N, Rüffert H, Wehner M, Mihelons M, Osipova O, Miscuks A. Identification of A Novel Mutation in *RYR1* Gene in Malignant Hyperthermia-Like Patient's Family Members. *Proc Latvian Acad Sci* 2008;62(4/5):156-161.
42. Krause, T., Gerbershagen, MU., Fiege, M., Weisshorn, R., Wappler, F. (2004) Dantrolene - a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*, 59(4), 364-373.
43. Lamb GD, Junankar PR, Stephenson DG. Raised intracellular [Ca²⁺] abolishes excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of rat and toad. *J Physiol*. 1995 Dec 1;489 (Pt 2):349-62.
44. Larach MG, Localio AR, Allen GC, Denborough MA, Ellis FR, Gronert GA, Kaplan RF, Muldoon SM, Nelson TE, Ording H, et al. A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology*. 1994 Apr;80(4):771-9.
45. Litman R, Rosenberg H. Malignant hyperthermia: update on susceptibility testing. *JAMA* 2005;293 (23): 2918–24.
46. Lunde PK, Dahlstedt AJ, Bruton JD, Lännergren J, Thorén P, Sejersted OM, Westerblad H. Contraction and intracellular Ca²⁺ handling in isolated skeletal muscle of rats with congestive heart failure. *Circ Res*. 2001 Jun 22;88(12):1299-305.
47. Lynch PJ, Tong J, Lehane M, Mallet A, Giblin L, Heffron JJ, Vaughan P, Zafra G, MacLennan DH, McCarthy TV. A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca²⁺ release channel function and severe central core disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 4164–9.
48. MacLennan DH, Phillips MS. Malignant hyperthermia. *Science*. 1992 May 8;256(5058):789-94. Review.
49. Marx SO, Ondrias K, Marks AR. Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science*. 1998 Aug 7;281(5378):818-21.
50. Marks AR, Tempst P, Hwang KS, Taubman MB, Inui M, Chadwick C, Fleischer S, Nadal-Ginard B. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(22):8683-7.
51. Mathews KD, Moore SA. Multimicore myopathy, central core disease, malignant hyperthermia susceptibility, and RYR1 mutations: one disease with many faces? *Arch Neurol*. 2004 Jan;61(1):27-9. Review.
52. Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature*. 1992 Dec 10;360(6404):588-91.

53. McCarthy EJ. Malignant Hyperthermia: pathophysiology, clinical presentation and treatment. *AACN Clin Issues*. 2004 Apr-Jun;15(2); 231-7.
54. McCarthy TV, Quane K, Lynch PJ. Ryanodine receptor mutation in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* 2000;15:410–17.
55. Mickelson JR, Gallant EM, Litterer LA, Johnson KM, Rempel WE, Louis CF. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *J Biol Chem*. 1988 Jul 5;263(19):9310-5.
56. Mickelson JR, Louis CF. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel, and cell Ca²⁺ regulation defects. *Physiol Rev*. 1996 Apr;76(2):537-92. Review.
57. Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J. Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1997;60(6): 1316–25.
58. Monnier N, Romero NB, Lerale J, Nivoche Y, Qi D, MacLennan DH, Fardeau M, Lunardi J. An autosomal dominant congenital myopathy with cores and rods is associated with a neomutation in the RYR1 gene encoding the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 2599–608.
59. Monnier N, Kozak-Ribbens G, Krivosic-Horber R, Nivoche Y, Qi D, Kraev N, Loke J, Sharma P, Tegazzin V, Figarella-Branger D, Roméro N, Mezin P, Bendahan D, Payen JF, Depret T, MacLennan DH, Lunardi J. Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional, and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mutat* 2005;26:413–25.
60. Muller CR. Criteria for gene mutations to be used in genetic testing of Malignant Hyperthermia susceptibility. *EMHG*, 2004. <http://www.emhg.org>.
61. Nelson TE, Sweo T. Ca²⁺ uptake and Ca²⁺ release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 1988;69: 571-577.
62. Neville C, Rosenthal N, McGrew M, Bogdanova N, Hauschka S. Skeletal muscle cultures. *Methods Cell Biol* 1998; 52: 85– 116.
63. Girard T, Ginz HF, Urwyler A. Die Maligne Hyperthermie. *Anaesthesist* 1994;42:557-562
64. Olafsson E, Jones HR Jr, Guay AT, Thomas CB. Myopathy of endogenous Cushing's syndrome: a review of the clinical and electromyographic features in 8 patients. *Muscle Nerve*. 1994 Jun;17(6):692-3.

