Abteilung für Neuroanästhesie
Neurochirurgische Universitätsklinik Ulm
im Bezirkskrankenhaus Günzburg
Chefarzt: Dr. med. Dirk Repkewitz

Europäische Multicenter-Studie zur Evaluation gesicherter Maligne Hyperthermie Krisen

- Triggersubstanzen und Risikofaktoren

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Sebastian Heiderich
aus Hildesheim
2013

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
Erster Berichterstatter:	PD W. Klingler
Zweiter Berichterstatter:	PD W. Melzer
Tag der Promotion:	11.04.2014

„Wenn dem Menschen nicht mehr daran gelegen sein wird Atome und Planeten zu bewegen,
wird die Welt ihm gegenüber sehr wehrlos sein,
weil der Mensch sie sich dann so ausdeuten kann, wie es ihm beliebt.“
- Stanislaw Lem

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden Fachartikeln veröffentlicht:

Klingler W, Heiderich S, Girard T, Gravino E, Heffron JJ, Johannsen S, Jurkat-Rott K, Rüffert H, Schuster F, Snoeck M, Sorrentino V, Tegazzin V, Lehmann-Horn F: Functional and genetic characterization of clinical malignant hyperthermia crises: a multi-centre study. *Orphanet J Rare Dis.* 9:8 (2014)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. EINLEITUNG 1

1.1. Klinisches Bild der Malignen Hyperthermie 1

1.2. Pathophysiologische Mechanismen 2

1.3. Genetik 4

1.3.1. Mutationen des Ryanodinrezeptor Typ 1 4

1.3.2. Mutationen des $Ca_V1.1$ 6

1.4. Diagnostisches Vorgehen 6

1.5. Triggersubstanzen 7

1.5.1. Volatile Anästhetika 7

1.5.2. Succinylcholin 8

1.5.3. Cresole 9

1.6. Ziele und Fragestellung 9

2. MATERIAL UND METHODEN 11

2.1. Multicenter-Evaluation 11

2.2. Clinical Grading Scale 12

2.3. In vitro Kontrakturtest 13

2.3.1. Material 13

2.3.2. Durchführung 14

2.3.3. Klassifizierung 15

2.4. Genetisches Screening 16

2.4.1. Extraktion genomischer DNA aus Blut 16

2.4.2. Bestimmung der DNA Konzentration 16

2.4.3. Polymerase Kettenreaktion 17

2.4.4. Agarose-Gelelektrophorese 17

2.4.5. Isolierung der DNA aus den Gelbanden 18

2.4.6. Sequenzierung 18

2.4.7. Auswertung des genetischen Screenings 18

2.5. Statistische Auswertung 19

INHALTSVERZEICHNIS

3. ERGEBNISSE 20

3.1. Multicenter-Evaluation 20

3.2. Auswertung klinischer Daten 22

3.2.1. Succinylcholin als Triggersubstanz 24

3.2.2. Volatile Anästhetika als Triggersubstanzen 25

3.3. Auswertung des in vitro Kontraktur Tests 26

3.4. Auswertung des genetischen Screenings 29

3.4.1. RYR1 Mutationen 29

3.4.2. CACNA1S Mutationen 35

4. DISKUSSION 36

4.1. Triggerpotential des Succinylcholins 36

4.2. Triggerpotential volatiler Anästhetika 37

4.3. Patientenseitige Risikofaktoren 38

4.3.1. Lebensalter und Geschlecht 38

4.3.2. RYR1 und CACNA1S Mutationen 39

4.4. Variabilität klinscher Ereignisse 40

5. ZUSAMMENFASSUNG 42

6. LITERATURVERZEICHNIS 44

DANKSAGUNG 54

LEBENSLAUF 55

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4-CmC	4-Chloro-m-Cresol
ATP	Adenosintriphosphat
CACNA1S	Gen, α1-Untereinheit des L-typ Ca^{2+}-Kanal $Ca_V1.1$ der Skeletmuskulatur
CCD	Central Core Disease
CK	Kreatinkinase
CGS	Clinical Grading Scale (für Maligne Hyperthermie)
$Ca_V1.1$	Dihydropyridin sensitiver L-typ Ca^{2+}-Kanal der Skeletmuskulatur (Protein)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	elektromechanische Kopplung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMHG	European Malignant Hyperthermia Group
HOKPP1	hypokaliämisch periodische Paralyse Typ 1
ID	Identifikationsnummer
MH	Maligne Hyperthermie
MHAUS	Malignant Hyperthermia Association of the United States
MHE	Malignant Hyperthermia Equivocal (mehrdeutig)
MHEc	Malignant Hyperthermia Equivocal (mehrdeutig, Koffein positiv)
MHEh	Malignant Hyperthermia Equivocal (mehrdeutig, Halothan positiv)
MHN	Malignant Hyperthermia negative
MHS	Malignant Hyperthermia susceptible (positiv)
MmD	Multi-minicore disease (Minicore myopathy)
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
PSS	Porcine Stress Syndrome
RyR1	Ryanodinrezeptor Typ 1, (Protein)
RYR1	Ryanodinrezeptor Typ 1 (Gen)
RyR3	Ryanodinrezeptor Typ 3 (Protein)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SCh	Succinylcholin, (Englisch auch: Suxamethonium)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T-Tubuli	transversale tubuläre System
Taq	Thermus aquaticus

TBE-Puffer	Laufpuffer aus Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Borsäure und EDTA
TTPP1	thyreotoxische hypokaliämische periodische Paralyse

1. Einleitung

1.1. Klinisches Bild der Malignen Hyperthermie

Die Maligne Hyperthermie (MH) ist eine autosomal dominant vererbte Stoffwechselstörung der Skelettmuskulatur, die mit einer geschätzten Inzidenz von 1:15000 bei Kindern und 1:300000 bei Erwachsenen auftritt (Jurkat-Rott et al. 2001). Durch verschiedene Triggersubstanzen kann es bei prädisponierten Personen zu einer Stoffwechselentgleisung kommen, die unbehandelt in 80 % der Fälle tödlich endet. Volatile Anästhetika und depolarisierende Muskelrelaxantien gelten als klassische Trigger, Ausnahmen sind Lachgas und Xenon (MacLennan et al. 1992, Baur et al. 2000 b). Die MH ist jedoch keine reine pharmakogenetische Erkrankung, sondern kann auch ohne Kontakt zu Triggersubstanzen schwere Stoffwechselkrisen auslösen (Gronert et al. 1980, Olthoff und Vonderlind 1997, Groom et al. 2011). Als nicht medikamentöse Risikofaktoren werden exzessive körperliche Anstrengung vor allem bei hohen Umgebungstemperaturen, großer Stress, sowie Infektionen mit Fieber diskutiert. Welche Individuen ein erhöhtes Risiko für eine solche MH-ähnliche Episode (MH-like-, awake episode) haben, ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch scheinen Personen mit zusätzlichen kongenitalen Myopathien ein erhöhtes Risiko zu besitzen (Lehmann-Horn et al. 2011). Die klinischen Symptome sind Masseterspasmus (Trismus), generalisierte Muskelrigidität und ein plötzlicher Temperaturanstieg (MacLennan et al. 1992). Durch die Muskelstoffwechselaktivierung und Rigidität der Atemmuskulatur resultiert eine deutliche gemischt metabolisch respiratorische Azidose, welche trotz starker Hyperventilation nicht kompensiert werden kann. Durch Erschöpfung der zellulären Energiereserven kommt es zu einer Rhabdomyolyse, die nicht lokal beschränkt ist und durch Kreatinkinasewerte (CK) von mehreren 10000 IE/l gekennzeichnet sind (Denborough et al. 1998). Die Folge ist häufig eine Oligourie mit dunkel gefärbtem Urin („cola colored“) bis hin zum akuten Nierenversagen aufgrund der durch die Rhabdomyolyse resultierenden Myoglobinfreisetzung (Melzer et al. 2001). Die Gefahr von Herzrhythmusstörungen, insbesondere ventrikulärer Tachykardien, ist ebenfalls erhöht, weil mit dem Muskelzerfall außerdem eine Kaliumerhöhung im Serum verbunden ist. Das Sauerstoffdefizit im Gewebe führt zur Klinik eines Schockgeschehens. Hierdurch kann es zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung kommen (Hopkins et al. 2000). Da der klinische Verlauf variabel ist, wird die Schwere einer MH-Krise in einem Punktesystem, der Clinical Grading

Scale (CGS), bewertet. So kann eingeschätzt werden, ob es sich bei dem beobachteten Symptomkomplex wirklich um eine MH-Krise handelt (Larach et al. 1994). Das spezifische Gegenmittel Dantrolen blockiert die Ca^{2+} Freisetzung in der Muskulatur und bremst den überschießenden Stoffwechsel, was sich klinisch meist durch einen raschen Rückgang der Symptomatik bemerkbar macht (Fruen et al. 1997, Zhao et al. 2001). Die MH ist nicht auf den Menschen als Spezies begrenzt: Bekanntestes Tiermodel ist das Porcine Stress Syndrom (PSS) der Landrasse-, Poland-China-, und Pietrain-Schweine (Hall et al. 1966, Hall et al. 1972). Homozygote PSS Schweine entwickeln bereits ohne Triggersubstanzen schwere Stoffwechselkrisen, wenn sie großem psychischen (Viehtransport, Flucht) oder physischem Stress ausgesetzt werden. Weitere Tiermodelle sind: Maus, Kaninchen, Pferd und Hund (Lehmann-Horn et al. 2011).

1.2. Pathophysiologische Mechanismen

Die Symptome einer akuten MH-Krise können durch eine gestörte Ca^{2+}-Homöostase der Skelettmuskulatur erklärt werden. Physiologisch führt eine Ca^{2+}-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), auch longitudinales System genannt, zu einer Aktivierung von Aktin-Myosin Querbrücken, indem das Ca^{2+} an Troponin bindet und so die Interaktion zwischen Aktin und Myosin im Sarkomer initiieren, was konsekutiv zur Muskelkontraktion führt (Loke et al. 1998, Melzer et al. 2001). Anschließend wird das zytosolische Ca^{2+} aktiv zurück in das SR gefördert. Diese beiden Prozesse benötigen Adenosintriphosphat (ATP), welches mit Hilfe der Atmungskette oder Glykolyse bereitgestellt wird.

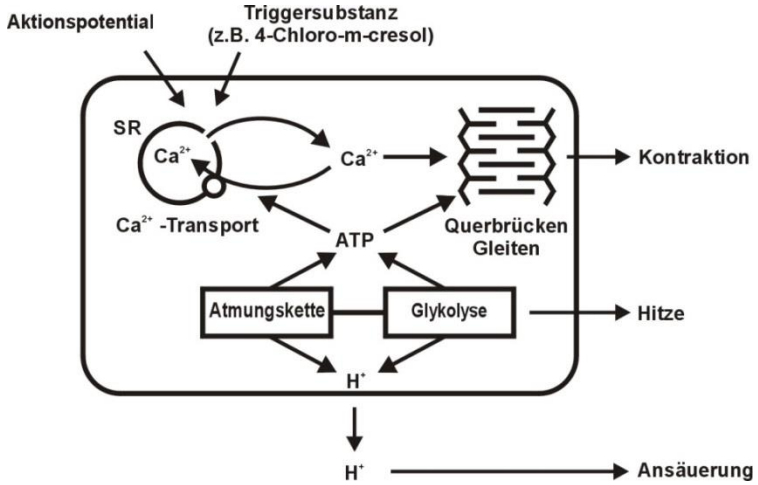


Abbildung 1: Ca^{2+}-Ausschüttung und Energiemetabolismus in der Skelettmuskelzelle.

Generalisierte Muskelsteifigkeit, Temperaturentwicklung und Azidose sind die Kardinalsympstome einer Malignen Hyperthermie Krise. ATP: Adenosintriphosphat. SR: Sarkoplasmatisches Retikulum

MH-Triggersubstanzen führen bei genetisch prädisponierten Personen zu einer übermäßig pathologischen Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR. Dies führt zum klinischen Symptom der Muskelrigidität und einem raschen Aufbrauchen des zellulären ATP. Die Hyperkapnie kann durch die bei der Atmungskette entstehende erhöhte CO_2-Produktion erklärt werden (Abbildung 1). Diese erhöhte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR ist der zentrale Pathomechanismus der MH. Als Grund hierfür kann in den meisten Fällen ein Defekt im Ryanodinrezeptor Typ 1 (RyR1) gefunden werden. Der RyR1 gilt zusammen mit dem Dihydropyridin sensitiven L-Typ Ca^{2+}-Kanal ($Ca_V1.1$) des transversalen tubulären Systems (T-Tubuli) als Schlüsselelement der elektromechanischen Kopplung (EC), der Umsetzung einer Muskelmembrandepolarisation in eine Muskelkontraktion. Bei der EC wird nach Aktivierung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) an der Neuromuskulären Endplatte die Muskelmembran depolarisiert. Das entstehende Aktionspotential wird durch die T-Tubuli, bestehend aus regelmäßigen Einstülpungen des Sarkolemmas, schnell in das Muskelinnere weitergeleitet. Die T-Tubuli besitzen eine hohe Dichte an spannungsabhängigen $Ca_V1.1$. Dieser Ca^{2+}-Kanal wird während eines Aktionspotentiales aktiviert (Mickelson et al. 1996) und liegt in enger Nachbarschaft zum RyR1, der in den terminalen Zisternen des SR lokalisiert ist (Fleischer et al. 1985, Herrmann-Frank et al. 1999). Die Signaltranskuktion zwischen jeweils vier aktivierten $Ca_V1.1$ und einem RyR1 erfolgt durch direkte Protein-Protein Interaktion (Meissner & Lu 1995, Proenza et al. 2002). Durch die Aktivierung des RyR1 werden vermehrt Ca^{2+}-Ionen aus dem SR freigesetzt, was konsekutiv zur Kontraktur des Muskels führt (Abbildung 2).

Die Gruppe der volatilen Anästhetika induzieren eine RyR1-vermittelte Ca^{2+}-Freisetzung, welche je nach Substanz unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Klingler et al. 2005 a, Klingler et al. 2005 b). Bei MH-Prädisponierten Personen kann dies zu einer akuten MH-Krise führen. Succinylcholin (SCh) hingegen, welches ebenfalls als klassischer Trigger der MH gilt, setzt pharmakologisch jedoch am nAChR an (Abbildung 2). Eine direkte Beeinflussung des RyR1 durch SCh ist unwahrscheinlich, da das vergleichsweise große und polare Molekühl nur schwer durch die Muskelmembran diffundieren kann und SCh keine agonistische Wirkung am RyR1 zeigt (Klingler et al. 2005 a).

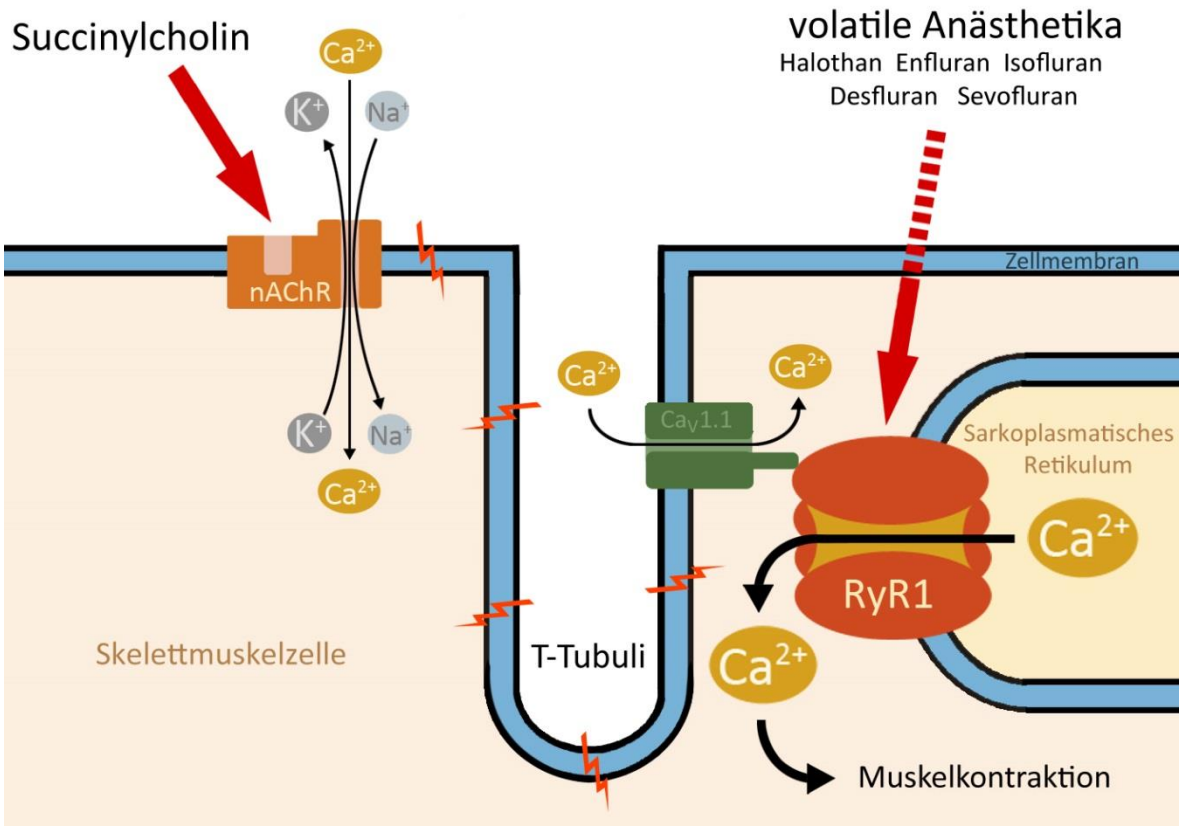


Abbildung 2: Darstellung der elektromechanischen Kopplung im Skelettmuskel.
Nach Aktivierung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) durch Acetylcholin oder Succinylcholin kommt es zur Depolarisation der Zellmembran. Hierdurch werden im transversalen tubulären System (T-Tubuli) gelegene spannungssensitive L-Typ Ca^{2+}-Kanäle ($Ca_V1.1$) aktiviert, wodurch es zu einer physikalischen Interaktion mit dem Ryanodinrezeptor Typ 1 (RyR1) kommt. Die Ca^{2+}-Ausschüttung bzw. Wiederaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum (SR) steuert die Kontraktionskraft der Muskelzelle. Volatile Anästhetika aktivieren den RyR1, das Gegenmittel Dantrolen blockiert diesen spezifisch.

1.3. Genetik

1.3.1. Mutationen des Ryanodinrezeptor Typ 1

Der aus 5038 Aminosäuren (ca. 560 kDa) bestehende RyR1 hat vier transmembranäre Segmente, die den Ionenkanal im SR verankern. Für die MH sind von den drei bekannten Isoformen des RyR ausschließlich Defekte im RyR1 von Bedeutung, dieser wird hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert. Während einer MH-Krise wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des RyR1 durch Triggersubstanzen, Stress oder hohen Umgebungstemperaturen erhöht, so dass es zu einer unphysiologisch hohen Ca^{2+}-Freisetzung kommt. In der Mehrheit der betroffenen Familien findet man einfache Veränderungen in der Amiosäuresequenz des RyR1. Dieser wird durch ein Gen auf Chromosom 19q 12-13.2 kodiert (MacLennan et al. 1990, McCarthy et al. 1990). Aufgrund der Größe des Gens, das den RyR1 durch 106 Exons kodiert und der Vielzahl der Punktmutationen ist die Suche nach

bekannten und neuen defekten Genorten sehr aufwendig. Es konnte für insgesamt 31 der über 300 bisher veröffentlichten RYR1 Punktmutationen der Kausalzusammenhang für die Prädisposition zur MH nachgewiesen werden. Zwar sind die meisten anderen Mutationen ebenfalls mit der MH assoziiert, jedoch steht der wissenschaftliche Nachweis, der zur eindeutigen Diagnose führen würde, bislang aus. Nach Kriterien der European Malignant Hyperthermia Group (EMHG) muss für die Klassifizierung als kausale Mutation sowohl eine genetische als auch eine funktionelle Charakterisierung vorliegen (Urwyler et al. 2001).

Die bislang bekannten RyR1 Mutationen sind nicht nicht gleichmäßig auf dem Gen verteilt, sondern am häufigsten in drei sogenannten „Hot spots“ zu finden: die MH/CCD Region 1 liegt zwischen den Aminosäuren 35-614, die MH/CCD Region 2 zwischen den Aminosäuren 2163-2458. Die MH/CCD Region 3 liegt am C-Terminalen Ende des Proteins (der luminalen/transmembranen Region), wobei die Anzahl der eingeschlossenen Aminosäuren-Positionen unterschiedlich angegeben ist: Avila et al. 2003 (Aminosäuren 4136–4973), Tammaro et al. 2003 (Aminosäuren 4668 – 4906), Rüffert 2006 (Aminosäuren 4851-4973), Diese Studie (Aminosäuren 4664-5020). Die Grenzen resultieren aus dem jeweiligen Patientengut sowie aus dem aktuellen Wissensstand zur Verteilung und Häufigkeit von Mutationen. Während die Mutationen der MH/CCD Regionen 1 und 2 vor allem mit der MH assoziiert sind, konnten in der MH/CCD Region 3 vermehrt bei Central Core Disease (CCD) Patienten Mutationen gefunden werden (Avila et al. 2003, Rüffert 2006).

Insgesamt führen fünf der bekannten RyR1 Mutationen zu einem STOP-Codon, also zum Abbruch der Aminosäurenkette: p.R819X (Monnier et al. 2008); p.S1778X, p.E4494X (Clarke et al. 2010); p.R2241X (Zhou et al. 2010); p.R4945X (unveröffentlichte Variante, K. Jurkat-Rott, Universität Ulm). Es ist sehr fraglich, ob diese Stopp-Mutationen von Bedeutung sind; normalerweise wird bei einer Nonsense-Mutation das andere Allel überexprimiert, wenn überhaupt ist eher eine Unterfunktion zu erwarten und nicht, wie bei MH-Anlage, eine Überempfindlichkeit des Kanals.

Der Aminosäurenaustausch p.F4808N im Exon 100 entsteht durch zwei direkt aufeinanderfolgenden Punktmutationen c.14422T>A und c.14423T>A (Kraeva et al. 2011).

1.3.2. Mutationen des $Ca_v1.1$

Weiterhin sind Mutationen des CACNA1S-Gen mit der MH assoziiert. Das Gen CACNA1S (Synonym: CACNL1A3) ist auf Chromosom 1q32.1 lokalisiert und kodiert für die α1-Untereinheit des spannungssensitiven L-Typ Ca^{2+}-Kanals $Ca_V1.1$ (auch als *Dihydropyridin-rezeptor* bezeichnet). Einige Defekte dieses Gens sind mit der hypokaliämisch periodischen Paralyse Typ 1 (HOKPP1) assoziiert (Jurkat-Rott et al. 1994, Ptácek et al. 1994, Matthews et al. 2009, Li et al. 2012), andere mit der thyreotoxischen hypokaliämischen periodischen Paralyse (TTPP1) (Kung et al. 2004). In wenigen MH-Familien konnten Mutationen nachgewiesen werden, die mit der Prädisposition zur MH einhergehen (Monnier et al. 1997, Carpenter et al. 2009, Toppin et al. 2010).

1.4. Diagnostisches Vorgehen

Bei einer Verdachtskrise wird neben den akuten medizinischen Maßnahmen auch eine aussagekräftige Diagnosesicherung angestrebt. In Europa wird dies durch die European EMHG geregelt, in Nordamerika durch die Malignant Hyperthermia Association of the United States (MHAUS). Bei klinischem Verdacht werden die Patienten in das jeweils nächstliegende akkreditierte Testzentrum überwiesen. Zunächst wird ein vorläufiger Notfallausweis mit einer Warnung vor volatilen Anästhetika und SCh ausgestellt. In der Regel erfolgt die Diagnose durch eine Biopsie mit anschließenden In vitro Kontraktur Test (IVCT), hierbei wird das Ausmaß einer Muskelkontraktur als indirekter Marker für die myoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration verwendet. Die bei dem Test verwendeten Triggersubstanzen sind Koffein und Halothan sowie optional 4-Chloro-m-Cresol (4-CmC), wodurch die Anzahl der eindeutigen Diagnosen erhöht werden kann (Ørding et al. 1997 a, Baur et al. 2000). Ist das Ergebnis des IVCT positiv (Malignant Hyperthermia susceptible; MHS) oder mehrdeutig (Malignant Hyperthermia Equivocal; MHE) so wird dem Patienten ein endgültiger Notfallausweis ausgestellt. Beim Nachweis einer Mutation im RYR1, die von der EMHG als ursächlich klassifiziert wurde, kann auf die Durchführung des IVCT verzichtet werden und es wird ebenfalls ein endgültiger Notfallausweis ausgestellt. Ist die Veranlagung bei einem Individuum nachgewiesen kann die Familie des betroffenen ebenfalls getestet werden. Wenn in einer MH-Familie eine kausale RyR1 Mutation gefunden wurde, so sind alle Familienmitglieder, die diese Mutation tragen, als Maligne Hyperthermie positiv (MHS) zu betrachten, die übrigen können nur durch eine Biopsie mit nachfolgendem

IVCT Diagnosesicherheit erlangen (Urwyler et al. 2001). Die Ergebnisse (sowohl des IVCT als auch der genetische Analyse) werden dokumentiert und archiviert.

1.5. Triggersubstanzen

1.5.1. Volatile Anästhetika

Die volatilen Inhalationsanästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran gelten als klassische Triggersubstanzen einer MH-Episode (Ellis et al. 1971, Shulman et al. 1981, Wedel et al. 1993, Wappler 2001, Steinfath et al. 2002).

Um die Triggerpotenz der einzelnen volatilen Anästhetika quantitativ und differenziert zu betrachten wurde eine Reihe von in vitro- und in vivo Versuchen durchgeführt: Im IVCT des Sartoriusmuskels des Frosches waren hierbei Koffeinkontrakturen nach Zugabe von Halothan etwa 3 mal stärker als durch Enfluranzugabe und 4 mal stärker als durch Isofluranzugabe (Reed und Strobel 1978). In einem ähnlichen Experiment mit menschlichen Muskelbündeln aus MHS Individuen konnte Halothan größere Kontrakturen auslösen als Isofluran welches selbst wiederum einen größeren Effekt hatte als Enfluran (Britt et al. 1980).

In MHS Pietrainschweinen wurde die Zeit gemessen, die nötig war um bei einer minimalen alveolären Konzentration (MAC) mit den jeweiligen Narkosegasen einen pCO_2 von 70 mmHg zu erzeugen. Hierbei benötigte Halothane die kürzeste, Isofluran die mittlere und Desfluran die längste Zeit (Wedel et al. 1993). Sevofluran induzierte im Vergleich zu Isofluran und Halothan eine niedrigere Ca^{2+}-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Matsui et al. 1991), sowie eine signifikant reduzierte isometrische Kraftentwicklung (Kunst et al. 1999). Ein Rückschluss auf die tatsächliche klinische Triggerpotenz beim Menschen ist jedoch unzulässig. Zur klinischen Evaluation kann das Intervall zwischen Narkoseeinleitung und Entwicklung der klinischen Symptome als Marker für den Schweregrad der MH-Reaktion dienen (Carpenter et al. 2009). Betrachtet man dies als Surrogatmarker für die relative Potenz der volatilen Anästhetika MH-Krisen auszulösen, so ergibt sich folgende Rangliste: Halothan, Isofluran > Enfluran > Sevofluran (Hopkins 2011). Bedient man sich jedoch der Clinical Grading Scale (CGS) (Larach et al. 1994, siehe Kapitel 2.2) und vergleicht die Schwere der Ausprägung der einzelnen Prozesse zeigen Isofluran und Sevofluran keinen relevanten Unterschied (Migita et al. 2011). Halothan ist in der CGS stärker als Isofluran (Allen et al. 1998).

Tabelle 1: Triggerpotenzen volatiler Anästhetika nach unterschiedlichen Methoden

Die Anzahl der Probanden bezieht sich auf den Halothan-, Enfluran- und Isofluranteil des Experiments.

Methode / Indikator	Spezies	Probanden	Rangliste der Triggerpotenz	Referenz
IVCT, Kontrakturmessung	Leopardfrosch	42	Halothan > Enfluran > Isofluran	Reed & Strobel 1978
IVCT, Kontrakturmessung	Mensch	40	Halothan > Isofluran > Enfluran	Britt et al. 1980
Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR	Meerschweinchen	?	Halothan > Isofluran > Enfluran > Sevofluran	Matsui et al. 1991
Zeit bis pCO_2 = 70 mmHg	Pietrainschwein	12	Halothan > Isofluran > Desfluran	Wedel et al. 1993
Zeit bis Symtome	Mensch	365	Halothan = Desfluran > Isofluran	Allen et al. 1998
isometrische Kraftmessung	BALB/c Maus	24	Halothan > Isofluran > Sevofluran	Kunst et al. 1999
Zeit bis Symptome	Mensch	75	Halothan = Isofluran > Enfluran > Sevofluran	Hopkins 2011
Clinical Grading Scale	Mensch	147	Sevofluran = Isofluran	Migita et al. 2011

Die Datenlage der relativen Triggerpotenzen von Enfluran, Isofluran, Desfluran und Sevofluran ist inkonsistent (Tabelle 1). Sicher ist, dass alle volatilen Inhalationsanästhetika das Vollbild einer MH-Krise auslösen können und daher bei Individuen mit Prädisposition zur MH absolut kontraindiziert sind.

1.5.2. Succinylcholin

Succhinylcholin (SCh), im englischsprachigen Raum oft als Suxamethonium bezeichnet, ist ein depolarisierendes Muskelrelaxans. Biologisch wirksam bindet es an den nAChR der motorischen Endplatte und löst zunächst durch Depolarisation initial eine Erregung der Muskelfaser aus. Dies äußert sich durch kurz auftretende Muskelzuckungen. Da SCh nicht durch die spezifische Acetylcholinesterase abgebaut werden kann, kommt es zur Dauerdepolarisation, welche jedoch nicht zu einer Dauerkontraktur des Muskels sondern durch Inaktivierung des skelettmuskulären schnellen Natriumsystems (Na_V 1.4) zu einer vollständigen Erschlaffung der Skelettmuskulatur führt. Hierbei strömen vermehrt Kaliumionen aus den Zellen, so dass es zu einem leichten Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration kommt, der zu Herzrhythmusstörungen, Kammerflimmern oder gar zur Asystolie führen kann. Gefährdet sind hier vor allem niereninsuffiziente Patienten mit erhöhtem Serumkalium, sowie Verbrennungsopfer und Patienten mit Innervationsstörungen der Muskulatur wie z.B. Querschnittsverletzungen, Myopathien oder andere Zustände, die dazu führen, dass die Acetylcholinrezeptordichte und Sensitivität auf der Muskulatur erhöht ist und auch extrajunktional exprimiert wird. Daher gilt SCh bei allen Erkrankungen mit hypersensitiven Muskelfasern als kontraindiziert (Klingler et al. 2005 b).

SCh wird klinisch zur Intubation erwachsener Patienten bei Operationen in Allgemeinanästhesie oder zur sogenannten Ileuseinleitung (auch Blitzintubation; rapid sequence induc-

tion) angewendet. Die Verwendung von SCh ist bei Kindern zwar zurückgegangen (Klingler et al. 2005 b), insgesamt wird es jedoch im klinischen Alltag trotz der Risiken sowohl in Europa als auch in Nordamerika weiterhin häufig verwendet (Karanović et al. 2011).

SCh gilt seit der Erstbeschreibung der MH durch Denborough et al. 1962 und frühen Fallberichten (Gullo et al. 1979) als klassischer Trigger der MH (Allman u. Wilson 2011). Im Unterschied zu den volatilen Anästhetika besitzt SCh jedoch keine agonistische Wirkung am RyR1 und führt somit zu keiner direkten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR (Klingler et al. 2005 a, siehe Abbildung 2). Somit ist der pathophysiologische Mechanismus mit dem SCh eine MH-Krise triggert unklar. Durch seine Wirkung am nAChR, der als unspezifischer Kationenkanal die Membrandepolarisation initiiert, könnte entweder der Influx von extrazellulärem Ca^{2+} oder Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung zur MH führen (Hopkins 2011).

1.5.3. Cresole

Das Methyl-Derivat 4-CmC wird als Konservierungsmittel in Insulin-, Heparin- und anderen Medikamenten eingesetzt (Wappler et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass 4-CmC ein potenter Aktivator der Ryanodin-mediierten Ca^{2+}-Auschüttung ist und dabei eine 15 mal höhere Affinität zum RyR1 als Koffein besitzt (Herrmann-Frank 1996, Baur et al. 2000). Die Gabe von 4-CmC führt bei humanen MHS-Muskelpräparaten zu pathologischen Kontrakturen (Wappler et al. 1997, Anetseder et al. 2000) und wurde von der EMHG als optionaler diagnostischer Test akkreditiert. Einflüsse auf andere Mechanismen zur Regulation des Ca^{2+}-Metabolismus konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Zorzato et al. 1993). Ab einer Dosis von 12-24 mg/kg Körpergewicht löst 4-CmC eine MH-Krise im Tierversuch aus (Wappler et al. 1999). Diese Dosis ist etwa 150 mal höher als in den meisten klinischen Heparin- und Insulinpräparaten benutzt wurde. Allerdings ist die SCh Dosierung mit 1,5 mg/kg Körpergewicht deutlich höher, so dass auch die damit verbundene 4-CmC Konzentration im Präparat entsprechend höher war.

Seit Mitte der 80er Jahre sind SCh Präparate (wie auch die meisten anderen Muskelrelaxantien) konservierungsmittelfrei. Wie hoch die tatsächliche Triggerpotenz heute verwendeter 4-CmC-freier SCh-Präparate ist, wurde ebenfalls nie klinisch evaluiert.

1.6. Ziele und Fragestellung

Die MH ist als potentiell letale Narkosekomplikation eine pharmakogenetische Störung der Ca^{2+}-Freisetzung der Skeletmuskulatur. In der Mehrzahl der Fälle findet man Mutatio-

nen im RyR1. Während einer akuten MH-Krise kommt es RyR1-vermittelt zu einer unkontrollierten Ca^{2+}-Ausschüttung aus den SR der Skelettmuskelzellen. Als klassische Triggersubstanzen zählen volatile Anästhetika und SCh. Die Tatsache das SCh eine Triggersubstanz für MH darstellt, stützt sich in erster Linie auf die Erstbeschreibung (Denborough et al. 1962) und frühe Fallberichte (Gullo et al. 1979). Allerdings ist sowohl die experimentelle als auch die klinische Datenlage, dass es sich bei SCh tatsächlich um einen MH-Trigger handelt, inkonsistent: In vitro Untersuchungen zeigen, dass SCh im Gegensatz zu den volatilen Anästhetika kein RyR1-Agonist ist (Klingler et al. 2005 a), und bioptisch gesicherte Fallberichte, in denen SCh in Abwesenheit anderer Triggersubstanzen das Vollbild einer klinischen MH-Krise auslösen konnte, existieren bislang nicht. Hinzu kommt, dass seit Mitte der 80er Jahre bei der pharmazeutischen Zubereitung von SCh-Präparaten kein 4-CmC mehr verwendet wird, welches selbst ein starker MH Trigger ist, und hierdurch die Triggerpotenz des klinisch eingesetzten SCh-Präparates möglicherweise deutlich abgeschwächt werden konnte. Da SCh weiterhin häufig im klinischen Alltag verwendet wird, ist es von enormer Bedeutung den Zusammenhang zur MH weiter aufzuklären. Ziel der Studie ist es, die relative Triggerpotenz volatiler Anästhetika und SChs sowie patientenseitige Risikofaktoren (RYR1-, CACNA1S Mutationen, Alter und Geschlecht) zu evaluieren.

2. Material und Methoden

2.1. Multicenter-Evaluation

Die Studie wurde 2010 während des 28. Treffen der EMHG vorgestellt, woraufhin sich die Europäischen MH-Testzentren Basel, Leipzig, Neapel, Padua, Ulm und Würzburg bereit erklärten teilzunehmen: Im darauffolgenden Meeting (2011) erklärte Nijmegen ebenfalls seine Teilnahme. Es wurde ein Datenerfassungsbogen mit Anweisungen für die Datensammlung sowie eine Microsoft EXCEL® Vorlage ausgehändigt. Die einzelnen MH-Testzentren trugen die Datensätze der Patienten in anonymisierter Form ein, und sendeten die Excel-Datei zurück. In die Studie wurden diejenigen Patienten eingeschlossen, deren klinischer MH-Verdacht durch einen positiven (MHS) oder mehrdeutigen (MHEh, MHEc) IVCT bestätigt wurde. Hierbei wurde für jeden Patienten der folgende Datensatz eingefordert:

- Alter (während der MH-Episode)
- Körpergröße in cm (während der MH-Episode)
- Gewicht in kg (während der MH-Episode)
- Geschlecht
- Jahr der MH-Episode
- Punktwert der CGS
- Verwendetes Narkosegas und Dosierung während der MH-Episode
- Verwendung von SCh und Dosierung während der MH-Episode
- MH-Diagnose (MHS, MHEh, MHEc)
- Kontraktur bei 2 mmol/l Koffein
- Kontraktur bei 0,22 mmol/l (2 vol%) Halothan
- Halothanschwelle (minimale Konzentration, die eine Kontraktur ≥ 2,0 mN auslöst)
- Koffeinschwelle (minimale Konzentration, die eine Kontraktur ≥ 2,0 mN auslöst)
- Neuromuskuläre Begleiterkrankung (falls bekannt)
- Ergebnisse der genetischen Sequenzierung des CACNA1S und des RyR1

Der IVCT wurde im Rahmen der Diagnosesicherung der MH durchgeführt. Die Daten wurden in anonymisierter Form ausgewertet. Aus allen bis August 2011 eingegangenen Datensätzen wurde eine Multicenter-Datenbank (Microsoft EXCEL® 2010) erstellt. Die Vollständigkeit der Hauptdatensätze (MH-Status, Ergebnisse des IVCT, CGS und

verwendete Triggersubstanzen) wurde für den Einschluss vorausgesetzt. Alle MH-Testzentren waren mit der gemeinsamen Auswertung der Daten und Veröffentlichung der Ergebnisse einverstanden.

2.2. Clinical Grading Scale

Um die Wahrscheinlichkeit der klinischen MH-Episoden vergleichen zu können, wurde die Punktzahl der Clinical Grading Scale (CGS) nach Larach et al. 1994 berechnet. Bei der Berechnung der CGS werden sechs Prozesse unterschieden: I. Muskelrigidität, II. Rhabdomyolyse, III. respiratorische Azidose, IV. Temperaturanstieg, V. kardiale Manifestationen, und VI. Familiengeschichte. Jedem Prozess sind zwei bis sechs sogenannter Indikatoren zugeordnet, die jeweils maximal 15 Punkte erreichen können: (Tabelle 2). Es wird jeweils der Indikator mit der höchsten Punktzahl eines Prozesses ausgewählt. Die Indikatoren der Familiengeschichte *(kursiv)* können häufig im akuten Fall aus praktikablen Gründen nicht erhoben werden. Hinzu kommt die Kategorie „Weitere Indikatoren“, in welcher die Punktzahlen der Indikatoren addiert werden, so dass in dieser Kategorie mehr als 15 Punkte erreicht werden können. Die Punkteergebnisse der Prozesse I - VI werden anschließend zur Punktzahl der „Weiteren Indikatoren“ addiert. Den daraus resultierenden Punkteergebnissen sind MH-Ränge zugeordnet, mit dessen Hilfe sich die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer malignen Hyperthermie einschätzen lässt (Tabelle 3).

Grundvoraussetzung für den Studieneinschluss war die genaue klinische Dokumentation des jeweiligen Falles, so dass die Berechnung des CGS möglich und sinnvoll war. Das Punkteergebnis der CGS und der daraus resultierende MH-Rang wurden für jeden Patienten in die Datenbank der Multicenter-Studie eingetragen.

Tabelle 2: Die Clinical Grading Scale für Maligne Hyperthermie (übersetzt aus Larach et al. 1994)

Prozess	Indikator	Punkte
Prozess I: Rigidität	generalisierte Muskelrigidität (in Abwesenheit von Muskelzittern bei Hyperthermie; oder während oder unmittelbar einem Notfall durch Inhalationsnarkotika folgend)	15
	Masseterspasmus kurz nach Succinylcholingabe	15
Prozess II: Rhabdomyolyse	erhöhte CK > 20.000 IU nach Anästhesie mit Succinylcholingabe	15
	erhöhte CK > 10.000 IU nach Anästhesie ohne Succinylcholin	15
	Coca-Cola-farbene Verfärbung des Urins in der perioperativen Phase	10
	Myoglobin im Urin > 60 µg/l	5
	Myoglobin im Serum > 170 µg/l	5
	Kalium im Blut/Plasma/Serum > 6,0 mmol/l (in Abwesenheit von Niereninsuffizienz)	3
Prozess III: respiratorische Azidose	pET_{CO_2} > 55 mmHg unter Normoventilation	15
	arterieller pa_{CO_2} > 60 mmHg unter Normoventilation	15
	pET_{CO_2} > 60 mmHg unter Spontanventilation	15
	arterieller pa_{CO_2} > 65 mmHg unter Spontanventilation	15
	unklare Hyperkapnie (Einschätzung des Anästhesisten)	15
	unangemessene Tachypnoe	10
Prozess IV: Temperaturanstieg	unverhältnismäßig schneller Temperaturanstieg (Einschätzung des Anästhesisten)	15
	inadäquat erhöhte perioperative Temperatur > 38,8 °C (Einschätzung des Anästhesisten)	10
Prozess V: kardiale Manifestationen	inadäquate Sinustachykardie	3
	ventrikuläre Tachykardie oder Kammerflimmern	3
Prozess VI: Familiengeschichte	*MH-Familiengeschichte bei Verwandten ersten Grades*	15
	MH-Familiengeschichte bei Verwandten sonstigen Grades	5
Weitere Indikatoren	arterieller Base Excess negativer als –8 mmol/l	10
	arterieller pH-Wert < 7.25	10
	rasche Besserung von metabolischer oder respiratorischer Azidose nach Dantrolen i.v.	5
	MH-Familiengeschichte positiv zusammen mit einem weiteren Indikator aus der Eigenanamnese des Patienten im Bezug auf Narkosen (Ausnahme: erhöhte CK-Werte in Ruhe)	10
	CK-Werte in Ruhe erhöht (bei Patienten mit positiver Familiengeschichte für MH)	10

Tabelle 3: MH-Ränge der Clinical Grading Scale für maligne Hyperthermie (übersetzt aus Larach et al. 1994)

Punkteergebnis	Rang	MH-Wahrscheinlichkeit
0	1	fast ausgeschlossen
3-9	2	unwahrscheinlich
10-19	3	eher unwahrscheinlich
20-34	4	eher wahrscheinlich
35-49	5	sehr wahrscheinlich
50 +	6	fast sicher

2.3. In vitro Kontrakturtest

2.3.1. Material

Für die Durchführung des IVCT wurden folgende Materialien verwendet:

Muskelbündel aus dem Musculus vastus lateralis der Patienten (15-25 mm Länge, 2-3 mm Dicke, 100-200 mg Gewicht), Koffein (Merck, Darmstadt), Halothan (Zeneca, Plankstadt),

4-CmC (Fluka, Neu-Ulm), 2 % SCh (Curamed Pharma, Karlsruhe), Krebs-Ringer Lösung (118 mmol/l NaCl; 3,4 mmol/l KCl; 0,8 mmol/l $MgSO_4$; 1,2 mmol/l KH_2PO_4; 11,1 mmol/l Glukose; 25 mmol/l $NaHCO_3$; 2,5 mmol/l $CaCl_2$; pH = 7,40) (Apotheke der Universität Ulm), Organbad mit Kraftmessanlage (Steigerwald, Würzburg), Kraftumwandler (RS Biomed Tech, Sinzig), Vapor 19.3 (Dräger, Lübeck), Spektroskop (Dräger, Lübeck).