65. Ording H for the European Malignant Hyperthermia Group. In vitro contracture test for the diagnosis of malignant hyperthermia following the protocol of the European MH Group: Results of testing patients surviving fulminant MH and unrelated low-risk subjects. *Acta Anesthesiol Scandinavica* 1997; 41: 955 – 66.
66. Oyamada H, Oguchi K, Saitoh N, Yamazawa T, Hirose K, Kawana Y, Wakatsuki K, Oguchi K, Tagami M, Hanaoka K, Endo M, Iino M. Novel mutations in C-terminal channel region of the ryanodine receptor in malignant hyperthermia patients. *Jpn J Pharmacol.* 2002 Feb;88(2):159-66.
67. Paolini C, Fessenden JD, Pessah IN, Franzini-Armstrong C. Evidence for conformational coupling between two calcium channels (Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101 (34)12748-12752.
68. Pessah IN, Francini AO, Scales DJ, Waterhouse AL, Casida JE. Calcium-ryanodine receptor complex: solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 1986;261:8643–8.
69. Plant DR, Lynch GS. Depolarization-induced contraction and SR function in mechanically skinned muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Sep;285(3):C522-8. Epub 2003 Apr 30.
70. Priori SG, Napolitano C. Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca²⁺ release channels. *J Clin Invest* 2005;115:2033–8.
71. Quane KA, Healy JM, Keating KE, Manning BM, Couch FJ, Palmucci LM, Doriguzzi C, Fagerlund TH, Berg K, Ording H. Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nat Genet.* 1993 Sep;5(1):51-5.
72. Reiken S, Lacampagne A, Zhou H, Kherani A, Lehnart SE, Ward C, Huang F, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Rosemlit N, Warren MS, He KL, Yi GH, Wang J, Burkhoff D, Vassort G, Marks AR. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol.* 2003 Mar 17;160(6):919-28. Epub 2003 Mar 10.
73. Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):444-53. Epub 2002 Oct 24.
74. Richter M, Schleithoff L, Deufel T, Lehmann-Horn F, Herrmann-Frank A. Functional characterization of a distinct ryanodine receptor mutation in human malignant hyperthermia-susceptible muscle. *J Biol Chem.* 1997 Feb 21;272(8):5256-60.

75. Rios E, Brum G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):717-20.
76. Robinson RL, Brooks C, Brown SL, Ellis FR, Halsall PJ, Quinnell RJ, Shaw MA, Hopkins PM. RYR1 mutations causing central core disease are associated with more severe malignant hyperthermia in vitro contracture test phenotypes. *Hum Mutat*. 2002; 20: 88–97.
77. Rosenberg, H., Davis, M., James, D., Pollock, N., Stwell, K. (2007) Malignant hyperthermia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 24, 2-21.
78. Rosenberg H, Sambuughin N, Dirksen R. Malignant Hyperthermia Susceptibility. *GeneReviews*, 19 January 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=mhs>.
79. Rueffert H, Olthoff D, Deutrich C, Meinecke CD, Froster UG. Mutation screening in the ryanodine receptor 1 gene (RYR1) in patients susceptible to malignant hyperthermia who show definite IVCT results: identification of three novel mutations. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2002; 46: 692–8.
80. Schmoelzl S., Leeb T., Brinkmeier H., Bremi G. and Brenig B. Regulation of Tissue-specific Expression of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Gene. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 271, No. 9, Issue of March 1, pp. 4763–4769, 1996.
81. Sakai EM, Connolly LA, Klauck JA (December 2005) “Inhalation anesthesiology and volatile liquid anesthetics: focus on isoflurane, desflurane and sevoflurane” *Pharmacotherapy* **25** (12): 1773–88.
82. Sambuughin N, Nelson TE, Jankovic J, Xin C, Meissner G, Mullakandov M, Ji J, Rosenberg H, Sivakumar K, Goldfarb LG. Identification and functional characterization of a novel ryanodine receptor mutation causing malignant hyperthermia in North American and South American families. *Neuromuscul Disord*. 2001b; 11: 530–7.
83. Sambuughin N, Holley H, Muldoon S, Brandom BW, de Bantel AM, Tobin JR, Nelson TE, Goldfarb LG. Screening of the entire ryanodine receptor type 1 coding region for sequence variants associated with malignant hyperthermia susceptibility in the north american population. *Anesthesiology*. 2005; 102: 515–21.
84. Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca²⁺-ATPase. *Arch Biochem Biophys*. 1986 May 1;246(2):589-601.

85. Shomer NH, Mickelson JR, Louis CF. Caffeine stimulation of malignant hyperthermia-susceptible sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1994;267:C1253-61.
86. Schoser BG, Pongratz D. Extraocular mitochondrial myopathies and their differential diagnoses. *Strabismus*. 2006 Jun;14(2):107-13. Review.
87. Sorrentino V, Barone V, Rossi D. Intracellular Ca²⁺ release channels in evolution. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10(6):662-7.
88. Stabernack CR, Eger EI 2nd, Warnken UH, Förster H, Hanks DK, Ferrell LD (2003). "Sevoflurane degradation by carbon dioxide absorbents may produce more than one nephrotoxic compound in rats". *Can J Anaesth* **50** (3): 249–52.
89. Stange M, Xu L, Balshaw D, Yamaguchi N, Meissner G. Characterization of recombinant skeletal muscle (Ser-2843) and cardiac muscle (Ser-2809) ryanodine receptor phosphorylation mutants. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51693-702. Epub 2003 Oct 7.
90. Stewart SL, Hogan K, Rosenberg H, Fletcher JE. Identification of the Arg1086His mutation in the alpha subunit of the voltage-dependent calcium channel (*CACNA1S*) in a North American family with malignant hyperthermia. *Clin Genet*. 2001 Mar;59(3):178-84.
91. Sun J; Xin C; Eu JP; Stamler JS; Meissner G. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America [Proc Natl Acad Sci U S A]* 2001 Sep 25; Vol. 98 (20), pp. 11158-62.
92. Tammaro A, Bracco A, Cozzolino S, Esposito M, Di Martino A, Savoia G, Zeuli L, Piluso G, Aurino S, Nigro V. Scanning for mutations of the ryanodine receptor (RYR1) gene by denaturing HPLC: detection of three novel malignant hyperthermia alleles. *Clin Chem*. 2003 May;49(5):761-8.
93. Tanabe T, Beam KG, Adams BA, Niidome T, Numa S. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):567-9.
94. Tilgen N, Zorzato F, Halliger-Keller B, Muntoni F, Sewry C, Palmucci LM, Schneider C, Hauser E, Lehmann-Horn F, Müller CR, Treves S. Identification of four novel mutations in the C-terminal membrane spanning domain of the ryanodine receptor 1: association with central core disease and alteration of calcium homeostasis. *Hum Mol Genet*. 2001 Dec 1;10(25):2879-87.
95. Tobin JR, Jason DR, Challa VR, Nelson TE, Sambuughin N. Malignant hyperthermia and apparent heat stroke. *JAMA*. 2001 Jul 11;286(2):168-9.