2.3.2. Durchführung

Der IVCT wurde frühestens drei Monate nach der MH-Episode gemäß dem Protokoll der EMHG durchgeführt (Ørding et al. 1997 b). Hierfür wurden den Patienten zunächst in Regionalanästhesie aus dem Musculus vastus lateralis schmale Muskelbündel entnommen, auf 150 % ihrer ursprünglichen Länge gedehnt und elektrisch bei einer Frequenz von 0,2 Hz mit einem supramaximaler Impuls von 1 ms Dauer stimuliert. Die dabei entstehende biomechanische Kraftentwicklung der Muskelbündel wurde mit einem Kraftumwandler digitalisiert und mit einer speziell geschriebenen Software aufgezeichnet (Steigerwald, Würzburg).

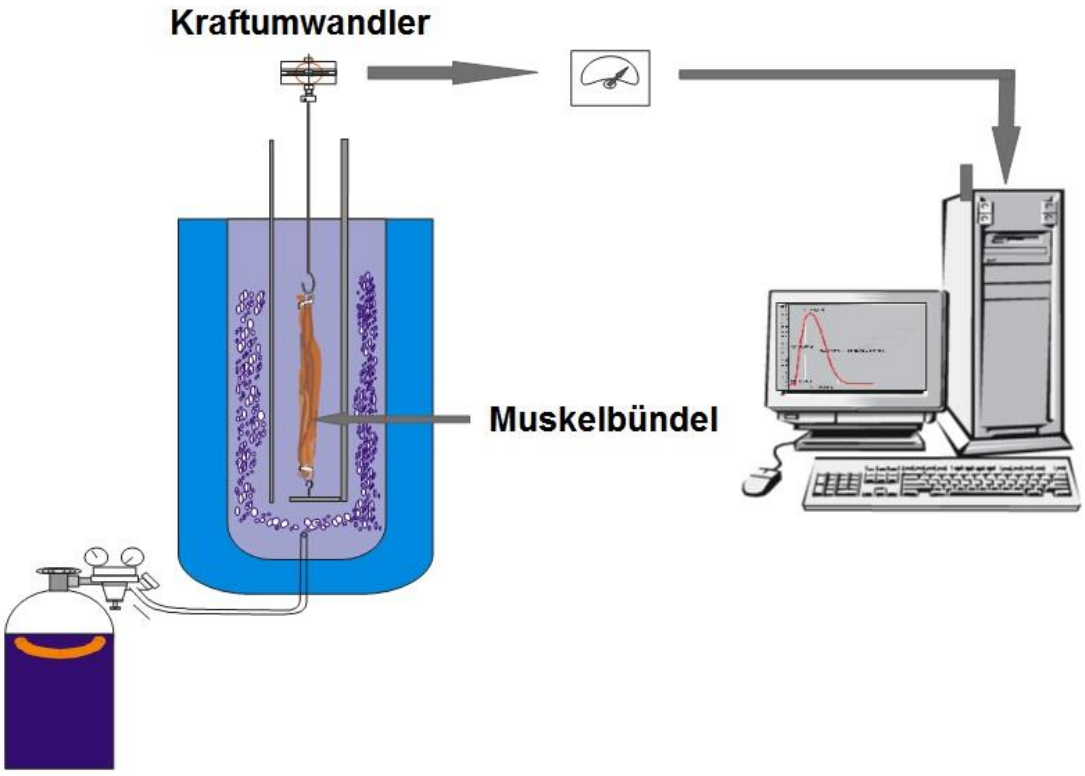


Abbildung 3: Der schematischer Versuchsaufbau des in vitro Kontraktur Tests (IVCT).
Die vitalen Muselbündel werden im Organbad in einen Kraftmesser eingespannt und in einer Frequenz von 0,2 Hz stimmuliert. Die enstehende Kontraktur wird mit einem Kraftumwandler in ein digitales Signal umgewandelt und an einen Computer gesendet, in dem die Ausgabe ausgewertet wird.

Sobald sich für mindestens 10 min ein stabiler Grundtonus mit Kraftschwankungen von kleiner als 2 mN in einstellte, wurden die Testagenzien in steigenden Konzentrationen in das Gewebebad hinzugegeben:

Halothan [mmol/l]: 0,11; 0,22; 0,44; 0,66; (dies enstpricht vol%: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0)

Koffein [mmol/l]: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 32

4-CmC [µmol/l]: 25; 50; 75; 100; 150; 200

Hierbei wurden pro Substanz jeweils zwei Muskelbündel verwendet. Bei der Testreihe für Halothan wurden die steigenden Gaskonzentrationen in Intervallen von 3 min unter einem kontinuierlichen Carboxygen Fluß von 100 ml/min hinzugegeben und mittels Infrarot Spektroskopie registriert. In den Testreihen für Koffein und 4-CmC wurden die Substanzen kumulativ aus einer vorbereiteten 37 °C warmen Stammlösung hinzugefügt. Als Qualitätskontrolle wurden die Endkonzentrationen der Testagenzien im Organbad mit einem Gaschromatographen (bei Halothan), beziehungsweise mit einem UV-Spektroskop (bei Koffein und 4-CmC), überprüft, sowie die Vitalität der Muskelbündel überprüft, indem diejenigen Muskelbündel aus der Beurteilung ausgeschlossen wurden, deren Kraftentwicklung nach elektrischer Stimulation weniger als 10 mN war oder am Ende des Experiments weniger als 50 mN Kraftentwicklung bei einer Konzentration von 32 mmol/l Koffein zeigten.

2.3.3. Klassifizierung

Für die Klassifizierung wurde der Versuch mit Koffein und Halothan an mindestens je zwei Muskelbündeln durchgeführt. Diese Anzahl konnte häufig auch für 4-CmC erreicht werden. Diejenige Konzentration eines Testagenz, welche eine Kontraktur mit einer Kraftentwicklung von ≥ 2 mN hervorrief, wurde als Schwellenkonzentration bezeichnet. Gemessen wurde hierbei die Kraftentwicklung, die über den Grundtonus hinausging. Falls die Kraftentwicklung nach Beginn der Agenzzugabe zwischenzeitlich unter den Grundtonus sank, und später wieder anstieg, so wurde die Kraftentwicklung vom tiefsten Punkt aus gemessen. Es wurde jeweils das Muskelbündel mit der größeren Sensitivität (dem niedrigeren Schwellenwert) zur Klassifikation herangezogen, bei gleichem Schwellenwert das Muskelbündel mit der größeren Kontraktur. Definitionsgemäß ergeben sich für die getesteten Patienten 4 Klassifikationen:

MHS: Eine Koffeinschwellenkonzentration von $\leq 2{,}0$ mmol/l **und** eine Halothan-Schwelle von $\leq 0{,}44$ mmol/l. Alternativ auch eine 4-CmC-Schwelle von ≤ 75 µmol/l.

MHN (Malignant Hyperthermia negative): Eine Koffeinswellenkonzentration von $> 2{,}0$ mmol/l **und** eine Halothan-Schwelle von $> 0{,}44$ mmol/l. Alternativ auch eine 4-CmC-Schwelle von > 75 µmol/l.

Patienten, die nur auf eines der beiden Testagenzien positiv reagieren, werden im Allgemeinen als **MHE** klassifiziert: reagieren sie nur auf Koffein positiv, so werden sie als **MHE_C**, bei alleiniger Reaktion auf Halothan als **MHE_H** gekennzeichnet. Klinisch werden aus Sicherheitsgründen alle MHE Patienten als MHS betrachtet. Etwa 10-15 % aller getesteten Patienten werden in diese Kategorie eingeordnet (Ørding et al. 1997 b).

2.4. Genetisches Screening

Für das genetische Screening der Gene RYR1 und CACNA1S wurden den Patienten Blutproben entnommen. Das Blut wurde von den verschiedenen zuweisenden Kliniken oder Hausärzten an das jeweilige Testzentrum gesendet. Jedem Patienten wurde eine fortlaufende Identifikationsnummer (ID) zugewiesen und jede Familie bekam eine Familien-ID. Je nach Testzentrum variierte hierbei die technische Umsetzung der Sequenzierung, es folgt die Beschreibung der technischen Umsetzung des Testzentrums Ulm (F): Die Gene RYR1 und CACNA1S wurden aus genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend sequenziert.

2.4.1. Extraktion genomischer DNA aus Blut

Die Extraktion genomischer DNA wurde mit Hilfe des „QIAamp® DNA Blood Maxi“ Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde jeweils 3-5 ml Blutproben der Patienten zunächst lysiert und dann in spezielle Säulen (QIAamp spin columns) gegeben. Bei der anschließend durchgeführten Zentrifugation wurde die in den Proben enthaltene DNA an eine spezielle Kieselgel-Membran (QIAamp membrane) immobilisiert. Proteine und andere Probenbestandteile, die die PCR stören könnten, wurden nicht an die Membran immobilisiert und in zwei Schritten mit speziellen Pufferlösungen gewaschen (Buffer AW1, Buffer AW2). Die DNA wurde in einem nächsten Schritt aus der Membran eluiert.

2.4.2. Bestimmung der DNA Konzentration

Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch anhand der Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt, die Verunreinigung durch Proteine anhand der Lich-

tabsorption bei 280 nm Wellenlänge. Das Verhältniss A_{260} zu A_{280} gibt die Reinheit der DNA-Probe wieder und lag bei 1,7-1,9. Die Konzentration der DNA wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$c[\mu g / ml] = \frac{A260 \times Verdünnungsfaktor}{\frac{1}{50}}$$

2.4.3. Polymerase Kettenreaktion

Material:

- 10 x *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase Puffer
- Taq-Polymerase (250 units)
- Desoxyribonucleosidtriphosphate: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Primer: Vor- und Rückwärts
- Template (zuvor isolierte DNA)
- aqua bidest

Durchführung:

Die PCR wurde als Methode verwendet um definierte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. 50 ng genomische DNA wurde hierbei mit dem Mastermix (aqua bidest, 10 x Taq-Polymerase Puffer, Desoxyribonucleosidtriphosphate, Vor- und Rückwärtsprimer, Taq-Polymerase) in PCR-Reaktionsgefässen zusammengegeben. Zunächst wurde die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94 °C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Durch das Absenken der Temperatur auf einen primerspezifischen Wert erfolgte die Anlagerung der Primer (Annealing) und im dritten Schritt die Synthese bei 72 °C durch die DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*. Die Länge des Syntheseschrittes ist durch die Länge des zu synthetisierenden PCR-Produkts bestimmt. Durch den zyklischen Ablauf der Schritte Denaturierung, Annealing, Synthese wurde das gewünschte Produkt exponentiell vervielfältigt.

2.4.4. Agarose-Gelelektrophorese

Material:

- 89 mmol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; 89 mmol/l Borsäure; 2 mmol/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (TBE-Puffer)
- Bromphenolblau

- Agarosegel (2%)
- Ethidiumbromid
- 100 Basenpaar ladder

Durchführung:

Zur Gelektrophorese wurde 2 % Agarosegel in TBE-Puffer mit Ethidiumbromidfärbung verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt bis das Bromphenolblau 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Anschließend wurden die Ethidiumbromid-gefärbten Banden der aufgetrennten PCR-Produkte unter UV-Licht betrachtet und für die weitere Isolierung und Sequenzierung aus dem Gel ausgeschnitten.

2.4.5. Isolierung der DNA aus den Gelbanden

Da fehlerhafte Produkte der PCR-Reaktion die Sequenzierung stören und die Ergebnisqualität einschränken wurde eine DNA Isolierung mit dem „illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (General Electric Healthcare Europe, Freiburg) Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.4.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde durch die Firma GATC Biotech in Konstanz durchgeführt. Nach Isolation aus dem Gel wurden die Proben zu diesem Zweck direkt in den Eppendorf Gefäßen an GATC zum Sequenzieren versandt. Bei der Bestellung wurde jeder Probe ein Primer und seine Schmelztemperatur zugeordnet sowie eine fortlaufende Probennummer zur Identifikation.

2.4.7. Auswertung des genetischen Screenings

Das Ergebnis der Sequenzierung wird mit der RyR1 Wildtyp Sequenz auf Abweichungen untersucht. Bei einer Mutation mit Aminosäurenaustausch wurde die Probe durch eine erneute Sequenzierung mit dem zweiten Primer aus dem Primerpaar getestet, um die Mutation zu bestätigen. Mutationen des RYR1 und des CACNA1S wurden auf cDNA und Proteinebene in die Patienten-Datensätze der der Multizentrumdatenbank eingefügt. Es wurde je nach Kausalzusammenhang zur MH zwischen *kausalen* Varianten und Varianten *unbekannter Kausalität* (Definition siehe 1.3.1) unterschieden. Die Genvarianten wurden weiterhin nach ihrer Lokalisation im RyR1 Protein den MH/CCD Regionen 1, 2, 3, oder 0 (außerhalb der Hotspot-Regionen) zugeordnet. Neue Varianten des RyR1 wurden als Mu-

tation charakterisiert, es sei denn die Allelfrequenz der Variante in der Allgemeinbevölkerung war größer als 1 %, so dass sie als Polymorphismus gewertet werden konnte. Neue Mutationen des RyR1 wurden den Varianten *unbekannter Kausalität* zugeordnet, da die funktionelle Charakterisierung bislang nicht erfolgte.

2.5. Statistische Auswertung

Aus den gesammelten Datensätzen wurden je nach dem zu untersuchenden Kriterium Gruppen und Untergruppen gebildet. In den statistischen Berechnungen wurden MHS und MHE Patienten zunächst getrennt, anschließend zusammen betrachtet. Es wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane, sowie 25. und 75. Quartile bestimmt. Sofern nicht anders angegeben handelt es sich bei den Fehlerbalken um die Standardabweichung des Mittelwertes, die Boxgrößen entsprechen jeweils der 25. und 75. Quartile. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels des exakten einseitigen Wilcoxon Rangsummentests (Mann-Whitney-U-Test) bestimmt. Der Test eignet sich bei nicht-normaler Verteilung der Stichproben um die Gleichheit der Mittelwerte zu testen, solange die Form der Verteilungen der zu vergleichenden Stichproben gleich ist. Hierdurch ist der Test insbesondere für kleine Fallzahlen geeignet. P-Werte von $< 0{,}05$ wurden als relevante Unterschiede interpretiert.

3. Ergebnisse

3.1. Multicenter-Evaluation

An der Multicenter-Studie beteiligten sich sieben MH-Testzentren aus vier europäischen Ländern: Universität Basel, Schweiz (A); Universität Leipzig, Deutschland (B); Universität Neapel, Italien (C); Universität Nijmegen, Niederlande (D); Universität Padua, Italien (E); Universität Ulm, Deutschland (F); Universität Würzburg, Deutschland (G). Insgesamt wurden 263 Fälle aus den Jahren 1969 bis 2010 erfasst. Alle Fälle beschreiben klinische MH-Krisen, deren Diagnose mittels IVCT nach europäischem Protokoll gesichert wurde. Von den eingesendeten Datensätzen wurden 63 Fälle aus der Studie ausgeschlossen. 60 Fälle davon aufgrund nicht vollständiger initialer klinischer Dokumentation. Drei Fälle mussten ausgeschlossen werden aufgrund interferiernder Komorbiditäten: Hereditäre motorisch-sensible Neuropathie Typ I (Charcot-Marie-Tooth-Disease), schwere Malariapneumonie und King-Denborough Syndrom mit triggerfreie Krise.

Insgesamt konnten 200 Fälle aus den Jahren 1972 bis 2010 in die Studie eingeschlossen werden: 165 MHS, 25 MHEh und 10 MHEc. Die CGS betrug im Mittelwert 41,8 ± 19,3 Punkte (Median = 39,0 Punkte). Der niedrigste Punktwert ergab 10 Punkte (Rang 3: „eher unwahrscheinlich“), der höchste 91 Punkte (Rang 6: „fast sicher“). Die CGS variierte im Laufe der Jahre nur gering, so dass kein Abwärts-, oder Aufwärtstrend festzustellen ist (Abbildung 4). Der Anteil der nachgewiesenen RyR1 Mutationen an allen MHS oder MHE getesteten Patienten variierte zwischen 40,0 % und 77,3 % und lag damit insgesamt bei 51,5 % (Tabelle 4). In fünf Fällen blieb der Mutationsstatus unbekannt, da den Patienten keine Blutproben entnommen wurden (Testzentrum F). Die Fälle zeigen eine starke Häufung in den frühen 90er Jahren, unter den MHE-Fällen stammen die meisten aus den späten 80er und frühen 90er Jahren (Abbildung 5).

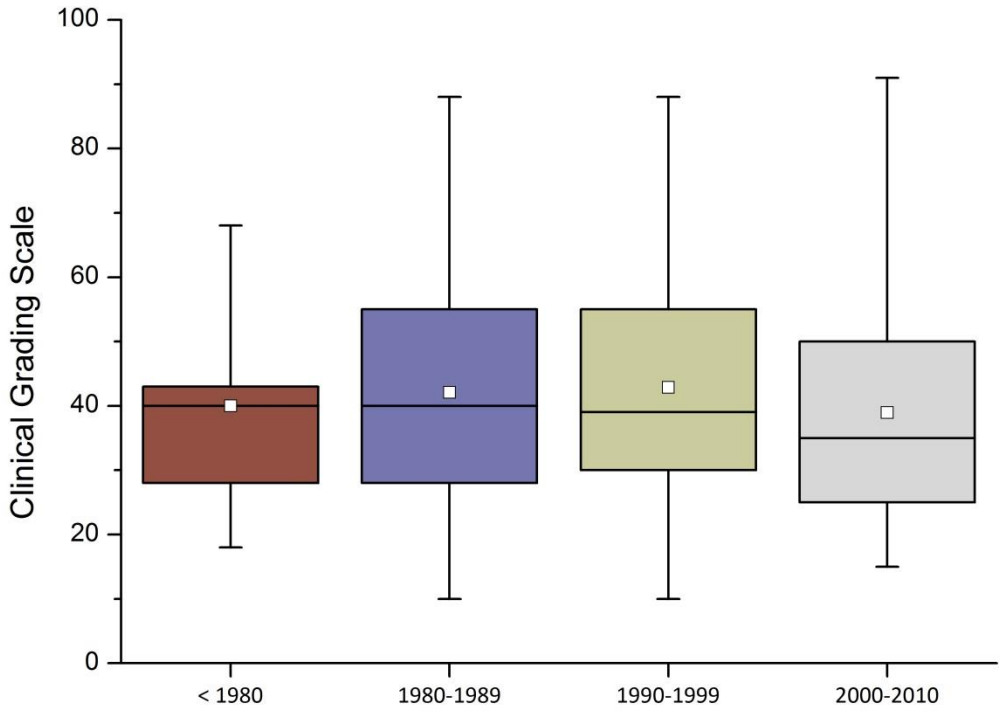


Abbildung 4: Clinical Grading Scale im Wandel der Zeit.

Die Abbildung zeigt die Punktwerte der Clinical Grading Scale (CGS) von 200 bioptisch gesicherten Krisen maligner Hyperthermie, eingeteilt nach dem Krisenjahr. Der Beginn der Box zeigt die erste Quartile, der Strich innerhalb der Box den Median, das weiße Quadrat den Mittelwert, das Ende der Box die dritten Quartile, der obere und untere Whisker jeweils den Minimal-, und den Maximalwert. Es zeigt sich, dass die CGS zu jedem Zeitpunkt großen Schwankungen unterliegt, jedoch kein zeitlich-historischer Auf-, oder Abwärtstrend erkennbar ist: Es konnte keine signifikante Unterschiede in der CGS zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Tabelle 4: Übersicht der Datensätze aus den verschiedenen Testzentren

* Polymorphismen = 2

Zentrum	Zeitraum	Fälle insgesamt	MHS	MHEh	MHEc	CACNA1S Mutationen	RyR1 Mutationen*	Mutationen [%]
A	1972-2009	21	13	8	0	0	11	52,4 %
B	1979-2009	76	61	12	3	0	32	42,1 %
C	1989-2009	11	10	0	1	0	5	45,5 %
D	1988-2008	17	15	1	1	0	12	70,6 %
E	1981-2010	22	19	0	3	0	17	77,3 %
F	1977-2007	38	33	3	2	1	20	55,3 %
G	1977-2008	15	14	1	0	0	6	40,0 %
GESAMT	**1972-2010**	**200**	**165**	**25**	**10**	**1**	**103**	**51,5 %**

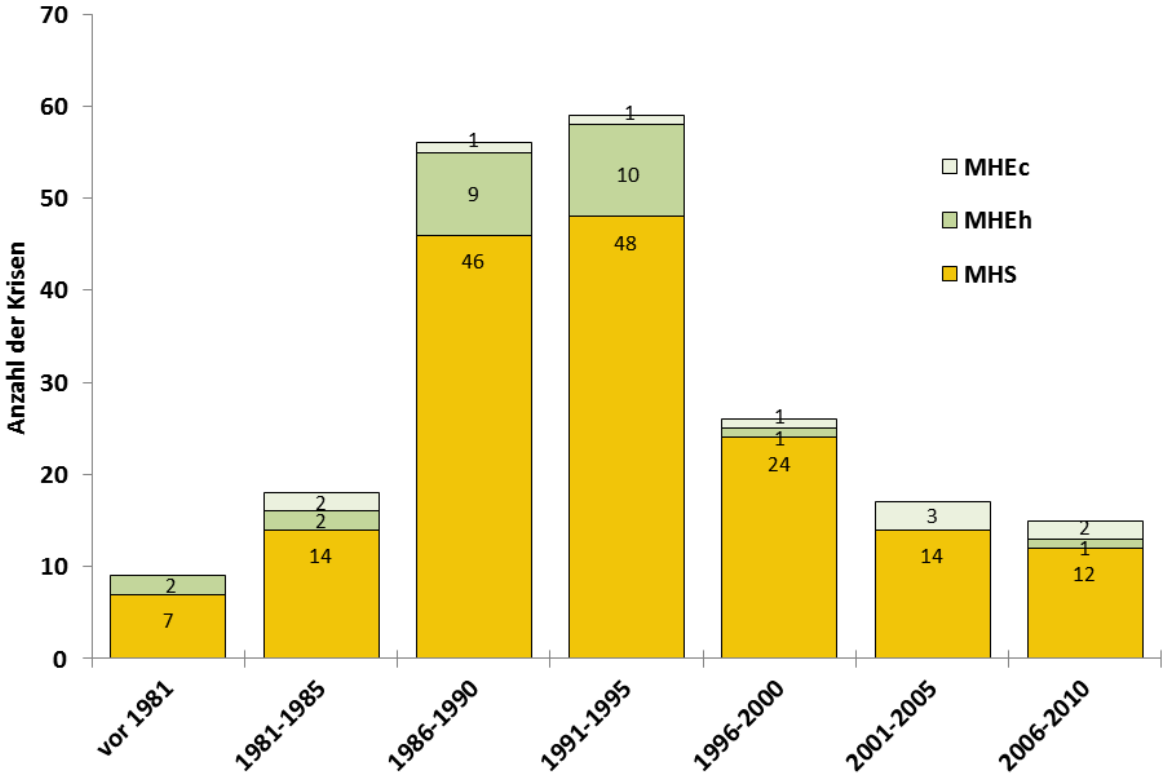


Abbildung 5: Anzahl von Maligne Hyperthermie Krisen im Verlauf der Jahre.