96. Tomiņš P, Mežavilka I, Putniņš V. Narkozes komplikācija – malignā hipertermija. *Jums, Kolēģi* 2004;2:23-6.
97. Tong J, McCarthy TV, MacLennan DH. Measurement of resting cytosolic Ca²⁺ concentrations and Ca²⁺ store size in HEK-293 cells transfected with malignant hyperthermia or central core disease mutant Ca²⁺ release channels. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):693-702.
98. Tong J, Oyamada H, Demareux N, Grinstein S, McCarthy TV, MacLennan DH. Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca²⁺ release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem.* 1997; 272: 26332–9.
99. Treves S, Anderson AA, Ducreux S, Divet A, Bleunven C, Grasso C, Paesante S, Zorzato F. Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord.* 2005 Oct;15(9-10):577-87. Review.
100. Tripathy A, Xu L, Mann G, Meissner G. Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *Biophys J.* 1995 Jul;69(1):106-19.
101. Vanags, A. *Sondore Klīniskā anestezioloģija un intensīvā terapija, Nacionālais apgāds*, 2008 pp. 14- 19.
102. Wang X; Engisch KL; Li Y; Pinter MJ; Cope TC; Rich MM Decreased synaptic activity shifts the calcium dependence of release at the mammalian neuromuscular junction in vivo. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience [J Neurosci]* 2004 Nov 24; Vol. 24 (47), pp. 10687-92.
103. Wappler, F. (2001) Malignant hyperthermia. *European Journal of Anaesthesiology*, 18, 632-652.
104. Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1988 Feb 26;52(4):503-13.
105. Wedel D J. Malignant Hyperthermia – An Update. *IARS Review Course Lectures 2000*: 100 – 4.
106. Wehner M, Rueffert H, Koenig F, Neuhaus J, Olthoff D. Increased sensitivity to 4-chloro-m-cresol and caffeine in primary myotubes from malignant hyperthermia susceptible individuals carrying the ryanodine receptor 1 Thr2206Met (C6617T) mutation. *Clin Genet.* 2002 Aug;62(2):135-46.

107. Wehner M, Rueffert H, Koenig F, Olthoff D. Functional characterization of malignant hyperthermia- associated RyR1 mutations in exon 44, using the human myotubes model. *Neuromuscul Disord.* 2004 Jul;14(7):429-37
108. Weisshorn R, Wappler F, Fiege M, Gerbershagen MU, Kolodzie K, Alberts P, Horn EP, Schulte Am Esch J. Ryanodine contracture threshold times for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility: an experimental approach from a single laboratory. *J Clin Anesth.* 2004; 16(5): 353 -7.
109. Westerblad H, Allen DG. Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *J Gen Physiol.* 1991 Sep;98(3):615-35.
110. Westerblad H, Bruton JD, Allen DG, Lännergren J. Functional significance of Ca²⁺ in long-lasting fatigue of skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2000 Oct;83(2-3):166-74.
111. Westerblad, H., Duty, S., Allen, D. C. (1993). Intracellular calcium concentration during low-frequency fatigue in isolated single fibers of mouse skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 75, 382-388.
112. Westerblad H, Allen DG. Mechanisms underlying changes of tetanic [Ca²⁺]_i and force in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1996 Mar;156(3):407-16.
113. Woods CE, Novo D, DiFranco M, Vergara JL. The action potential-evoked sarcoplasmic reticulum calcium release is impaired in mdx mouse muscle fibres. *J Physiol.* 2004 May 15;557(Pt 1):59-75. Epub 2004 Mar 5.
114. Woods CE, Novo D, DiFranco M, Capote J, Vergara JL. Propagation in the transverse tubular system and voltage dependence of calcium release in normal and mdx mouse muscle fibres. *J Physiol.* 2005 Nov 1;568(Pt 3):867-80. Epub 2005 Aug 25.
115. Wu S, Ibarra CAM, Malicdan MCV, Murayama K, Ichihara Y, Kikuchi H, Nonaka I, Noguchi S, Hayashi YK., Nishino I. Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients. *Brain* (2006), 129, 1470–1480.
116. Xie Z., Dong Y., Maeda U., Moir R. D., Xia W., Culley D. J., Crosby G., Tanzi R. E. The Inhalation Anesthetic Isoflurane Induces a Vicious Cycle of Apoptosis and Amyloid β -Protein Accumulation. *Journal of Neuroscience* 2007, 27 (6): 1247–1254
117. Yang T, Ta T, Pessah I, Allen P. Functional defects in six ryanodine receptor isoform-1 (RyR1) mutations associated with malignant hyperthermia and their impact on skeletal excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* 2003;278(28):25722–30.

118. Zalk R, Lehnart SE, Marks AR. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:367-85.
119. Zhang Y., Chen HS., Khanna VK., De Leon S., Phillips MS., Schappert K., Britt BA., Browell AK., MacLennan DH. A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease. *Nature Genetics [Nat Genet]* 1993 Sep; Vol. 5 (1), pp. 46-50.
120. Zheng YM, Wang QS, Liu QH, Rathore R, Yadav V, Wang YX. Heterogeneous Gene Expression and Functional Activity of Ryanodine Receptors in Resistance and Conduit Pulmonary as well as Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells. *J Vasc Res* 2008;45:469-479.
121. Zhou H; Jungbluth H; Sewry CA; Feng L; Bertini E; Bushby K; Straub V; Roper H; Rose MR; Brockington M; Kinali M; Manzur A; Robb S; Appleton R; Messina S; D'Amico A; Quinlivan R; Swash M; Müller CR; Brown S; Treves S; Muntoni F. Molecular mechanisms and phenotypic variation in RYR1-related congenital myopathies. *Brain: A Journal Of Neurology [Brain]* 2007 Aug; Vol. 130 (Pt 8), pp. 2024-36.

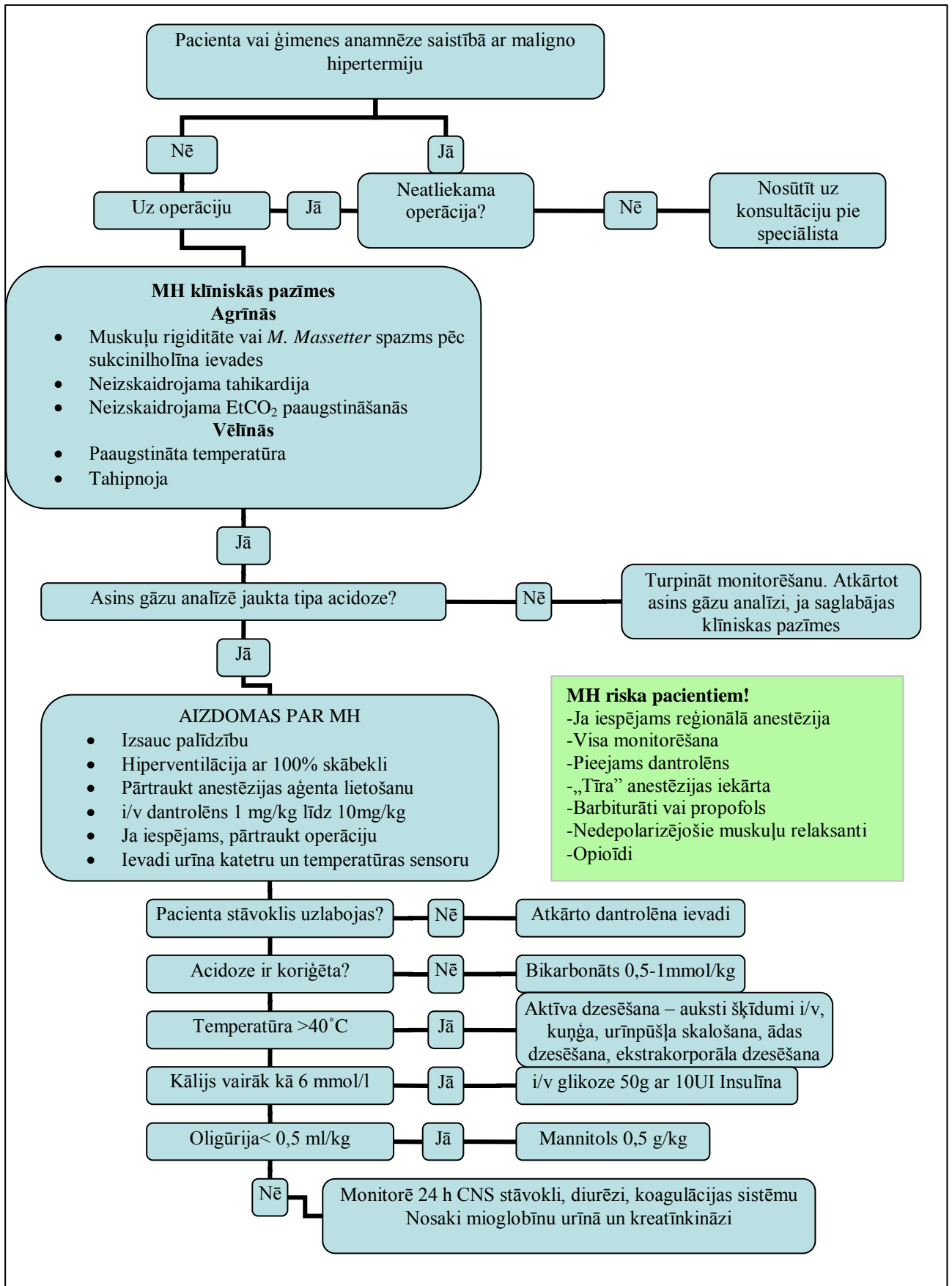
PIELIKUMS

MH klīniskā novērtējuma skala

| | Simptomi un pazīmes | Punkti |
|------------------------------|--|--------|
| I. Rigiditāte | a. Ģeneralizēta rigiditāte bez drebuļiem | 15 |
| | b. <i>M. Masseter</i> spazms tūlīt pēc Sukcinilholīna ievades | 15 |
| II. Muskuļu bojājums | a. Kreatīnkināzes pieaugums vairāk kā 100x pēc anestēzijas ar sukcinilholīnu | 15 |
| | b. Kreatīnkināzes pieaugums vairāk kā 50x pēc anestēzijas bez sukcinilholīna | 15 |