Diese Abbildung zeigt alle in die Studie eingeschlossenen Krisen im Zeitraum der Jahre 1972-2010. Es zeigt sich, dass die meisten Krisen in den 90er Jahren dokumentiert wurden. MHS: Malignant Hyperthermia Susceptible, MHEh: Malignant Hyperthermia Equivocal (Halothan), MHEc: Malignant Hyperthermia Equivocal (Koffein)

3.2. Auswertung klinischer Daten

Das Lebensalter der Patienten während der MH-Krise rangierte zwischen 1 und 78 Jahren, wobei die deutliche Mehrheit der Patienten zum Zeitpunkt der Krise Kinder und Jugendliche waren (Abbildung 6). Das Alter lag im Mittelwert bei 17,2 ± 14,7 Jahren, Median = 12,0 Jahre. 56 % der Patienten (MHS = 51,1 %, MHE = 77,1 %) waren zum Zeitpunkt der Krise jünger als 14 Jahre alt. Die CGS der Kinder unter 14 Jahren lag im Mittelwert bei 41,2 ± 19,6 Punkte, in der Gruppe ab 14 Jahren lag der Mittelwert der CGS bei 42,7 ± 18,9 Punkte. Im Vergleich durch den exakten Wilcoxon Rangsummentests konnte zwischen diesen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Abbildung 6 zeigt die Verteilung der MH-Episoden auf die jeweiligen Altersstufen. Das Durchschnittsalter der weiblichen Patienten lag bei 16,4 ± 12,8 Jahren, das der männlichen bei 17,8 ± 15,3 Jahren, wobei sich in allen Altersstufen eine deutliche Präferenz für das männliche Geschlecht (70,0 %) abzeichnete (Abbildung 7).

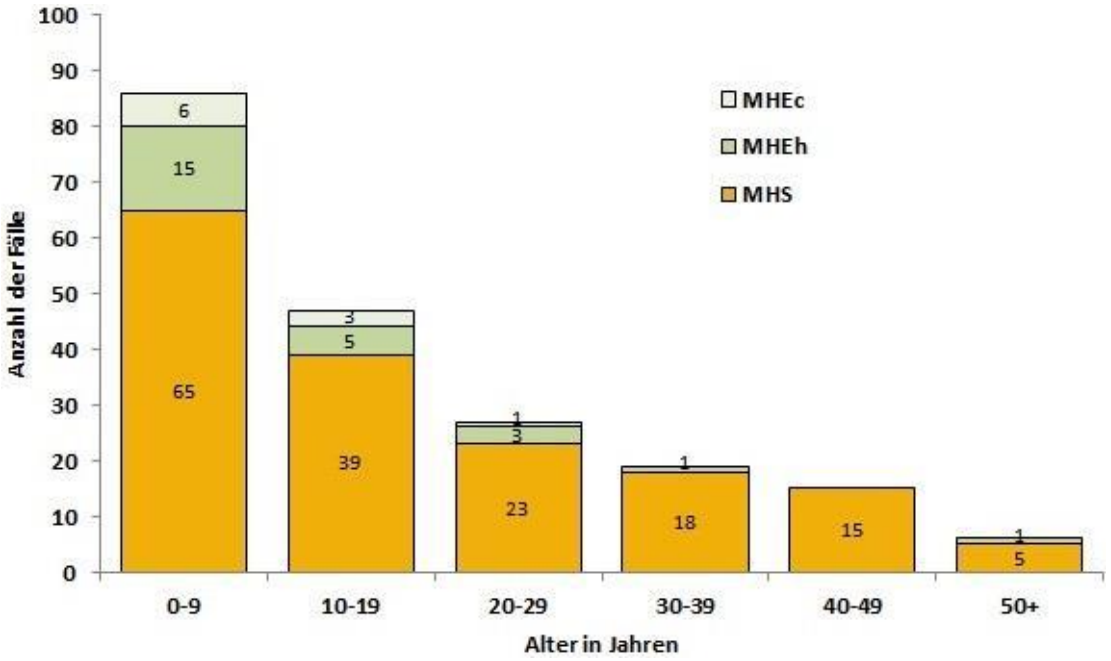


Abbildung 6: Lebensalter während der Maligne Hyperthermie Krisen.

Dargestellt ist das Lebensalter aller Patienten dieser Studie zum Zeitpunkt ihrer Malignen Hyperthermie Krise. Es zeigt sich, dass vorallem Zwischenfälle mit Kindern und jungen Erwachsenen dokumentiert wurden. Dies zeigt sich sowohl in der Gruppe der MHS (Malignant Hyperthermia Susceptible) Patienten, als auch in den Gruppen MHEh (Malignant Hyperthermia Equivocal Halothane) und MHEc (Malignant Hyperthermia Equivocal Coffeine).

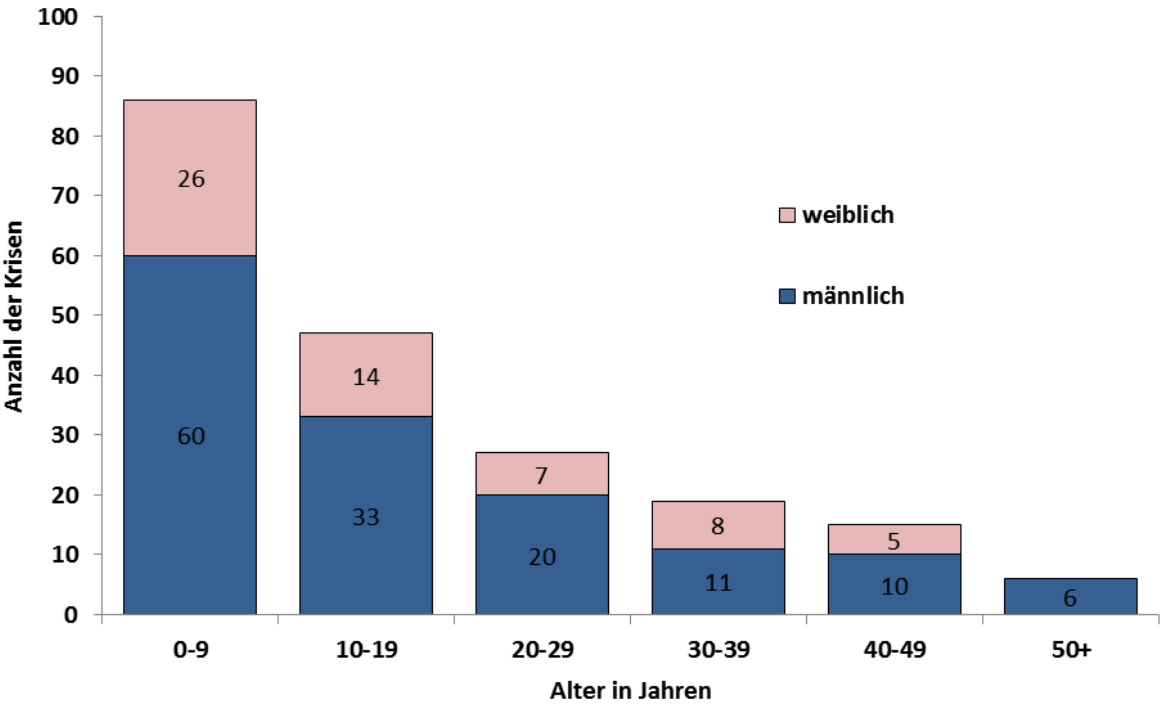


Abbildung 7: Geschlechtsverteilung Maligner Hyperthermie Krisen.

Dargestellt ist das Alter und Geschlecht aller Patienten dieser Studie zum Zeitpunkt der Maligne Hyperthermie Krise. Es fällt auf, dass in allen Altersgruppen das männliche Geschlecht dominiert.

Insgesamt sind Datensätze von 140 männlichen und 60 weiblichen Patienten in die Studie eingeschlossen. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der CGS zwischen weiblichen Patienten (n = 60, Mittelwert = 41,8 ± 20,7 Punkte, Median = 39,0 Punkte) und männlichen Patienten (n = 140, Mittelwert = 41,8 ± 18,6 Punkte, Median = 39,0 Punkte) festgestellt.

3.2.1. Succinylcholin als Triggersubstanz

In 164 von 200 Fällen in dieser Studie wurde die Verwendung von SCh dokumentiert, in den übrigen 36 MH-Krisen wurde SCh nicht verwendet. In der überwiegenden Anzahl der MH-Krisen (n = 162) wurden sowohl SCh als auch volatile Anästhetika verwendet (Tabelle 5). Die statistische Auswertung wurde jeweils für MHS und MHE-Patienten separat und im Anschluss für alle Patienten zusammen durchgeführt. Die Verwendung von SCh hatte hierbei in keiner Gruppe einen relevanten Einfluss auf die CGS: Im exakten Wilcoxon Rangsummentests Unterscheidet sich die Subgruppe *volatile Anästhetika* nicht signifikant von der Subgruppe *volatile Anästhetika + SCh*. Ebenso verhielten sich die Subgruppen *Halothan*, *Enfluran*, *Isofluran* und *Sevofluran* jeweils ± *SCh*. In zwei Fällen war SCh die einzig dokumentierte Triggersubstanz (MHS = 1, MHEc = 1).

Tabelle 5: Verwendete Triggersubstanzen von 200 bioptisch gesicherten Fällen Maligner Hyperthermie.
Die überwiegende Mehrheit der Fälle wurde durch eine Kombination von volatilen Anästhetika und Succinylcholin ausgelöst. Nur ein Patient, der Malignant Hyperthermia Susceptible (MHS) getestet wurde, entwickelte eine klinische MH-Episode nachdem er Succinylcholin allein erhalten hatte. Die Clinical Grading Scale nach Larach et al. 1994 wurde berechnet und ist als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. MHE = Malignant Hyperthermia Equivocal.

Triggersubstanz	Anzahl Patienten		Clinical Grading Scale	
	MHS	MHE	MHS	MHE
volatile Anästhetika	30	6	45,0 ± 22,8	40,7 ± 15,1
Succinylcholin	1	1	15	25
volatile Anästhetika + Succinylcholin	134	28	43,8 ± 18,7	30,8 ± 14,0
gesamt	**165**	**35**	**43,8 ± 19,6**	**32,3 ± 14,5**

Der entsprechende MHS-Fall betraf einen 13-jährigen männlichen Patienten und ereignete sich im Februar 2002 bei der Einleitung einer elektiven HNO-Operation. Die Allgemeinanästhesie wurde mit Thiopental eingeleitet. Zur Intubation wurde SCh verwendet, woraufhin das Kind einen Masseterspasmus und eine generelle Muskelrigidität zeigte. Die Narkose wurde abgebrochen und der Patient wurde mit 100 % Sauerstoff beatmet. Der

Patient erwachte und der chirurgische Eingriff wurde abgebrochen. Die Temperatur war mit 37,4 °C nicht erhöht. Da sich der Zustand des Jungen rasch verbesserte, wurde auf die Therapie mit Dantrolen verzichtet. Am nächsten Tag stieg der CK-Wert auf 17.768 U/l, so dass die Diagnose einer Rhabdomyolyse gestellt wurde. Insgesamt ergeben sich so 15 Punkte in der CGS aufgrund des *Masseterspasmus kurz nach Succinylcholingabe* (Rang 3: „Eher unwahrscheinlich"). Drei Monate nach diesem Ereignis konnte die Disposition zur MH bei diesem Patienten sowohl durch einen positiven IVCT als auch durch den Nachweis der kausalen Mutation p.R614C im RyR1 belegt werden.

3.2.2. Volatile Anästhetika als Triggersubstanzen

In 198 Fällen dieser Studie wurde die Verwendung volatiler Anästhetika dokumentiert: Desfluran (n = 4), Enfluran (n = 17), Halothan (n = 104), Isofluran (n = 51), Sevofluran (n = 22). Die CGS rangierte zwischen 10-91 Punkten und lag im Mittelwert bei 41,8 ± 19,3 (Median = 40,0 Punkte). Die statistische Auswertung wurde zunächst für MHS und MHE-Patienten separat und anschließend für alle Patienten zusammen durchgeführt. In den Gruppen MHS und MHE konnten keine signifikanten Unterschiede in der CGS zwischen den Subgruppen Desfluran, Enfluran, Halothan, Isofluran und Sevofluran festgestellt werden. Bei der Auswertung aller Patientengruppen (MHS + MHE) zeigte die Subgruppe Enfluran signifikant höhere CGS Punktwerte im Vergleich mit Halothan sowie im Vergleich mit Isofluran und Sevofluran (Abbildung 8).

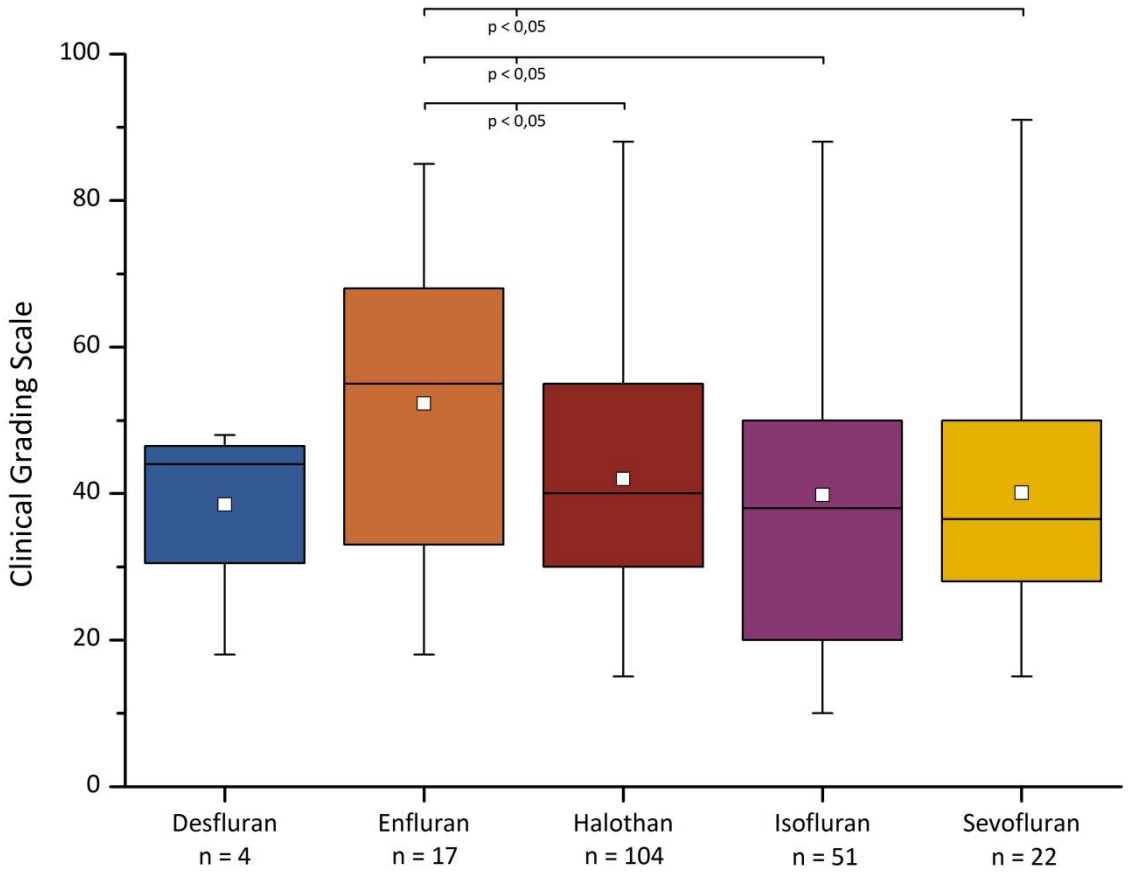


Abbildung 8: Clinical Grading Scale in Abhängigkeit des verwendeten Inhalationsnarkotikums.

Die Abbildung zeigt den Punktwert der Clinical Grading Scale (CGS) in Abhängigkeit des verwendeten volatilen Anästhetikums. Dargestellt sind alle Patienten dieser Studie mit Inhalationsanästhesie (n = 198). Der Beginn der Box zeigt die erste Quartile, der Strich innerhalb der Box den Median, das weiße Quadrat den Mittelwert, das Ende der Box die dritten Quartile, der obere und untere Whisker jeweils den Minimal-, und den Maximalwert. Enfluran zeigte signifikant ($p < 0,05$) höhere Punktwerte der CGS im Vergleich zu Halothan, Sevofluran und Isofluran. Die Subgruppe Desfluran (n = 4) war zu klein für eine statistisch sinnvolle Auswertung.

3.3. Auswertung des in vitro Kontraktur Tests

Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war ein positives (MHS) oder ein mehrdeutiges (MHEc, MHEh) IVCT Ergebnis. Der Schwellenwert für Halothan (Definition siehe 2.3.3) lag im Mittelwert bei 1,1 ± 0,7 vol% (Median = 1,0 vol%). Bei 6 Patienten (MHEc) war keine Halothanschwelle messbar, da die Muskelbündel keine pathologische Kontraktur nach Halothangabe entwickelten, bei den übrigen MHEc Patienten (n = 4) wurde die Halothanschwelle bei 4,0 vol% erreicht. Parallel hierzu lag der Schwellenwert für Koffein (Definition siehe 2.3.3) im Mittelwert bei 1,7 ± 3,2 mmol/l (Median = 1,5 mmol/l). Bei 8 Patienten (MHEh) war keine Koffeinschwelle messbar, da die Muskelbündel keine pathologische Kontraktur nach Koffeingabe zeigten. Bei den übrigen MHEh Patienten (n = 17) lag der Mittelwert der Koffeinschwelle bei 6,4 ± 9,4 mmol/l (Median = 3,0 mmol/l). Die

Kontraktur gemessen bei 2,0 vol% Halothan lag im Mittelwert bei 13,5 ± 11,2 mN (Median = 10,0 mN), die Kontraktur gemessen bei 2,0 mmol/l Koffein lag im Mittelwert bei 9,0 ± 9,3 mN (Median = 6,0 mN).

In der Gruppe der MHS getesteten Patienten (n = 165) lag die CGS im Mittelwert bei 43,8 ± 19,6 Punkten (Median = 43,0 Punkte). In der MHE-Gruppe (n = 35) insgesamt lag die CGS im Mittelwert bei 32,3 ± 14,5 Punkten (Median = 33,0 Punkte). Die CGS-Punktzahl der MHS-Gruppe war im Vergleich zur MHE-Gruppe signifikant höher. Die Untergruppen MHEh und MHEc unterschieden sich nicht signifikant. Die CGS-Punktzahl der MHS-Gruppe war signifikant höher als die der Untergruppe MHEh (Mittelwert = 32,5 ± 16,4 Punkte, Median = 33,0 Punkte), siehe Abbildung 9.