| | c. Tumšs urīns (Cola colored) pēcoperācijas periodā | 10 |
| | d. Mioglobīns urīnā >60 mkg/l | 5 |
| | e. Mioglobīns serumā >170 mkg/l | 5 |
| | f. Kālijs virs 6mmol/l bez nieru mazspējas | 3 |
| III. Respiratora acidoze | a. pETCO ₂ >55mmHg veicot adekvātu kontrolētu ventilāciju | 15 |
| | b. paCO ₂ >60mmHg veicot adekvātu kontrolētu ventilāciju | 15 |
| | c. pETCO ₂ >60 mmHg spontāni elpojot | 15 |
| | d. paCO ₂ >65 mmHg spontāni elpojot | 15 |
| | e. Neatbilstoša hiperkarbija (anesteziologa viedoklis) | 15 |
| | f. Neatbilstoša tahikardija (anesteziologa viedoklis) | 10 |
| IV. Temperatūras pieaugums | a. Neatbilstoši straujš temperatūras pieaugums (anesteziologa viedoklis) | 15 |
| | b. Neatbilstošs temperatūras pieaugums >38.8 perioperatīvajā periodā (anesteziologa viedoklis) | 10 |
| V. Kardioloģiskais stāvoklis | a. Neatbilstoša sīnusa tahikardija | 3 |
| | b. Ventrikulāra tahikardija vai fibrillācija | 3 |
| VI. Citas pazīmes | d. Arteriālais bāzu ekscess negatīvāks par -8mEq/l | 10 |
| | e. Arteriālais pH <7.25 | 10 |
| | f. Ātri atgriezenisks ar dantrolēnu | 5 |

MH klīniskās skalas punktu vērtējums. Saskaita augstākās vērtības I. Līdz V. Grupās un visas vērtības VI. Grupā.

| Punkti | MH kategorija | Ticamības pakāpe |
|---------|---------------|--------------------------|
| 0 | 1 | Visbiežāk nē |
| 3 - 9 | 2 | Maz ticams |
| 10-19 | 3 | Nedaudz mazāk kā ticams |
| 20 – 34 | 4 | Nedaudz vairāk kā ticams |
| 35 – 49 | 5 | Ļoti ticams |
| 50 + | 6 | Visticamākais |



1. att. MH terapijas algoritms

MH izraisošās mutācijas RYR1 gēnā

| <i>Nr.</i> | <i>Eksons</i> | <i>Nukleotīds</i> | <i>Aminoskābe</i> |
|------------|---------------|-------------------------|-------------------|
| 1 | 2 | c.103T>C | Cys35Arg |
| 2 | 6 | c.487C>T | Arg163Cys |
| 3 | 6 | c.488G>T | Arg163Leu |
| 4 | 9 | c.742G>A | Gly248Arg |
| 5 | 11 | c.1021G>C vai c.1021G>A | Gly341Arg |
| 6 | 12 | c.1209C>G | Ile403Met |
| 7 | 14 | c.1565A>C | Tyr522Ser |
| 8 | 15 | c.1654C>T | Arg552Trp |
| 9 | 17 | c.1840C>T | Arg614Cys |
| 10 | 17 | c.1841G>T | Arg614Leu |
| 11 | 39 | c.6487C>T | Arg2163Cys |
| 12 | 39 | c.6488G>A | Arg2163His |
| 13 | 39 | c.6502G>A | Val2168Met |
| 14 | 40 | c.6617C>T | Thr2206Met |
| 15 | 40 | c.6617C>G | Thr2206Arg |
| 16 | 44 | c.7048G>A | Ala2350Thr |
| 17 | 44 | c.7124G>C | Gly2375Ala |
| 18 | 45 | c.7282G>A | Ala2428Thr |
| 19 | 45 | c.7300G>A | Gly2434Arg |
| 20 | 45 | c.7304G>A | Arg2435His |
| 21 | 46 | c.7360C>T | Arg2454Cys |
| 22 | 46 | c.7361G>A | Arg2454His |
| 23 | 46 | c.7372C>T | Arg2458Cys |
| 24 | 46 | c.7373G>A | Arg2458His |
| 25 | 47 | c.7522C>T | Arg2508Cys |
| 26 | 100 | c.14387A>G | p.Tyr4796Cys |
| 27 | 100 | c.14477C>T | p.Thr4826Ile |
| 28 | 101 | c.14512C>G | p.Leu4838Val |
| 29 | 101 | c.14582G>A | p.Arg4861His |
| 30 | 102 | c.14693T>C | p.Ile4898Thr |

SALSA MLPA P282-A2 RYRI nosakāmas mutācijas

| <i>Nr.</i> | <i>Eksons</i> | <i>Mutācija</i> |
|------------|---------------|-----------------|
| 1 | 2 | T103C |
| 2 | 6 | C487T |
| 3 | 6 | G488T |
| 4 | 9 | G742A |
| 5 | 11 | G1021A |
| 6 | 12 | C1209G |
| 7 | 14 | A1565C |
| 8 | 15 | C1654T |
| 9 | 17 | C1840T |
| 10 | 17 | G1841T |
| 11 | 39 | C6487T |
| 12 | 39 | G6488A |
| 13 | 39 | G6502A |
| 14 | 40 | C6617G |
| 15 | 40 | C6617T |
| 16 | 43 | G7007A |
| 17 | 43 | A7025G |
| 18 | 44 | G7048A |
| 19 | 44 | C7063T |
| 20 | 44 | G7124C |
| 21 | 45 | G7300A |
| 22 | 45 | G7304A |
| 23 | 46 | G7361A |
| 24 | 46 | G7373A |
| 25 | 98 | C14215T |
| 26 | 100 | A14387G |
| 27 | 100 | C14477T |
| 28 | 100 | C14483T |
| 29 | 101 | C14512G |
| 30 | 101 | G14551A |
| 31 | 101 | G14582A |
| 32 | 102 | T14693C |
| 33 | 104 | C14924T |

Drošo un potenciāli bīstamo medikamentu uzskaitījums MH pacientiem

| Trigeri | Drošie medikamenti |
|----------------|---|
| Halotāns | Slāpekļa oksiduls |
| Enflurāns | Visi intravenozie anestētiķi |
| Izoflurāns | Visi benzodiazepīni |
| Sevoflurāns | Nedepolarizējošie muskuļu relaksanti |
| Desflurāns | Lokālie anestētiķi, arī kombinācijā ar vazokonstriktoriem |
| Sukcinilholīns | Visi analgētiķi, ieskaitot opioīdus |
| | Neostigmīns |
| | Atropīns |
| | Glikopirrolāts |
| | Metoklopramīds |
| | Droperidols |