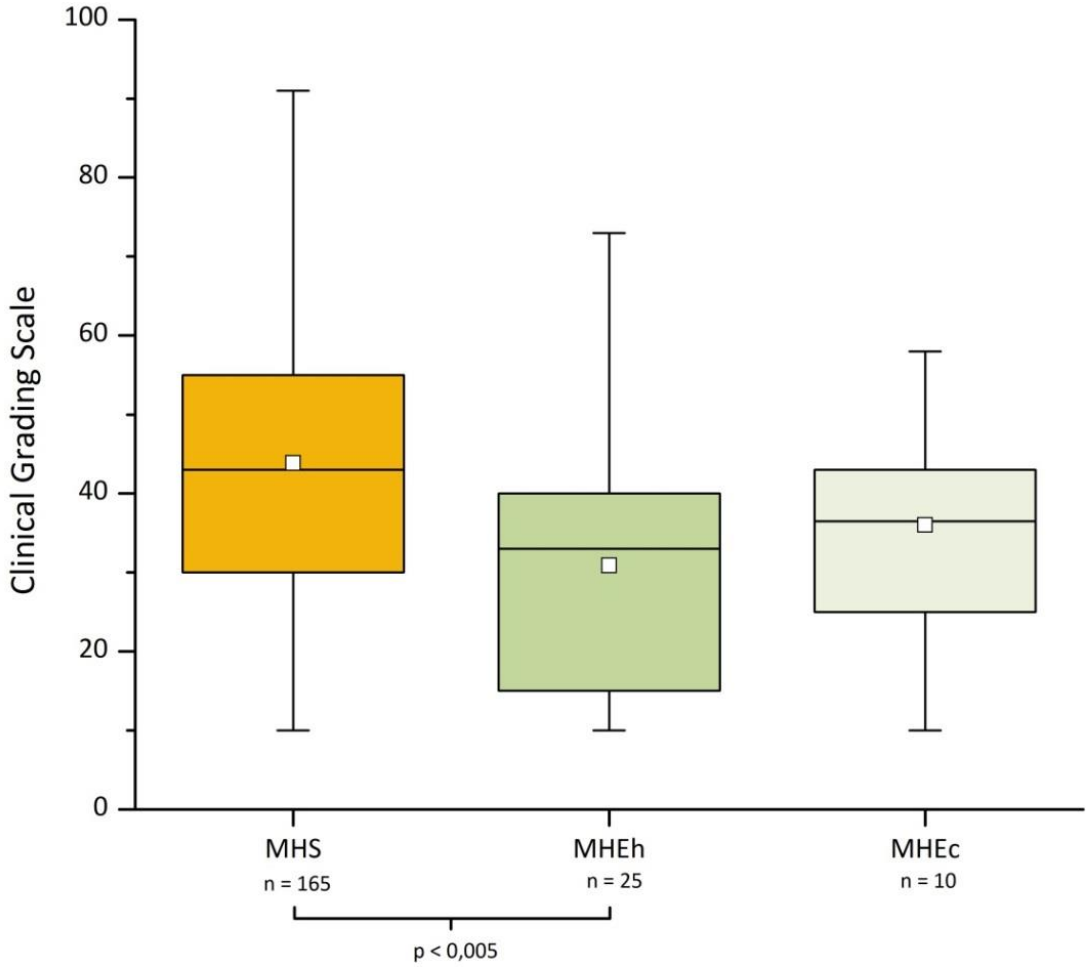


Abbildung 9: Clinical Grading Scale in Abhängigkeit der Malignen Hyperthermie Diagnose durch den In Vitro Kontrakturtest.
Die Abbildung zeigt den berechneten Punktwert der Clinical Grading Scale (CGS) nach Larach et al. 1994 aller Patienten dieser Studie (n = 200) eingeteilt anhand der Ergebnisse des In Vitro Kontraktur Tests. Der Beginn der Box zeigt die erste Quartile, der Strich innerhalb der Box den Median, das weiße Quadrat in der Box den Mittelwert, das Ende der Box der dritten Quartile, der obere und untere Whisker jeweils den Minimal-, und den Maximalwert. Die Gruppe Malignant Hyperthermia Susceptible (MHS) hat einen signifikant ($p < 0,005$) höheren CGS Punktwert als die Untergruppe Malignant Hyperthermia Equivocal für Halothan (MHEh). MHEc = Malignant Hyperthermia Equivocal für Koffein.

Die Ergebnisse der Methoden IVCT und CGS waren konsistent: Die Antwort des IVCT von Patienten mit hohen CGS Punktwerten war stärker als bei niedrigen CGS Punktwerten: MHS Patienten, deren klinische MH-Episode in der Berechnung der CGS den MH-Rang 4 und 5 belegten (n = 107), entwickelten signifikant stärkere Halothan- und Koffeinkontrakturen im IVCT (Abbildung 10) und signifikant niedrigere Halothan- und Koffeinschwellenwerte (Abbildung 11) im Vergleich zu Patienten, deren klinische MH-Krise in der Berechnung der CGS den MH-Rang 3 und 4 ergaben (n = 58).

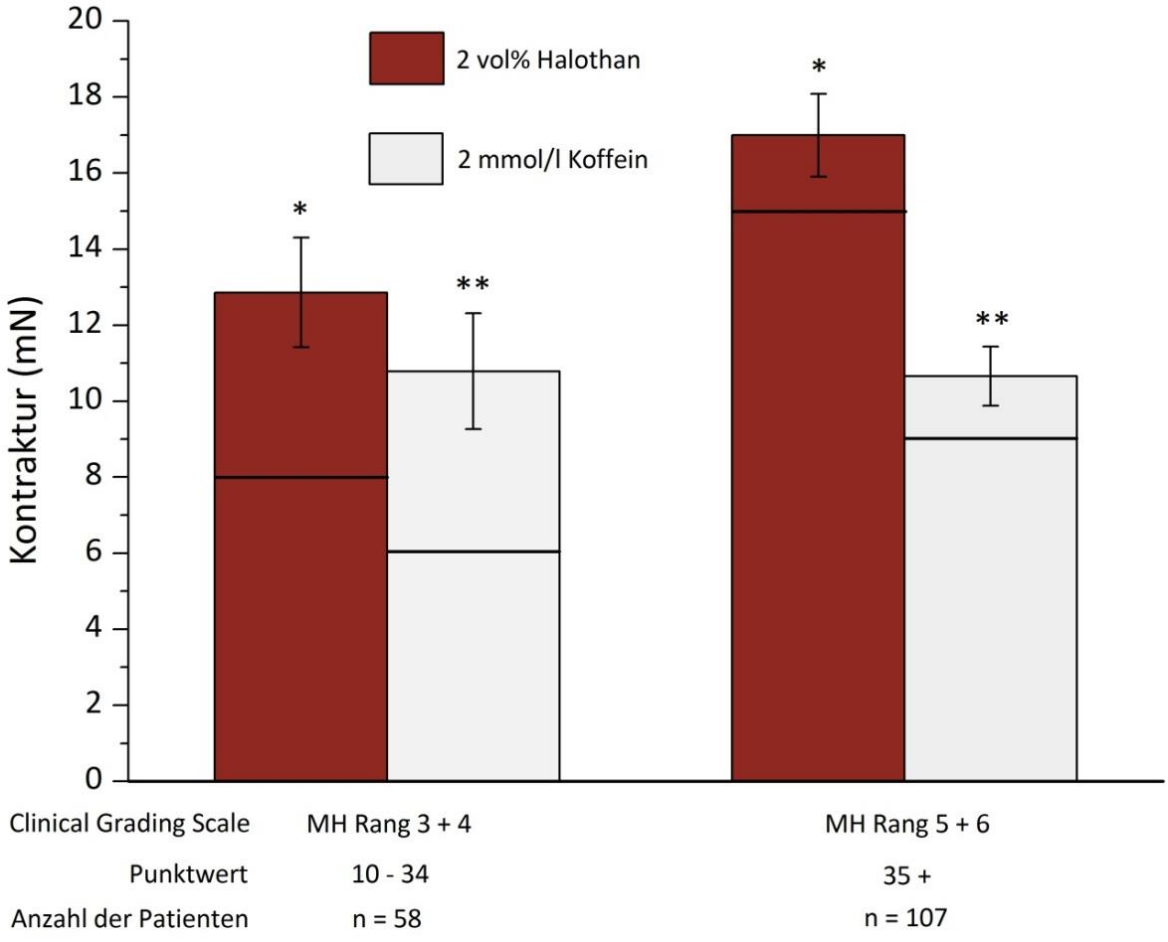


Abbildung 10: In vitro Kontrakturen von Patienten verschiedener MH-Ränge

Dargestellt sind alle Malignant Hyperthermia Susceptible (MHS) getesteten Patienten dieser Studie (n = 165). Patienten der Clinical Grading Scale MH-Ränge 5 und 6 entwickeln stärkere Kontrakturen im In Vitro Kontrakturtest (IVCT) als Patienten der MH-Ränge 3 und 4. Die Höhe der Balken entsprechen jeweils dem Mittelwert, die Fehlerbalken dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM), und die horizontale Linie dem Median. Signifikante ($p < 0,005$) Ergebnisse wurden mit * gekennzeichnet.

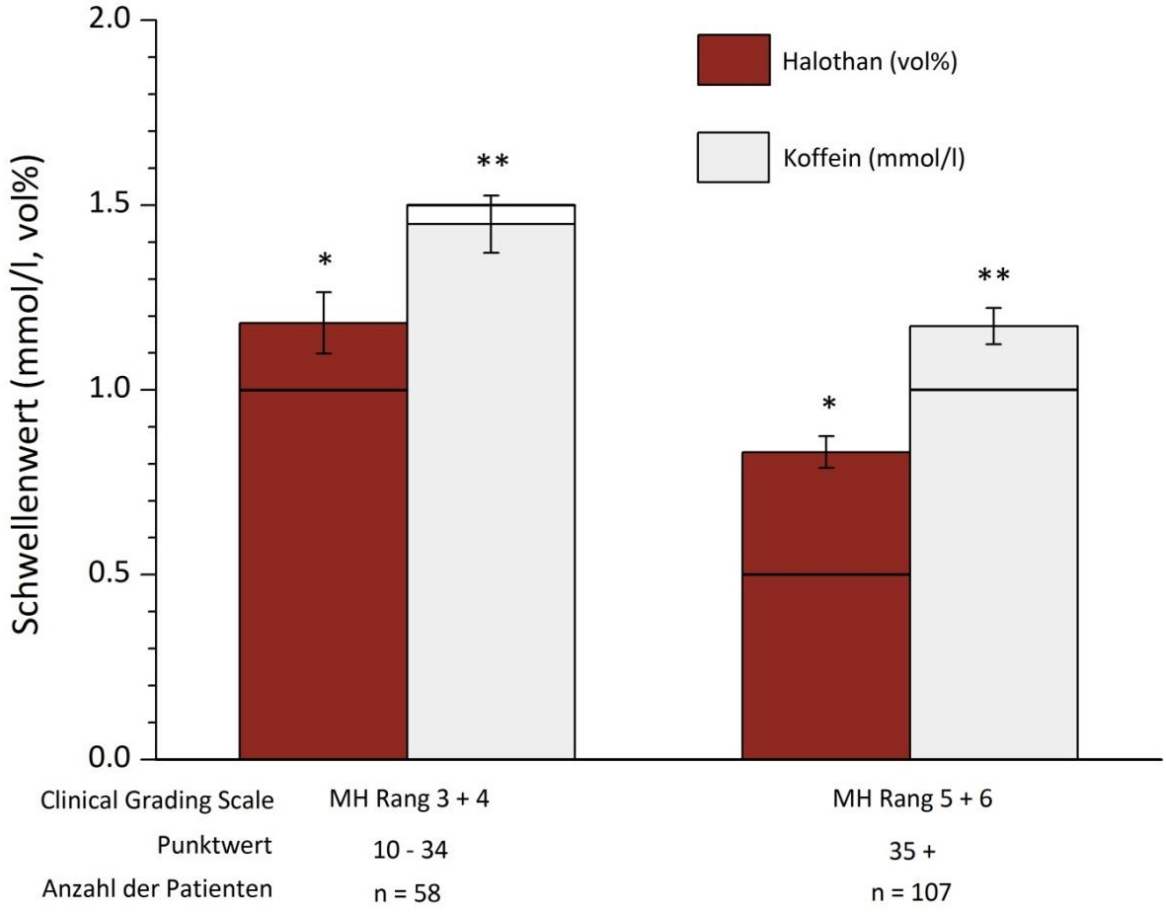


Abbildung 11: Schwellenwerte im In Vitro Kontrakturtest unterschiedlicher MH-Ränge

Die Abbildung zeigt alle Malignant Hyperthermia Susceptible (MHS) getesteten Patienten dieser Studie (n = 165). Patienten der Clinical Grading Scale MH-Ränge 5 und 6 zeigen niedrigere Halothan- und Koffeinschwellenwerte im In Vitro Kontrakturtest (IVCT) als Patienten der MH-Ränge 3 und 4. Die Höhe der Balken entsprechen jeweils dem Mittelwert, die Fehlerbalken dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM), und die horizontale Linie dem Median. Signifikante ($p < 0,005$) Ergebnisse wurden mit * gekennzeichnet.

3.4. Auswertung des genetischen Screenings

3.4.1. RYR1 Mutationen

196 Patienten dieser Studie wurden genetisch untersucht. Vier Patienten mussten aus der genetischen Analyse ausgeschlossen werden, da bei diesen Patienten keine Blutentnahme erfolgte. Insgesamt waren konnte 99 Patienten eine, und 4 Patienten zwei Varianten im RyR1 nachgewiesen werden (Tabelle 6, Tabelle 7). Zwei RyR1 Varianten sind polymorphismen: Exon 15, c.1655G>A, p.R552Q (persönliche Kommunikation V. Teggazin) und Exon 38, c.6178G>T, p.G2060C (Robinson et al. 2006). Patienten mit doppelter RyR1 Mutation zeichneten sich durch starke Anworten im IVCT aus, die CGS war jedoch nicht erhöht: der Mittelwert lag bei 39,0 ± 5,3 Punkten (Median = 36,5 Punkte), die Gruppengröße war mit n = 4 zu klein für eine statistische Auswertung (Tabelle 7).

Tabelle 6: Mutationen des Ryanodinrezeptor Typ 1.

Dargestellt sind alle Mutationen des Ryanodinrezeptors Typ 1 (RyR1) die in dieser Studie nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse des In Vitro Kontrakturtests (IVCT) sowie die Berechnung der Clinical Grading Scale (CGS) sind als Mittelwerte angegeben wenn mehrere Patienten betroffen sind. Die Tabelle zeigt, ob der Kausalzusammenhang zur Malignen Hyperthermie (MH) für die jeweilige Mutation gemäß der European Malignant Hyperthermia Group (EMHG) nachgewiesen werden konnte. In dieser Studie neu beschriebene Varianten (n = 13) sind **blau** markiert. CCD = Central Core Disease. MmD = Multi Minicore Disease. Polymorph. = Polymorphismus. HypoPP = Hypokaliämische periodische Lähmung.

Exon	Nukleotid	Substitution	Patienten in dieser Studie (n)	Kontraktur bei 2%v/v Halothan [Nm]	Schwellenwert Halothan [%v/v]	Kontraktur bei 2 mmol/l Coffein [Nm]	Schwellenwert Coffein [mmol/l]	Clinical Grading Scale	assoziierter Phänotyp	Kausalzusammenhang nachgewiesen?	Referenz
2	c.130C>T	p.R44C	1	12,0	0,5	10,8	1,0	78,0	MH, CCD, MmD	Nein	Tammaro et al. 2003
3	**c.178G>T**	**p.D60Y**	**1**	**13,0**	**1,0**	**4,5**	**2,0**	**30,0**	**CCD, MH**	**Nein**	**Diese Studie, V. Sorrentino**
11	c.1021G>A	p.G341R	3	14,3	0,8	13,7	0,8	54,3	MH	Ja	Quane et al. 1994
11	**c.1024G>A**	**p.E342K**	**1**	**37,8**	**0,5**	**23,8**	**0,5**	**30,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, K. Jurkat-Rott**
11	c.1100G>A	p.R367Q	1	10,0	0,5	4,1	1,5	15,0	MH	Nein	Galli et al. 2006
12	c.1201C>T	p.R401C	1	17,0	1,0	7,0	1,5	18,0	MH, MmD	Nein	Davis et al. 2002, Galli et al. 2002
12	c.1202G>A	p.R401H	1	21,0	1,0	12,0	1,5	55,0	MH	Nein	Rüffert et al. 2002 b
15	**c.1655G>A**	**p.R552Q**	**1**	**36,0**	**0,5**	**8,0**	**1,5**	**38,0**	**Polymorph.**	**Nein**	**Diese Studie, V. Sorrentino**
17	c.1840C>T	p.R614C	25	13,7	0,9	10,5	1,3	50,8	MH	Ja	Gillard et al. 1991
17	c.1841G>T	p.R614L	2	16,6	0,5	8,3	1,0	30,5	MH	Ja	Quane et al. 1997
34	**c.5011G>A**	**p.A1671T**	**1**	**8,0**	**2,0**	**24,8**	**0,5**	**35,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, K. Jurkat-Rott**
38	c.6178G>T	p.G2060C	1	16,4	0,5	8,0	1,0	88,0	Polymorph.	Nein	Robinson et al. 2006
39	c.6377G>A	p.R2126Q	1	26,8	0,5	8,8	2,0	35,0	MH	Nein	Kraeva et al. 2011
39	c.6387C>G	p.D2129E	1	10,0	2,0	11,0	1,0	45,0	MH	Nein	Sambuughin et al. 2001 b,Rüffert et al. 2001
39	c.6488G>C	p.R2163P	1	20,0	1,0	4,0	2,0	55,0	MH	Nein	Manning et al. 1998 b
39	c.6502G>A	p.V2168M	6	22,5	0,5	12,3	1,1	58,8	MH	Ja	Manning et al. 1998 b
40	c.6599C>T	p.A2200V	1	-	-	3,0	2,0	10,0	MH	Nein	Sambuughin et al. 2005
40	c.6617C>T	p.T2206M	9	20,5	0,9	10,4	1,0	50,4	MH	Ja	Manning et al. 1998 b, Wehner et al. 2002
41	**c.6710G>A**	**p.C2237Y**	**1**	**6,0**	**0,5**	**6,0**	**1,0**	**38,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, M. Snoeck**
43	c.7007G>A	p.R2336H	4	12,8	0,8	11,7	1,1	47,3	MH	Nein	Levano et al. 2009
43	c.7025A>G	p.N2342S	1	3,0	2,0	0,0	4,0	30,0	MH, HypoPP	Nein	Marchant et al. 2004
44	**c.7034G>C**	**p.S2345T**	**1**	**32,0**	**0,5**	**24,0**	**1,0**	**28,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, V. Sorrentino**
44	c.7048G>A	p.A2350T	1	22,0	1,0	9,0	1,0	55,0	MH	Ja	Sambuughin et al. 2001 a
44	**c.7076G>A**	**p.R2359Q**	**1**	**3,0**	**2,0**	**4,0**	**2,0**	**15,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, H. Rüffert**
44	c.7085A>G	p.E2362G	1	16,0	0,5	8,0	1,0	43,0	MH	Nein	Galli et al. 2006
44	c.7112A>G	p.E2371G	1	16,0	1,0	10,0	1,5	91,0	MH	Nein	Zullo et al. 2009
44	c.7124G>C	p.G2375A	2	19,5	0,5	20,5	0,8	59,5	MH	Ja	Rüffert et al. 2002 a
45	c.7300G>A	p.G2434R	5	24,3	0,7	12,2	1,1	57,4	MH	Ja	Sambuughin et al. 2001 b
46	c.7354C>T	p.R2452W	1	8,0	1,0	20,0	1,5	48,0	MH	Nein	Chamley et al. 2000
46	c.7358T>C	p.I2453T	1	7,0	1,0	7,0	1,5	63,0	MH	Nein	Rüffert et al. 2002 b
46	c.7360C>T	p.R2454C	1	9,2	0,5	6,0	1,0	28,0	MH	Ja	Keating et al. 1994
46	c.7361G>A	p.R2454H	3	15,3	0,8	13,0	1,0	48,0	CCD, MH	Ja	Barone et al. 1999
46	c.7372C>T	p.R2458C	2	7,3	1,0	2,0	2,0	41,5	MH	Ja	Manning et al. 1998 a
71	c.10616G>A	p.R3539H	1	7,0	2,0	8,0	1,5	38,0	CCD, MmD	Nein	Dekomien et al. 2005, Monnier et al. 2008
85	c.11708G>A	p.R3903Q	2	4,8	2,0	2,5	2,0	25,0	MH, MmD	Nein	Galli et al. 2006, Zullo et al. 2009
85	**c.11723A>T**	**p.N3908I**	**1**	**8,0**	**1,0**	**4,8**	**1,5**	**20,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, K. Jurkat-Rott**

90	**c.12398 A>G**	**p.E4133G**	**1**	**2,0**	**2,0**	**2,5**	**2,0**	**10,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, V. Sorrentino**
90	c.12413T>C	p.I4138T	1	11,0	1,0	15,0	1,0	25,0	CCD, MH	Nein	Robinson et al. 2006
90	**c.12532G>A**	**p.G4178S**	**1**	**32,0**	**0,5**	**8,0**	**1,5**	**38,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, V. Sorrentino**
95	c.13990T>C	p.C4664R	1	20,0	1,5	4,0	1,5	50,0	MH	Nein	Zullo et al. 2009
98	**c.14204G>A**	**p.R4735Q**	**1**	**7,0**	**1,0**	**5,0**	**1,5**	**50,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, H. Rüffert**
101	c.14545G>A	p.V4849I	3	3,8	1,5	3,3	2,0	36,3	CCD	Nein	Jungbluth et al. 2002
101	c.14627A>G	p.K4876R	1	14,0	0,5	14,0	0,5	48,0	MH	Nein	Monnier et al. 2005
103	**c.14.833C>T**	**p.R4945X**	**1**	**9,9**	**0,5**	**23,3**	**0,5**	**15,0**	**MH fraglich**	**Nein**	**Diese Studie, K. Jurkat-Rott**
106	**c.15059G>C**	**p.W5020S**	**1**	**1,0**	**-**	**2,0**	**2,0**	**43,0**	**MH**	**Nein**	**Diese Studie, V. Sorrentino**

Tabelle 7: Doppelmutationen im Ryanodinrezeptor Typ 1.

Die Tabelle zeigt alle Patienten aus dieser Studie, bei denen zwei Mutationen im Ryanodinrezeptor Typ 1 (RyR1) nachgewiesen wurden. Obwohl bei keiner dieser Mutationen ein Kausalzusammenhang zur Malignen Hyperthermie (MH) nachgewiesen werden konnte, zeigen die Patienten eine vergleichsweise starke Antwort im In Vitro Kontraktur Test (IVCT). Die Clinical Grading Scale fällt jedoch nicht stärker aus. Spon. Rhabdomyolyse = spontane Rhabdomyolyse

Patienten in dieser Studie (n)	Exon	Nukleotid	Substitution	Kausalzusammenhang nachgewiesen?	Referenz	Kontraktur bei 2%v/v Halothan [Nm]	Schwellenwert Halothan [%v/v]	Kontraktur bei 2 mmol/l Coffein [Nm]	Schwellenwert Coffein [mmol/l]	Clinical Grading Scale	Phänotyp
1	11	c.1100G>T	p.R367L	Nein	Levano et al. 2009	20.0	1.0	4.5	1.5	48	MH
	65	c.9649T>C	p.S3217P	Nein	Levano et al. 2009						
1	8	c.677T>A	p.M226K	Nein	Robinson et al. 2006	53.0	0.5	24.0	0.5	38	MH
	28	c.4024A>G	p.S1342G	Nein	Levano et al. 2009						
1	44	c.7085A>G	p.E2362G	Nein	Galli et al. 2006	56.0	0.5	57.0	0.5	35	MH
	93	c.13513G>C	p.D4505H	Nein	Groom et al. 2011						
1	29	c.4178A>G	p.K1393R	Nein	Vukcevic et al. 2010	15.0	0.5	12.0	1.5	35	MH, spon. Rhabdomyolyse
	98	c.14210G>A	p.R4737Q	Nein	Monnier et al. 2005						

Die meisten RyR1 Mutationen konnten innerhalb der MH/CCD Region 1 und 2 nachgewiesen werden, vereinzelt wurden jedoch auch Mutationen in der luminalen / transmembranen Region (MH/CCD Region 3) des Proteins und außerhalb der Hotspots nachgewiesen. Die MH/CCD Region 3 wird in dieser Studie durch die Aminosäuren 4664-5020 begrenzt. Die Mutation p.R614C (n = 25) war die häufigste Mutation dieser Studie. Die Verteilung aller nachgewiesenen RyR1 Mutationen und Polymorphismen innerhalb des Proteins zeigt Abbildung 12. Die CGS-Punktwerte der Patienten mit RyR1 Mutationen (n = 97, Mittelwert = 46,0 ± 20,5 Punkte, Median = 45,0 Punkte) lag signifikant höher als der CGS-Punktwert der Patienten mit RyR1 Wildtyp (n = 92, Mittelwert = 37,6 ± 16,9 Punkte, Median = 38,0 Punkte).

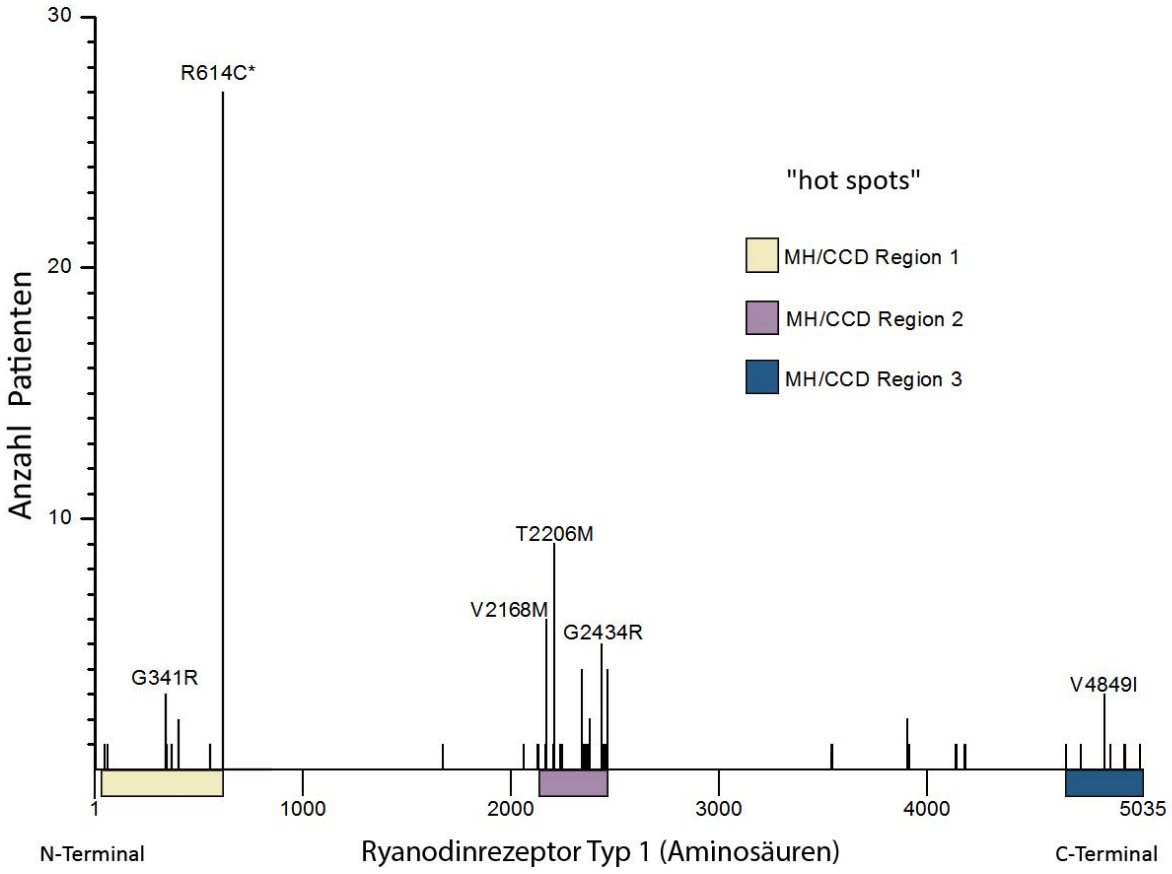


Abbildung 12: Die Mutationen des Ryanodinrezeptors Typ 1 (RyR1) nach ihrer Position im Protein.

Diese Abbildung zeigt alle Mutationen und Polymorphismen des RyR1, die in dieser Studie nachgewiesen werden konnten. Die X-Achse stellt hierbei die Aminosäurenkette vom N-Terminus zum C-Terminus des Proteins dar. Mutationen des RyR1 finden sich am häufigsten innerhalb drei MH/CCD Regionen. Auch außerhalb dieser Regionen wurden Mutationen nachgewiesen. Patienten mit zwei Mutationen im RyR1 (n = 4) sind in der Abbildung nicht berücksichtigt. *p.R614C (n = 25), p.R614L (n = 2). MH: Maligne Hyperthermie. CCD: Central Core Disease.

Unter den Patienten mit RyR1 Mutationen variierte die CGS Punktzahl je nach Lokalisation der Mutation im Protein: Mutationen innerhalb der MH/CCD Regionen (n = 87, Mittelwert = 47,9 ± 20,5 Punkte, Median = 48,0 Punkte) entwickelten signifikant höhrere CGS Punktwerte als Mutationen außerhalb der MH/CCD Regionen (n = 10, Mittelwert = 29,6 ± 10,1 Punkte, Median = 32,5 Punkte). Parallel hierzu entwickelten die Patienten mit RyR1 Mutationen innerhalb der MH/CCD Regionen signifikant stärkere Halothankontrakturen im IVCT als Patienten mit RyR1 Mutationen außerhalb der MH/CCD Regionen.

Auch die CGS der Subgruppen MH/CCD Region 1, 2 und 3 lagen signifikant höher als die CGS von Mutationen außerhalb der MH/CCD Regionen (Abbildung 13). Die MH/CCD Regionen 1, 2 und 3 unterschieden sich nicht signifikant in ihrer CGS Punktzahl.

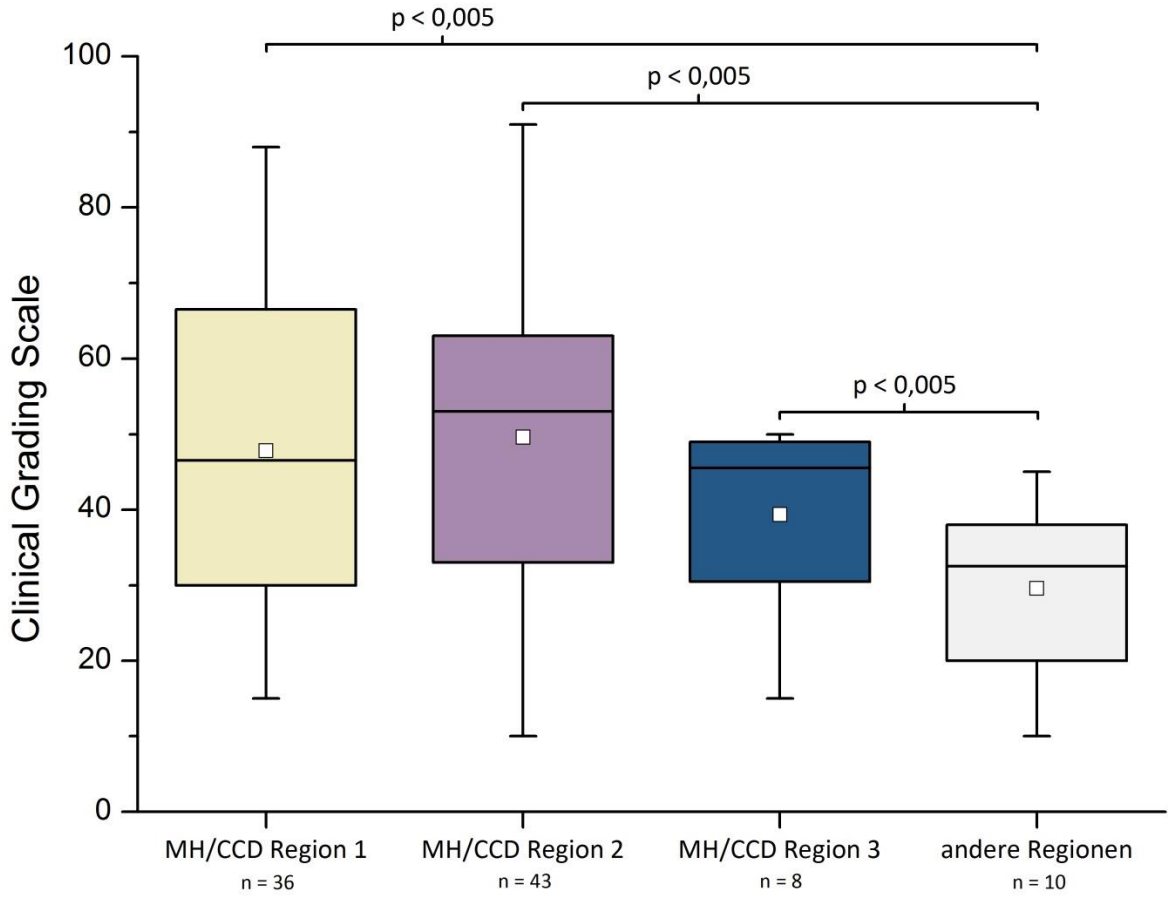


Abbildung 13: Einfluss der Maligne Hyperthermie / Central Core Disease (MH/CCD) Regionen auf die Clinical Grading Scale

Mutationen im Ryanodinrezeptor Typ 1 haben je nach ihrer Lokalisation im Protein einen unterschiedlichen Einfluss auf die Clinical Grading Scale (CGS). Patienten mit Mutationen innerhalb der MH/CCD Regionen haben signifikant höhere CGS Punktzahlen als Patienten mit Mutationen außerhalb der MH/CCD Regionen (andere Regionen). Der Beginn der Box zeigt die erste Quartile, der Strich innerhalb der Box den Median, das weiße Quadrat in der Box den Mittelwert, das Ende der Box der dritten Quartile, der obere und untere Whisker jeweils den Minimal-, und den Maximalwert. Polymorphismen (n = 2) sind nicht berücksichtigt. MH: Maligne Hyperthermie. CCD: Central Core Disease

Patienten mit kausalen RyR1 Mutationen (Definition siehe 1.3.1) (n = 59) erhielten die höchsten Punktzahlen in der CGS: Mittelwert 51,2 ± 20,7 Punkte (Median = 53,0 Punkte). Bei Patienten mit RyR1 Mutationen unbekannter Kausalität (n = 38) lag die CGS im Mittelwert bei 38,1 ± 17,5 Punkte (Median = 38,0 Punkte), bei einem Signifikanzlevel von $p < 0,005$ (Abbildung 14). Zwischen Patienten mit RyR1 Mutationen unbekannter Kausalität und Patienten ohne RyR1 Mutationen (siehe oben) konnte kein relevanter Unterschied in der CGS gemessen werden. Parallel hierzu waren bei kausalen RyR1 Mutationen die in vitro Kontrakturen stärker und die Schwellenwerte für Halothan und Koffein niedriger als bei RyR1 Mutationen unbekannter Kausalität bzw. ohne nachgewiesene RyR1 Mutation (Tabelle 8).

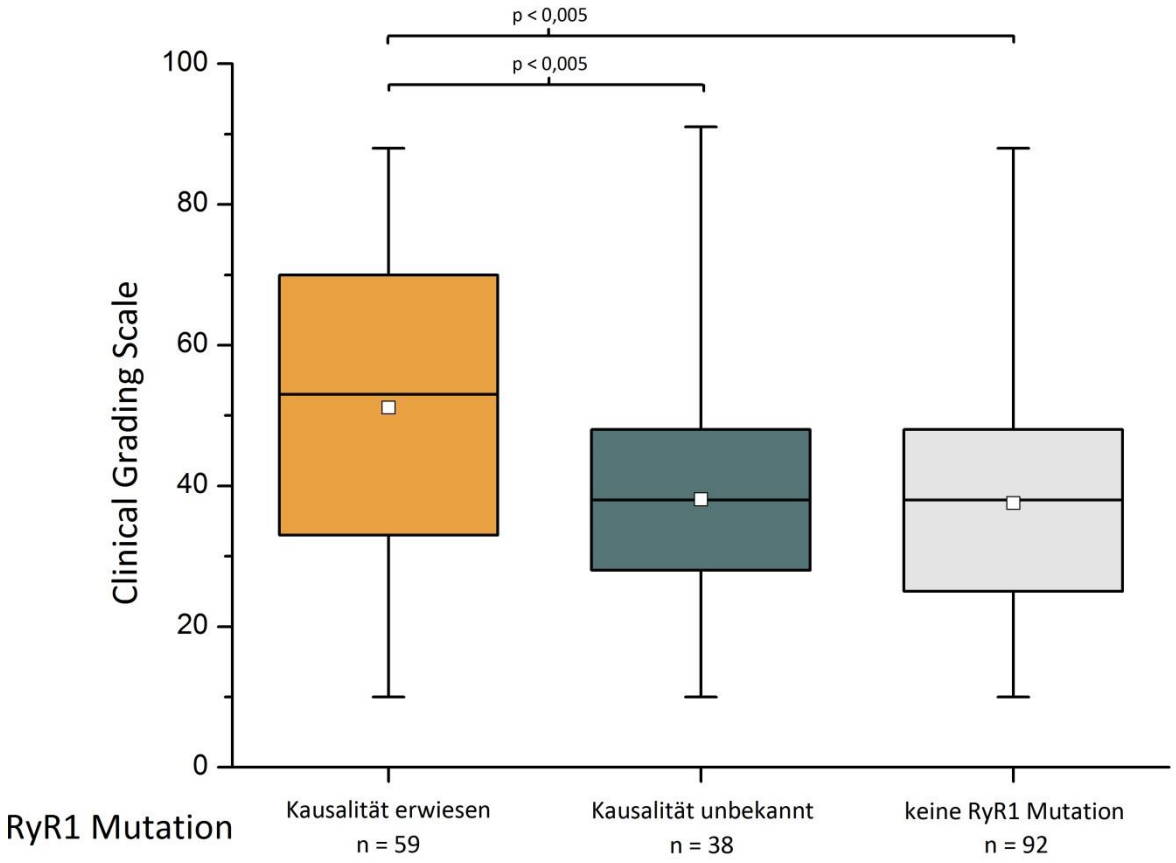


Abbildung 14: Clinical Grading Scale in Abhängigkeit verschiedener Ryanodinrezeptor Typ 1 (RyR1) Mutationen.

Punktwerte der Clinical Grading Scale (CGS) von 191 Patienten dieser Studie. Patienten ohne genetische Untersuchung (n = 4), Patienten mit Mutation im CACNA1S (n = 1), Patienten mit Polymorphismen (n = 2) und Patienten mit doppelter RyR1 Mutation (n = 4) sind in der Abbildung nicht dargestellt. Der Beginn der Box zeigt die erste Quartile, der Strich innerhalb der Box den Median, das weiße Quadrat den Mittelwert, das Ende der Box die dritte Quartile und die Fehlerbalken zeigen den Minimal-, und den Maximalwert. Es zeigt sich, dass Patienten mit kausalen RyR1 Mutationen im Vergleich zu Patienten mit RyR1 Mutationen unbekannter Kausalität sowie im Vergleich zu Patienten ohne RyR1 Mutation eine signifikant (P < 0,005) höhere CGS entwickelten.

Tabelle 8: Einfluss kausaler RyR1 Mutationen auf In Vitro Kontrakturtest und Clinical Grading Scale

Die Tabelle zeigt 189 Patienten dieser Studie unterteilt nach Klassifikation ihrer Mutation im Ryanodinrezeptor Typ 1 (RyR1) (Definition siehe 1.3.1). Patienten ohne genetische Untersuchung (n = 4), Mutation im CACNA1S (n = 1), Polymorphismen (n = 2) und doppelter RyR1 Mutation (n = 4) sind nicht berücksichtigt. Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Signifikante Unterschiede sind mit ***** und **+** gekennzeichnet.

RyR1 Mutation	Patienten (n)	Clinical Grading Scale	Kontraktur (mN) 2 vol% Halothan	Kontraktur (mN) 2 mmol/l Koffein	Schwellenwert Halothan (vol%)	Schwellenwert Koffein (mmol/l)
Kausalität erwiesen	59	51,1 ± 20,67 *** +**	16.77 ± 9.84 **+ ***	10.94 ± 7.24 *****	0.81 ± 0.44 + *****	1.14 ± 0.63 **+ ***
Kausalität unbekannt	38	38,08 ± 17,46 *****	11.69 ± 8.99 *****	8.73 ± 6.90 *****	1.10 ± 0.58 *****	1.50 ± 0.64 *****
keine RyR1 Mutation	92	37,55 ± 16,90 **+**	11.43 ± 10.90 **+**	7.52 ± 10.02 *****	1.30 ± 0.83 **+**	2.35 ± 7.70 **+**

3.4.2. CACNA1S Mutationen

Einem Patienten dieser Studie konnte eine CACNA1S Mutation nachgewiesen werden: Es handelt sich um den Basenaustausch c.520C>T im Exon 4, der zum Aminosäurenaustausch p.R174W führt. Bei der genetischen Sequenzierung des RYR1 konnte keine Mutation festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Krise (1983) war der Patient 7 Jahre alt. Der Zwischenfall ereignete sich während einer Narkose mit Enfluran (2,5 vol%) und Muskelrelaxierung mit Succinylcholin (50 mg), die Berechnung des CGS ergab 58 Punkte (Rang 6: „Fast sicher“). Bei der im Intervall durchgeführten Muskelbiopsie und IVCT zeigte der Patient eine Kontraktur von 1,2 mN bei 2,0 vol% Halothan, was nicht als pathologisch interpretiert wurde. Der Halothanschwellenwert wurde während des IVCT bis 3,0 vol% nicht erreicht. Die Kontraktur bei 2,0 mmol/l Koffein lag bei 3,2 mN, der Koffeinschwellenwert bei 2,0 mmol/l Koffein. Somit wurde der Patient als MHEc klassifiziert.

4. Diskussion

4.1. Triggerpotential des Succinylcholins

SCh gilt als klassische Triggersubstanz der MH. Mit den in dieser Studie angewendeten Methoden (CGS, IVCT, Multicenter-Evaluation) wird die Hypothese bestätigt, dass SCh im Gegensatz zu volatilen Anästhetika nur eine schwache Potenz zur Triggerung einer akuten MH-Episode besitzt. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass SCh als Kofaktor das Voranschreiten akuter MH-Episoden begünstigt, die durch volatile Anästhetika ausgelöst wurden. Daher ist SCh bei Patienten mit Prädisposition zur MH absolut kontraindiziert.

Diese Multicenter-Studie beinhaltet weltweit die größte Sammlung klinischer MH-Fälle deren Diagnose mittels IVCT bestätigt wurde. Es fällt auf, dass SCh als alleinige Triggersubstanz nur in zwei Fällen (1 %) dokumentiert wurde (1 MHS, 1 MHEc). Dies deckt sich mit den Literaturbefunden (Klingler et al. 2005b). Bei entsprechenden Fallberichten in der Literatur fehlt meistens die bioptische Diagnosesicherung (Pulnitiporn et al. 2005). Es ist nicht sicher, ob diese Fälle tatsächlich durch SCh ausgelöst wurden, oder ob es sich um spontane MH-Episoden handelte, die durch SCh verstärkt wurden. Die beiden Fälle dieser Studie belegten einen vergleichsweise niedrigen MH-Rang in der CGS (15 und 25 Punkte). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass der molekulare Mechanismus, durch den SCh eine MH-Episode auslöst, ein niedrigeres Triggerpotential besitzt im Vergleich zu volatilen Anästhetika. Der Schweregrad der klinischen MH-Episoden wurde mittels CGS gemessen und war in dieser Studie nicht abhängig von der Verwendung von SCh. Da SCh in Kombination mit volatilen Anästhetika allerdings in über 80 % der Fälle zur Anwendung kam, bestätigt diese Studie die Vorstellung, dass SCh das Auftreten einer MH-Reaktion auf volatile Anästhetika begünstigt: möglicherweise reagieren ein Teil der MH prädisponierten Individuen nur dann mit einer akuten MH-Episode, wenn sie beide Triggersubstanzklassen erhalten. Betrachtet man SCh als Kofaktor der MH-Reaktion anstelle seiner Klassifikation als Triggersubstanz, so erklärt dies sowohl die klinische Beobachtung (Larach et al. 2010) als auch die Ergebnisse der in vitro Studien, in denen SCh in Abwesenheit anderer Triggersubstanzen keine pathologischen Kontrakturen im IVCT auslöst, jedoch Halothan- und Koffeinkontrakturen zu verstärken vermag, sowie die Ergebnisse des minimalinvasivem metabolischen Tests (Metterlein et al. 2011).

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen SCh und der MH lieferten Britt et al. 1970 in einem Übersichtsartikel. Es wurde unter anderem festgestellt, dass die Überle-

benschancen einer MH-Krise geringer waren, wenn die Patienten neben Halothan auch SCh erhalten hatten. Durch einen in IVCT konnte Ellis et al. 1972 in vitro zeigen, dass die Muskelbündel einiger MH-Familien nach der alleinigen Zugabe von Halothan keine Kontrakturen auslösten, jedoch in der Kombination mit SCh. Muskelproben anderer MH-Familien kontrahierten bereits bei Halothan allein, jedoch konnte bei keiner Muskelprobe SCh alleine eine pathologische Kontraktur auslösen. Der IVCT als Methode für die Evaluierung der Triggerpotenz des SCh ist jedoch limitiert, da die intakte neuromuskuläre Endplatte und eine direkte Interaktion koherenter Muskelzellen fehlen, und damit auch der biologische Hauptwirkungsort des SCh. Nachdem der RyR1 als Schlüsselrolle der MH beschrieben wurde (McCarthy et al. 1990, MacLennan et al. 1990), konnte nachgewiesen werden, dass SCh im Gegensatz zu volatilen Anästhetika keine RyR1 vermittelte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR induziert (Klingler et al. 2005 a). Der minimalinvasive metabolische Test, in dem durch Microdialysekatheter die lokale Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) und andere metabolische Veränderungen nach intramuskulärer Injektion von Triggersubstanzen gemessen werden, wird als in vivo MH-Model genutzt (Anetseder et al. 2002, Metterlein et al. 2010). Mit dieser Methode konnte jedoch in MHS Pietrainschweinen durch SCh kein gesteigerter Metabolismus erzeugt werden (Metterlein et al. 2011). Klinisch konnte im Schweinemodell der MH zunächst ebenfalls keine Krise durch SCh alleine ausgelöst werden (Hall et al. 1972, Nelson et al. 1973).

Bei einer Analyse der Daten aus dem North American MH Register (Verdachtsfälle ohne Diagnosesicherung) der Jahre 1987 bis 2006 fällt auf, dass aus den insgesamt 287 ausgewerteten Krisen lediglich in zwei Fällen SCh als alleiniger Trigger gegeben wurde (Larach et al. 2010). Volatiler Anästhetika und SCh in Kombination potenzieren die MH-Symptome: Zum einen erhöht sich die maximale Konzentration der CK-Werte (Antognini 1995) und zum anderen verkürzt sich die Zeit bis zum Beginn der klinischen Symptome (Pollock et al. 2002).

4.2. Triggerpotential volatiler Anästhetika

Unter den Inhalationsanästhetika löste in dieser Studie das in Europa inzwischen nicht mehr verwendete Enfluran die schwersten klinischen Krisen aus. Die Inzidenz dokumentierter und diagnostizierter MH-Krisen erreichte ihren Höhepunkt Mitte der 1990er Jahre, es kann jedoch keine Entwarnung gegeben werden, da auch mit modernen Narkosemit-

teln (Desfluran, Sevofluran) bis zum Ende der 2000er Jahre weiterhin schwere MH-Episoden auftraten. Die Stärke dieser Multicenter-Studie liegt in den Einschlusskriterien und der Größe des Patientenkollektivs (n = 200): Nur durch IVCT bestätigte (MHS, n = 165) oder als mehrdeutig (MHE, n = 35) eingestufte Patienten wurden in die Studie eingeschlossen. Das Triggerpotential wurde durch Bestimmung der CGS gemessen und verglichen: Hierbei zeigte Enfluran signifikant stärker Krisen im Vergleich zu Halothan, Isofluran und Sevofluran. Auch Desfluran hatte im Mittelwert geringere CGS Punktwerte, jedoch war die Gruppe zu klein für eine statistisch sinnvolle Auswertung (n = 4). Zwischen Halothan, Isofluran und Sevofluran konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, so dass diese Studie die Ergebnisse von Migita et al. 2011 bestätigt. Alle Narkosegase zeigen jedoch sowohl schwere als auch leichte Verläufe, so dass sie für Individuen mit Prädisposition zur MH weiterhin absolut kontraindiziert bleiben.

Das Triggerpotential volatiler Anästhetika war in der Literatur bereits häufig Gegenstand klinischer und experimenteller Studien (vgl. Tabelle 1). Allerdings sind die Ergebnisse keineswegs uniform: Zwar wird in den meisten Studien Halothan als der stärkste Trigger angegeben (Reed u. Strobel 1978, Brit et al. 1980, Matsui et al. 1991, Wedel et al. 1993, Kunst et al. 1999), jedoch fällt auf, dass vor allem in größeren klinischen Studien die Ergebnisse weniger eindeutig waren: Entweder konnte kein Unterschied in der Triggerpotenz von Halothan und Desfluran (Allen et al. 1998), oder zwischen Halothan und Isofluran (Hopkins 2011) festgestellt werden. Die Ergebnisse unterscheiden sich noch stärker bezüglich der schwächsten Triggersubstanz: Je nach Methode wird hier Isofluran (Reed u. Strobel 1978, Allen et al. 1998), Desfluran (Wedel et al. 1993), Enfluran (Britt et al. 1980), oder Sevofluran (Matsui et al. 1991, Kunst et al. 1999, Hopkins 2011) angegeben. In einer großen (n = 147) klinischen Studie zeigten Sevofluran und Isofluran keine unterschiedliche Triggerpotenz (Migita et al. 2011).

4.3. Patientenseitige Risikofaktoren

4.3.1. Lebensalter und Geschlecht

Da etwa 50 % der Patienten dieser Studie zum Zeitpunkt der klinischen MH-Episode noch im Kindesalter waren, kann vermutet werden, dass Kinder besondere Risikofaktoren zum Auslösen von MH Krisen besitzen. Die Muskeln der Kinder sind noch in der Entwicklung, so dass die Muskelphysiologie nicht identisch zum adulten Muskel ist. So wird zum Bei-

spiel der Ryanodinrezeptor Typ 3 (RyR3) bei Kindern in einer höheren Dichte exprimiert als im adulten Muskel (Dietze et al. 1998). Zwar spielt der RyR3 bei der übermäßigen Ca^{2+}-Ausschüttung offensichtlich keine Rolle, allerdings wurde dies nur im in vitro Model untersucht (Dietze et al. 1998). Weitere Möglichkeiten betreffen die hormonelle Situation von Kindern, die generell einen höheren skelettmuskulären Grundumsatz haben, was sich auch an höheren Referenzwerten für das Serum CK zeigt und möglicherweise mit der Regulation der Schilddrüse und die Geschlechtshormone zusammenhängt.

Obwohl die Prädisposition zur MH autosomal dominant vererbt wird, unterscheidet sich die Wahrscheinlichkeit tatsächlich eine MH-Krise zu entwickeln zwischen Männern und Frauen erheblich, was wiederum auf einen hormonellen Einfluss schließen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass die IVCT Ergebnisse ebenfalls geschlechtsabhängig sind (Islander et al. 2007). Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen dies: 70 % der Patienten dieser Studie sind männlich.

4.3.2. RYR1 und CACNA1S Mutationen

Die mit Abstand häufigste detektierte Mutation des RYR1 war p.R614C (n = 25). Es folgten p.T2206M (n = 9), p.V2168M (n = 6) und p.G2434R (n = 5). Die Unterschiede in der CGS sowie im IVCT zwischen diesen Mutationen waren nicht signifikant. Die anderen Mutationen wurden jeweils bei 1 bis 4 Patienten nachgewiesen, so dass die statistische Untersuchung nicht sinnvoll war. In einer Literaturrecherche zeigte sich, dass bereits über 300 Varianten des RyR1 veröffentlicht wurden. Die meisten Varianten sind mit der MH assoziiert. In dieser Studie wurden 13 weitere Varianten neu beschrieben. Die MH ist daher genetisch sowie klinisch ein äußerst heterogenes Krankheitsbild, was sich auch klinisch in den vielseitigen Verlaufsformen akuter Krisen zeigt. Bestimmte RyR1 Mutation lösen stärkere IVCT Kontrakturen als andere, woraus die Hypothese resultiert, dass der Phänotyp der MH stark von der spezifischen RyR1 Mutation abhängig ist (Carpenter et al. 2009). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der Mutation innerhalb des Proteins einen deutlichen Einfluss auf die CGS und auf den IVCT hat. Die Hypothese von Carpenter et al. 2009 konnte somit bestätigt und erweitert werden: Verschiedene Regionen des RyR1 können im Falle einer Veränderung des Proteins durch Mutationen zu unterschiedlich schweren klinischen Ausprägungen der MH führen. Hierbei ist das Risiko zur

Entwicklung besonders schwerer klinischer Krisen erhöht, wenn der Defekt innerhalb der sogenannten MH/CCD Regionen liegt.

Insgesamt konnte für 31 verschiedene RyR1 Mutationen der kausale Zusammenhang zur MH nachgewiesen werden (siehe 1.3.1). Diese kausalen Mutationen verursachten signifikant stärkere klinische Krisen und stärkere Antworten im IVCT verglichen mit Wildtyp RyR1 und Mutationen unbekannter Kausalität. Letztere unterschieden sich lediglich in der Koffeinkontraktur von Patienten ohne RyR1 Mutation. In der CGS, den Halothankontrakturen und den Koffein- und Halothanschwellenwerten konnte kein Unterschied gemessen werden. Hieraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass Mutationen unbekannter Kausalität zu einem schwachen MH Phänotyp führen, der etwa vergleichbar ist mit Patienten, bei denen die Ursache zur MH nicht im RyR1 liegt. Es kann jedoch vermutet werden, dass der Einfluss auf den Phänotyp zunimmt, wenn zwei dieser niedrig potenten RYR1 Mutationen im Gen eines Patienten zu finden sind.

4.4. Variabilität klinscher Ereignisse

Die Studie unterliegt einem Selektionsbias, da nur diejenigen Krisen ausgewertet wurden, in denen die Verdachtsdiagnose der MH gestellt wurde, den Testzentren gemeldet wurden und die Patienten anschließend einer Muskelbiopsie zur Diagnosesicherung zugestimmt haben.

Die Clinical Grading Scale nach Larach et al. 1994 wird weit verbreitet genutzt um festzustellen, ob eine klinische Krise vorliegt, sowie um den Schweregrad der Krise zu charakterisieren. Jedoch hat die Skala natürliche Limitierungen, die sich vor allem bei lang zurückliegenden Krisen zeigen: Wenn ein Symptom oder ein Wert nicht dokumentiert wurde (z.B. aus historischen Gründen), so werden die entsprechenden Punkte nicht von der CGS erfasst und die Krise wird damit mit einem falsch niedrigen MH-Rang bewertet. Da die CGS der eingeschlossenen Krisen jedoch über die Jahre hinweg keinem Abwärts-, oder Aufwärtstrend unterliegt kann vermutet werden, dass dieser Fehler die Krisen aller Jahre im gleichen Ausmaß betrifft. Die CGS ist weiterhin abhängig vom frühzeitigen Erkennen und der Therapie mit Dantrolen, da potentiell lebensgefährliche Stoffwechselkrisen so durchbrochen und abgemildert werden können (Harrison 1975). Auch hier kann vermutet werden, dass dieser Fehler die Datensätze gleichermaßen betrifft. Als Qualitätskon-

trolle für die CGS zeigt sich, dass Patienten mit hohen CGS Punktwerten auch signifikant stärkere Antworten im IVCT erzeugten als Patienten mit niedrigen CGS Punktwerten.
Das Protokoll für die Durchführung des IVCT wurde durch die EMHG über die Jahre hinweg leicht modifiziert, zuletzt 1997 (Ørding et al. 1997). Es kann daher nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich hieraus leichte Abweichungen ergeben haben.

5. Zusammenfassung

Bei der Malignen Hyperthermie (MH) handelt es sich um eine seltene pharmakogenetische Stoffwechselstörung. Die pathophysiologische Grundlage der klassischen MH ist die Ryanodinrezeptor Typ 1 (RyR1) vermittelte exzessive Ca^{2+}-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischem Retikulum (SR) der Muskelzellen. Volatile Anästhetika sind potente RyR1-Agonisten und bekannte Triggersubstanzen der MH. Im Gegensatz dazu hat Succinylcholin (SCh) keinen RyR1-agonistischen Effekt. Trotzdem werden in der Fachliteratur volatile Anästhetika und SCh gleichermaßen als MH-Trigger beschrieben. Fallberichte von rein SCh vermittelten und diagnostisch gesicherten MH-Krisen fehlen und auch die in vitro und in vivo Datenlage ist inkonsistent.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Multicenter-Studie mit 7 europäischen MH-Testzentren, welche die relative MH-Triggerpotenz von SCh und volatilen Anästhetika sowie patientenseitige Risikofaktoren evaluiert. 200 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien: Klinische Stoffwechselkrise während Allgemeinanästhesie, welche anhand einer Muskelbiopsie (in vitro Kontrakturtest; IVCT) diagnostisch gesichert wurde. Folgende Datensätze wurden für jeden Patienten eingeholt: Alter, Geschlecht, Clinical Grading Scale (CGS), verwendete Triggersubstanzen, Mutationen des RYR1 oder CACNA1S (kodiert für die α1-Untereinheit des $Ca_V1.1$), Kontrakturen und Schwellenwerte des nach Standard der European Malignant Hyperthermia Group durchgeführten IVCT.

70 % der Patienten waren männlich und 50 % der Patienten waren zum Zeitpunkt der MH-Krise im Kindesalter (≤ 12 Jahre). Diese klinische Beobachtung deutet darauf hin, dass die Entwicklung akuter MH Krisen durch das männliche Geschlecht und ein junges Lebensalter begünstigt wird. Die CGS unterlag über die Jahrzehnte hinweg (1972-2010) nur geringen Schwankungen und zeigte sich konsistent zum IVCT. Patienten mit hohen CGS Punktergebnissen entwickelten starke Kontrakturen und niedrige Schwellenwerte im IVCT. 103 Patienten (52,6 %) dieser Studie konnten RyR1 Varianten nachgewiesen werden, 13 Mutationen wurden in dieser Studie erstmals beschrieben. Ein Patient zeigte eine CACNA1S Mutation. Es zeigte sich, Patienten mit RyR1 Mutationen innerhalb der MH/CCD Regionen sowohl klinisch (CGS) als auch im IVCT stärker reagierten, als Patienten mit RyR1 Mutationen unbekannter Kausalität und Patienten ohne RyR1 Mutationen.

In 81 % der Fälle (n = 162) wurden sowohl volatile Anästhetika als auch SCh dokumentiert, nur in 18 % der Fälle (n = 36) volatile Anästhetika alleine. Im Vergleich der Narkosegase

zeigte sich für Enfluran (n = 17) eine signifikant höhere CGS. Krisen, die durch Halothan (n = 104), Isofluran (n =51), Sevofluran (n = 22) und Desfluran (n = 4) ausgelöst wurden, zeigten keine relevanten Unterschiede bezüglich der CGS. SCh triggerte in Abwesenheit volatiler Anästhetika nur eine klinische Krise bei einem Patienten mit mehrdeutigem IVCT sowie bei einem Patienten mit eindeutig positivem IVCT. Hierbei handelte es sich um einen 13-jährigen Jungen mit kausaler RyR1 Mutation (p.R614C, MH/CCD Region 2).

Zusammenfassend zeigen die klinischen Daten, dass SCh als Verstärker eines pathologischen Ca^{2+}-Umsatzes die Entwicklung einer akuten MH-Krise fördert. SCh ist ein Agonist des nikotinischen Acetylcholinrezeptor, der als unspezifischer Kationen-Kanal auch den Ca^{2+}-Einstrom vom Extrazellulärraum verursacht. Ebenso aktiviert SCh indirekt den spannungssensitiven L-Typ Ca^{2+}-Kanals ($Ca_V1.1$), der durch direkte Interaktion mit dem RyR1 die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR einleitet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass die MH ein multifaktorielles Geschehen darstellt. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer klinischen MH-Krise hängt vom Vorhandensein und der Lokalisation einer Mutation im RyR1-Gen, vom Lebensalter und Geschlecht des Patienten ab und ist vor allem bei der Kombination volatiler Anästhetika mit SCh erhöht.

6. Literaturverzeichnis

1. Allen GC, Brubaker CL. Human malignant hyperthermia associated with desflurane anesthesia. *Anesth Analg* 86: 1328-31 (1998)
2. Allman KG, Wilson IH: Malignant Hyperthermia, In: *Oxford Handbook of Anaesthesia,* Oxford University Press, New York, 3. Auflage, Kapitel 11: S.270-275 (2011)
3. Anetseder M, Ritter L, Horbaschek H, Hartung E, Roewer N: The impact of 4-chloro-m-cresol in heparin formulas on malignant hyperthermia: in vitro and in vivo. *Acta Anaesthesiol Scand*. 44: 338-42 (2000)
4. Anetseder M, Hager M, Müller Cl, Roewer N: Diagnosis of susceptibility to malignant hyperthermia by use of a metabolic test. *Lancet* 359: 1579-1580 (2002)
2. Antognini JF: Creatine kinase alterations after acute malignant hyperthermia episodes and common surgical procedures. *Anesth Analg* 81: 1039-42 (1995)
3. 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*. 121: 277-86 (2003)
4. Baur CP, Bellon L, Felleiter P, Fricker R, Glahn K, J. Heffron JJA, Herrmann-Frank A, Jurkat- Rott K, Klingler W, Lehane M, Ørding H, Tegazzin V, Wappler F, Georgieff M, Lehmann-Horn F: A multicenter study of chlorocresol for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. *Anesth Analg* 90: 200-205 (2000)
5. Baur CP, Klingler W, Jurkat-Rott K, Froeba G, Schoch E, Marx T, Georieff M, Lehmann-Horn F: Xenon does not induce contracture in human malignant hyperthermia muscle. *Br J Anaesth* 85: 712-716 (2000)
6. Barone V, Massa O, Intravaia E, Bracco A, Di Martino A, Tegazzin V, Cozzolino S, Sorrentino V: Mutation screening of the RYR1 gene and identification of two novel mutations in Italian malignant hyperthermia families. *J Med Genet* 36: 115-118 (1999)
7. Britt BA, Kalow W: Malignant hyperthermia: a statistical review. *Can Anaesth Soc J* 17: 293-315 (1970)
8. Britt BA, Endrenyi L, Frodis W, Scott E, Kalow W: Comparison of effects of several inhalation anaesthetics on caffeine-induced contractures of normal and malignant hyperthermic skeletal muscle. *Can Anaesth Soc J.* 27: 12-5 (1980)

9. Carpenter D, Robinson RL, Quinnell RJ, Ringrose C, Hogg M, Casson F, Booms P, Iles DE, Halsall PJ, Steele DS, Shaw MA, Hopkins PM: Genetic variation in RYR1 and malignant hyperthermia phenotypes. *Br J Anaesth* 103: 538-48 (2009)

10. Chamley D, Pollock NA, Stowell KM, Brown RL: Malignant hyperthermia in infancy and identification of novel RYR1 mutation. *Br J Anaesth* 84: 500-504 (2000)

11. Clarke NF, Waddell LB, Cooper ST, Perry M, Smith RL, Kornberg AJ, Muntoni F, Lillis S, Straub V, Bushby K, Guglieri M, King MD, Farrell MA, Marty I, Lunardi J, Monnier N, North KN: Recessive mutations in RYR1 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Hum Mutat* 31: E1544-50 (2010)

12. Davis MM, Brown R, Dickson A, Horton H, James D, Laing NG, MarstonR, Norgate M, Perlman D, Pollock N, Stowell K: Malignant hyperthermia associated with exercise-induced rhabdomyolysis or congenital abnormalities and a novel RyR1 mutation in New Zealand and Australian pedigrees. *Br J Anaesth* 88:508-515 (2002)

13. Dekomien G, Gencik M, Gencikova A, Klenk Y, Epplen JT: Gene symbol: RYR1. Disease: malignant hyperthermia. *Hum Genet* 118: 541-2 (2005)

14. Denborough MA, Forster JF, Lovell RR, Maplestone PA, Villiers JD: Anaesthetic deaths in a family. *Br J Anaesth* 34: 395-6 (1962)

15. Denborough MA: Malignant hyperthermia. *Lancet* 352: 1131-1136 (1998)

16. Dietze B, Bertocchini F, Barone V, Struk A, Sorrentino V, Melzer W: Voltage-controlled Ca2+ release in normal and ryanodine receptor type 3 (RyR3)-deficient mouse myotubes. *J Physiol* 15; 513 (1998)

17. Ellis FR, Harriman DG, Keaney NP, Kyei-Mensah K, Tyrrell JH: Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth* 43: 721-722 (1971)

18. Ellis FR, Keaney NP, Harriman DG, Sumner DW, Kyei-Mensah K, Tyrrell JH, Hargreaves JB, Parikh RK, Mulrooney PL: Screening for malignant hyperpyrexia. *Br Med J*. 3: 559-61 (1972)

19. Fleischer S, Ogunbunni EM, Dixon MC, Fleer EA: Localization of Ca^{2+} release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7256-7259 (1985)

20. Fruen BE, Mickelson JR, Louis CF: Dantrolene inhibition of sarcoplasmatic Ca2+ release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. *J Biol Chem* 272: 26965-26971 (1997)

21. Galli L, Orrico A, Cozzolino S, Pietrini V, Tegazzin V, Sorrentino V: Mutations in the RYR1 gene in Italian patients at risk for malignant hyperthermia: evidence for a cluster of novel mutations in the C-terminal region. *Cell Calcium* 32: 143-51 (2002)

22. 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* 27: 830 (2006)

23. Gillard EF, Otsu K, Fujii J, Khanna VK, de Leon S, Derdemezi J, Britt BA, Duff CL, Worton RG, MacLennan DH: A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics.* 11:751-5 (1991)

24. Gronert GA, Thompson RL, Onofrio BM: Human malignant hyperthermia: awake episodes and correction by dantrolene. *Anesth Analg* 59: 377-8 (1980)

25. Groom L, Muldoon SM, Tang ZZ, Brandom BW, Bayarsaikhan M, Bina S, Lee HS, Qiu X, Sambuughin N, Dirksen RT: Identical de novo mutation in the type 1 ryanodine receptor gene associated with fatal, stress-induced malignant hyperthermia in two unrelated families. *Anesthesiology* 115: 938-45 (2011)

26. Gullo A, Mocavero G, Romano E, Del Prete D, Silvestri L: L'ipertermia maligna. Rassegna della letteratura e contributo clinico. *Minerva Anestesiol* 45: 961-80 (1979)

27. Hall LW, Woolf N, Bradley JW, Jolly DW: Unusual reaction to suxamethonium chloride. *Br Med J.* 2: 1305 (1966)

28. Hall LW, Trim CM, Woolf N: Further studies of porcine malignant hyperthermia. *Br Med J.* 2: 145-8 (1972)

29. Harrison GG: Control of the malignant hyperpyrexic syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. *Br J Anaesth* 47: 62-5 (1975)

30. Herrmann-Frank A, Richter M, Sarközi S, Mohr U, Lehmann-Horn F: 4-Chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1289: 31-40 (1996)

31. Herrmann-Frank A, Lüttgau HCh, Stephenson DG: Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: a stimulating story. *J Muscle Res Cell Motil* 20: 223-237 (1999)

32. Hopkins PM: Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis. *Br J Anaesth* 85: 118-128 (2000)

33. Hopkins PM: Malignant hyperthermia: pharmacology of triggering. *Br J Anaesth* 107: 48-56 (2011)

34. Islander G, Rydenfelt K, Ranklev E, Bodelsson M: Male preponderance of patients testing positive for malignant hyperthermia susceptibility. *Acta Anaesthesiol Scand* 51: 614-20 (2007)

35. Jungbluth H, Müller CR, Halliger-Keller B, Brockington M, Brown SC, Feng L, Chattopadhyay A, Mercuri E, Manzur AY, Ferreiro A, Laing NG, Davis MR, Roper HP, Dubowitz V, Bydder G, Sewry CA, Muntoni F: Autosomal recessive inheritance of RYR1 mutations in a congenital myopathy with cores. *Neurology.* 59:284-7 (2002)

36. Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Elbaz A, Heine R, Gregg RG, Hogan K, Powers PA, Lapie P, Vale-Santos JE, Weissenbach J: A calcium channel mutation causing hypokalemic periodic paralysis. *Hum Mol Genet.* 3:1415-1419 (1994)

37. Jurkat-Rott K, McCarthy TV, Lehmann-Horn F: Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 23: 4-17 (2001)

38. Karanović N, Carev M, Kardum G, Tomanović N, Stuth E, Gal J, Tonković-Capin M, Dogas V, Racić G, Dogas Z: Succinylcholine use in adult anesthesia – A multinational questionnaire survey. Collegium antropologicum 35 Suppl 1:183-90 (2011)

39. Keating KE, Quane KA, Manning BM, Lehane M, Hartung E, Censier K, Urwyler A, Klausnitzer M, Muller CR, Heffron JJ: Detection of a novel RYR1 mutation in four malignant hyperthermia pedigrees. *Hum Mol Genet.* 3:1855-1858 (1994)

40. Klingler W, Heffron JJ, Jurkat-Rott K, O'sullivan G, Alt A, Schlesinger F, Bufler J, Lehmann-Horn F. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) activates skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 314: 1267-73 (2005)

41. Klingler W, Lehmann-Horn F, Jurkat-Rott K. Complications of anaesthesia in neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord.* 15: 195-206 (2005)

42. Kraeva N, Riazi S, Loke J, Frodis W, Crossan ML, Nolan K, Kraev A, Maclennan DH: Ryanodine receptor type 1 gene mutations found in the Canadian malignant hyperthermia population. *Can J Anaesth* 58: 504-13 (2011)

43. Kung AW, Lau KS, Fong GC, Chan V: Association of novel single nucleotide polymorphisms in the calcium channel alpha 1 subunit gene (Ca(v)1.1) and thyrotoxic periodic paralysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 89: 1340-5 (2004)

44. Kunst G, Graf BM, Schreiner R, Martin E, Fink RH: Differential effects of sevoflurane, isoflurane, and halothane on Ca2+ release from the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Anesthesiology* 91: 179-86 (1999)

45. Larach MG, Localio AR, Allen GC, Denborough MA, Ellis FR, Gronert GA, Kaplan RF, Muldoon SM, Nelson TE, Ørding H, Rosenberg H, Waud BE, Wedel DJ: A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 80: 771–9 (1994)

46. Larach MG, Gronert GA, Allen GC, Brandom BW, Lehman EB: Clinical presentation, treatment, and complications of malignant hyperthermia in North America from 1987 to 2006. *Anesth Analg* 110: 498-507 (2010)

47. Lehmann-Horn F, Klingler W, Jurkat-Rott K: Nonanesthetic malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 115:915-7 (2011)

48. Levano S, Vukcevic M, Singer M, Matter A, Treves S, Urwyler A, Girard T: Increasing the number of diagnostic mutations in malignant hyperthermia. *Hum Mutat.* 30: 590-8 (2009)

49. Li FF, Li QQ, Tan ZX, Zhang SY, Liu J, Zhao EY, Yu GC, Zhou J, Zhang LM, Liu SL: A novel mutation in CACNA1S gene associated with hypokalemic periodic paralysis which has a gender difference in the penetrance. *J Mol Neurosci*. 46: 378-83 (2012)

50. Loke J, MacLennan DH: Malignant hyperthermia and central core disease: disorders of Ca2+ release channels. *Am J Med* 104: 470-486 (1998)

51. MacLennan DH and Phillips MS: Malignant hyperthermia. *Science* 256: 789 794 (1992)

52. MacLennan DH, Duff C, Zorzato F, Fujii J, Phillips M, Korneluk RG, Frodis W, Britt BA, Worton RG: Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 343: 559-561 (1990)

53. McCarthy TV, Healy JM, Heffron JJ, Lehane M, Deufel T, Lehmann-Horn F, Farrall M, Johnson K. Localization of the malignant hyperthermia susceptibilty locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* 343: 562-564 (1990)

54. Manning BM, Quane KA, Ørding H, Urwyler A, Tegazzin V, Lehane M, O'Halloran J, Hartung E, Giblin LM, Lynch PJ, Vaughan P, Censier K, Bendixen D, Comi G, Heytens L, Monsieurs K, Fagerlund T, Wolz W, Heffron JJ, Muller CR, McCarthy TV: Identifi-

cation of novel mutations in the ryanodine-receptor gene (RYR1) in malignant hyperthermia: genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 62: 599-609 (1998)

55. Manning BM, Quane KA, Lynch PJ, Urwyler A, Tegazzin V, Krivosic-Horber R, Censier K, Comi G, Adnet P, Wolz W, Lunardi J, Muller CR, McCarthy TV. Novel mutations at a CpG dinucleotide in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *Hum Mutat* 11: 45-50 (1998)

56. Marchant CL, Ellis FR, Halsall PJ, Hopkins PM, Robinson RL: Mutation analysis of two patients with hypokalemic periodic paralysis and suspected malignant hyperthermia. *Muscle Nerve.* 30: 114-7 (2004)

57. Matsui K, Fujioka Y, Kikuchi H, Yuge O, Fujii K, Morio M, Endo M: Effects of several volatile anesthetics on the Ca(2+)-related functions of skinned skeletal muscle fibers from the guinea pig. *Hiroshima J Med Sci* 40: 9-13 (1991)

58. Matthews E, Labrum R, Sweeney MG, Sud R, Haworth A, Chinnery PF, Meola G, Schorge S, Kullmann DM, Davis MB, Hanna MG: Voltage sensor charge loss accounts for most cases of hypokalemic periodic paralysis. *Neurology*. 72: 1544-7 (2009)

59. Meissner G, Lu X: Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor interactions in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Biosci Rep.* 15: 399-408 (1995)

60. Melzer W, Dietze B: Malignant hyperthermia and excitation-contraction coupling. *Acta Physiol Scand* 171: 367-378 (2001)

61. Metterlein T, Schuster F, Kranke P, Roewer N, Anetseder M: Intramuscular injection of malignant hyperthermia trigger agents induces hypermetabolism in susceptible and nonsusceptible individuals. *Eur J Anaesthesiol* 27: 77-82 (2010)

62. Metterlein T, Schuster F, Palmer E, Roewer N, Anetseder M: Succinylcholine in malignant hyperthermia: evaluation of a novel in vivo model. *Muscle Nerve* 44: 213-6 (2011)

63. Mickelson JR, Louis CF: Malignant Hyperthermia: Excitation-Contraction Coupling, Ca^{2+} Release Channel, and Cell Ca^{2+} Regulation Defects. *Physiol Rev* 76: 537-591 (1996)

64. Migita T, Mukaida K, Kobayashi M, Hamada H, Kawamoto M: The severity of-sevoflurane-induced malignant hyperthermia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 56: 351-6 (2012)

65. 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* 60: 1316-1325 (1997)

66. 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.* 26: 413-25 (2005)

67. Monnier N, Marty I, Faure J, Castiglioni C, Desnuelle C, Sacconi S, Estournet B, Ferreiro A, Romero N, Laquerriere A, Lazaro L, Martin JJ, Morava E, Rossi A, Van der Kooi A, de Visser M, Verschuuren C, Lunardi J: Null mutations causing depletion of the type 1 ryanodine receptor (RYR1) are commonly associated with recessive structural congenital myopathies with cores. *Hum Mutat.* 29: 670-8 (2008)

68. Nelson TE, Jones EW, Bedell DM: Porcine malignant hyperthermia: a study on the triggering effects of succinylcholine. *Anesth Analg* 52: 908-11 (1973)

69. Olthoff D, Vonderlind C: Anästhesie-unabhängige Auslösung einer tödlichen Maligne Hyperthermie-Krise. *Anaesthesist*. 46: 1076-80 (1997)

70. Ørding H, Glahn K, Gardi T, Fagerlund TH, Bendixen D: 4-chloro-m-cresol test - a possible supplementary test for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. *Acta Anaesthesiol Scandinavica* 41: 967-972 (1997)

131. Ørding H, Glahn K, Gardi T, Fagerlund TH, Bendixen D: In vitro contracture test for 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 Anaesthesiologica Scadinavica 41*:* 955-963 (1997)

71. Pollock AN, Langton EE, Couchman K, Stowell KM, Waddington M: Suspected malignant hyperthermia reactions in New Zealand. *Anaesth Intensive* 30: 453-61 (2002)

72. Proenza C, O'Brien J, Nakai J, Mukherjee S, Allen PD, Beam KG: Identification of a region of RyR1 that participates in allosteric coupling with the alpha(1S) (Ca(V)1.1) II-III loop. *J Biol Chem.* 277: 6530-5 (2002)

73. Ptácek LJ, Tawil R, Griggs RC, Engel AG, Layzer RB, Kwieciński H, McManis PG, Santiago L, Moore M, Fouad G, Bradley P, Lepper MF: Dihydropyridine receptor mutations causehypokalemic periodic paralysis. *Cell.* 77: 863-868 (1994)

74. Pulnitiporn A, Charuluxananan S, Inphum P, Kitsampanwong W: Malignant hyperthermia: a case report in Thai Anesthesia Incidents Study (THAI Study). *J Med Assoc Thai.* 88: S149-52 (2005)

75. Quane KA, Keating KE, Manning BM, Healy JM, Monsieurs K, Heffron JJ, Lehane M, Heytens L, Krivosic-Horber R, Adnet P, Ellis F R, Monnier N, Lunardi J, McCarthy TV: Detection of a novel common mutation in the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia: implications for diagnosis and heterogeneity studies. *Hum Mol Genet* 3: 471-6 (1994)

76. Quane KA, Ørding H, Keating KE, Manning BM, Heine R, Bendixen D, Berg K, Krivosic-Horber R, Lehmann-Horn F, Fagerlund T, McCarthy TV: Detection of a novel mutation at amino acid position 614 in the ryanodine receptor in malignant hyperthermia*. Br J Anaesth*. 79: 332-7 (1997)

77. Reed SB, Strobel GE Jr: An in-vitro model of malignant hyperthermia: differential effects of inhalation anesthetics on caffeine-induced muscle contractures. *Anesthesiology* 48: 254-9 (1978)

78. Robinson R, Carpenter D, Shaw MA, Halsall J, Hopkins P: Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat.* 27: 977-89 (2006)

79. Rüffert H, Kraus H, Olthoff D, Deutrich C, Froster UG: Identification of a novel mutation in the ryanodine receptor gene (RYR1) in patients with malignant hyperthermia. *Hum Mutat* 17: 238 (2001)

80. Rüffert H, Olthoff D, Deutrich C, Froster UG: Aktuelle Aspekte der Diagnostik der malignen Hyperthermie. *Anaesthesist* 51: 904-13 (2002)

81. Rüffert H, Olthoff D, Deutrich C, Meinecke CD, and Froster U: 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* 46: 692-698 (2002)

82. Rüffert, H: Advances in the Pre-Clinical diagnosis of Malignant Hyperthermia, In: Marlene A, Horry PP. (Hrsg) *Progress in medical genetics*, Nova Science Publishers Inc., New York, S. 65-83 (2006)

83. Sambuughin,N., Nelson,T.E., Jankovic,J., Xin,C., Meissner,G., Mullakandov,M., Ji,J., Rosenberg,H., Sivakumar,K., Goldfarb,L.G: Identification and functional characterization of a novel ryanodine receptor mutation causing malignant hyperthermia in North American and South American families. *Neuromuscul. Disord.* 11: 530-537 (2001)

84. Sambuughin N, Sei Y, Gallagher KL, Wyre HW, Madsen D, Nelson TE, Fletcher JE, Rosenberg H, Muldoon SM: North american malignant hyperthermia population. *Anesthesiology* 95: 594-599 (2001)

85. 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* 102: 515-21 (2005)

86. Shulman M, Braverman B, Ivankovich AD, Gronert G: Sevoflurane triggers malignant hyperthermia in swine. *Anesthesiology* 54:259-260 (1981)

87. Steinfath M, Wappler F, Scholz J: Maligne Hyperthermie. Allgemeine, klinische und experimentelle Aspekte. *Anaesthesist* 51: 328-347 (2002)

88. 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.* 49: 761-8 (2003)

89. Toppin PJ, Chandy TT, Ghanekar A, Kraeva N, Beattie WS, Riazi S: A report of fulminant malignant hyperthermia in a patient with a novel mutation of the CACNA1S gene. *Can J Anaesth.* 57: 689-93 (2010)

90. Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S: Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to Malignant Hyperthermia. *Br J Anaesth* 86: 283-287 *(*2001)

91. Vukcevic M, Broman M, Islander G, Bodelsson M, Ranklev-Twetman E, Müller CR, Treves S: Functional properties of RYR1 mutations identified in Swedish patients with malignant hyperthermia and central core disease. *Anesth Analg* 111: 185-90 (2010)

92. Wappler F, Scholz J, von Richthofen V, Fiege M, Steinfath M, Schulte am Esch J: 4-Chloro-m-Cresol induziert Kontrakturen an Skelettmuskelpräparaten von Patien-

ten mit Disposition zu maligner Hyperthermie. *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 32: 541-8 (1997)

93. Wappler F, Scholz J, Fliege M, Kolodzie K, Kudlik C, Weißhorn R, Schulte am Esch J: 4-Chloro-m-cresol is a trigger of malignant hyperthermia in susceptible Swine. *Anesthesiology* 90: 1733-1740 (1999)

94. Wappler F: Malignant hyperthermia. *Eur J Anaesthesiol* 18: 632-652 (2001)

95. Wedel DJ, Gammel SA, Milde JH, Iaizzo PA : Delayed onset of malignant hyperthermia induced by isoflurane and desflurane compared with halothane in susceptible swine. *Anesthesiology* 78: 1138-44 (1993)

96. 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.* 62: 135-46 (2002)

97. Zhao F, Li P, Chen SR, Louis CF, Fruen BR: Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca^{2+} release channels.olecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem* 276: 13810-13816 (2001)

98. Zhou H, Lillis S, Loy RE, Ghassemi F, Rose MR, Norwood F, Mills K, Al-Sarraj S, Lane RJ, Feng L, Matthews E, Sewry CA, Abbs S, Buk S, Hanna M, Treves S, Dirksen RT, Meissner G, Muntoni F, Jungbluth H: Multi-minicore disease and atypical periodic paralysis associated with novel mutations in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscul Disord* 20: 166-73 (2010)

99. Zorzato F, Scutari E, Tegazzin V, Clementi E, Treves S: Chlorocresol: An activator of ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release. *Mol Pharmacol* 44: 1192-1201 (1993)

100. Zullo A, Klingler W, De Sarno C, Ferrara M, Fortunato G, Perrotta G, Gravino E, Di Noto R, Lehmann-Horn F, Melzer W, Salvatore F, Carsana A: Functional characterization of ryanodine receptor (RYR1) sequence variants using a metabolic assay in immortalized B-lymphocytes. *Hum Mutat.* 30: 575-90 (2009)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer, Mentor und Freund PD Dr. Werner Klingler, der mich stets mit unermüdlicher Hilfsbereitschaft unterstützte und förderte.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Dr. h.c. Frank Lehmann-Horn für das Vertrauen, die Unterstützung und Hilfe bei der Umsetzung und Publikation der Multicenter-Studie bedanken.

Die Erforschung seltener Erkrankungen verlangt ein hohes Maß an internationaler und interkultureller Verständigung, die weit über reine Sprachkenntnisse hinausgeht. Daher möchte ich allen Mitarbeitern der teilnehmenden Testzentren dafür danken, dass sie die Geduld, Mühen und schwierigen Diskussionen dieses Projekts auf sich genommen haben und dass sie mir das Vertrauen zur Koordination der Studie entgegengebracht haben. Namentlich Prof. Dr. Tierry Girard; Prof. Dr. Elvira Gravino; Prof. Dr. James J. A. Heffron; Dr. Stephan Johannsen; Prof. Dr. Henrik Rüffert; Prof. Dr. Frank Schuster; Prof. Dr. Marc Snoeck und Prof. Dr. Vincenzo Tegazzin.

Weiterhin danke ich PD Dr. Werner Melzer und Dr. Zoita Andronache für deren interessiert kritisches Hinterfragen und ihre fachliche Hilfestellung.

Für seine kompetente Hilfe und eleganten Lösungen danke ich außerdem meinem Freund B.Sc. (FH) Fabian Müller, der mir bei der Programmierung der Multicenter-Datenbank zur Seite stand.

Für das Korrekturlesen danke ich meiner Schwester Juliane, sowie meinem Schwager Dipl.-Biol. Dieter Gerards.

Alles wäre ohne meine Eltern und Familie nicht möglich gewesen, die mir den nötigen Halt und Motivation gaben um auch in schweren Phasen nicht aufzugeben.

Schließlich möchte ich ganz besonders meiner Freundin Kristin danken, die meine Begeisterung und Ernüchterung, Erfolge und Misserfolge immer als erste zu spüren bekam.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sebastian Heiderich

geboren am 06.07.1985 in Hildesheim

Schulausbildung

1996 - 2005	**Gymnasium Andreanum Hildesheim**

Freiwilliges Soziales Jahr

08/2005 - 06/2006	St.Bernward Krankenhaus Hildesheim

Medizinstudium

9/2006 - 8/2008	**Universität Pécs**
10/2008 - 08/2011	**Universität Ulm**
08/2011 - 03/2013	**Philipps-Universität Marburg**
11/2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: 1,5 (sehr gut)
11/2012	Approbation zum Arzt

Klinische Tätigkeit

Seit 04/2013	**Medizinische Hochschule Hannover**
	Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Promotion

04/2014	**Universität Ulm,** Titel der Dissertation:
	„Europäische Multicenter-Studie zur Evaluation gesicherter Maligne Hyperthermie Krisen - Triggersubstanzen und Risikofaktoren."
	Note: magna cum laude (sehr gut)

Auszeichnungen

2007	Best Performance in Molecular Cell Biology Award, Universität Pécs
2007	3. Platz des Studienwettbewerb-Biophysik, Universität Pécs
2012	European Malignant Hyperthermia Group Award 2012, First Prize

Publikationen

10/2013	Johannsen S, Klingler W, Schneiderbanger D, Heiderich S, Roewer N, Schuster F. Sevoflurane is less sensitive than halothane for in vitro de-

tection of malignant hyperthermia susceptibility. Acta Anaesthesiol Scand. 57:1161-6. (2013)

12/2013 Kuckelt W (Hrsg), Klingler W, Heiderich S, Lehmann-Horn F, Rüffert H, Hock D, Hoppe K: Maligne Hyperthermie und andere neuromuskuläre Erkrankungen – ist immer eine triggerfreie Anästhesie indiziert? In: Jahrbuch Intensivmedizin 2014, Pabst Science Publishers, Lengerich, Kapitel 10: S. 123-132

01/2014 Klingler W, Heiderich S (contributing 1st author), Girard T, Gravino E, Heffron JJ, Johannsen S, Jurkat-Rott K, Rüffert H, Schuster F, Snoeck M, Sorrentino V, Tegazzin V, Lehmann-Horn F: Functional and genetic characterization of clinical malignant hyperthermia crises: a multi-centre study. Orphanet J Rare Dis. 9:8 (2014)