

Казанцева А.А., Лебединский К.М.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ

*ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова
Минздрава России, 191015, Санкт-Петербург, Россия*

Злокачественная гипертермия — редкое заболевание, угрожающее жизни, проявляющееся у генетически предрасположенных пациентов развитием острого массивного рабдомиолиза при воздействии веществ-триггеров. Предрасположенность к злокачественной гипертермии (ПЗГ) наследуется по аутосомно-доминантному типу с различной пенетрантностью. "Золотым стандартом" диагностики ПЗГ является галотан-кофеиновый контрактурный тест (ГККТ), который представляет моделирование in vitro с помощью биопсийного материала реакции поперечно-исчерченной мышечной ткани на препараты-триггеры и характеризуется 99% чувствительностью и 93,6 % специфичностью. Генетический анализ менее инвазивен, но чувствительность его существенно ниже. Описаны оба метода, освоение которых необходимо для создания в России возможностей современной диагностики ПЗГ, и обсуждаются сегодняшние представления о роли каждого из них.

Ключевые слова: злокачественная гипертермия; галотан-кофеиновый контрактурный тест; молекулярно-генетическая диагностика.

MODERN DIAGNOSTIC APPROACHES FOR MALIGNANT HYPERTHERMIA SUSCEPTIBILITY

Kazantseva A.A., Lebedinskii K.M.

Mechnikov North-Western State Medical University, 191015, St. Petersburg, Russian Federation

Malignant hyperthermia is a well-known rare life-threatening autosomal-dominant pharmacogenetic disease. The article deals with a halothane-caffeine contracture test. The test is a model of muscle reaction to triggers in-vitro and it is the "golden standard" for malignant hyperthermia susceptibility (MHS) diagnosis. Genetic analysis is less invasive, but its sensitivity is significantly lower. The review discusses both the methods which are essential to be completely reproduced in Russia, and their role in modern approach to MHS diagnosis.

Key words: malignant hyperthermia, in-vitro contracture test, molecular-genetic analysis.

Злокачественная гипертермия (ЗГ) — фармакогенетическое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, фенотипически проявляющееся гиперметаболизмом скелетных мышц и рабдомиолизом при воздействии определенных веществ. Считается, что частота кризов ЗГ составляет в среднем 1:50 000 анестезий у взрослых [1] и 1:3000—1:15000 анестезий у детей [2]. Вероятно, истинное число лиц, имеющих предрасположенность к ЗГ (ПЗГ), гораздо выше. Во-первых, у пациентов с ПЗГ в анамнезе могут быть операции под общей анестезией без особенностей [3, 4]. Во-вторых, не каждый пациент с ПЗГ пройдет через общую анестезию.

В большинстве случаев причиной ПЗГ является унаследованная мутация гена, кодирующего рианодинновый рецептор первого типа RyR1 — кальциевый канал саркоплазматического ретикула (СР) поперечно-полосатых мышц [5—8]. Нарушение структуры рецептора приводит к тому, что сукцинилхолин и все ингаляционные анестетики (так называемые препараты-триггеры), кроме закиси азота и ксенона, прочно связываются с ним, переводя канал в перманентно открытое состояние. Концентрация Ca^{2+} в саркоплазме начинает стремительно нарастать, несмотря на сохранность механизма его обратного захвата, что вызывает более или менее генерализованное

неразрешающееся сокращение скелетных мышц по типу контрактуры [9, 10]. Мышечное сокращение — весьма энергоемкий процесс, но при развитии контрактуры из-за того, что перемещение равно нулю, энергия переходит не в форму механической работы, а в форму тепла. Это и является причиной подъема температуры, наблюдающегося при кризе ЗГ примерно у трети пациентов. Рост потребления O_2 и массивное образование CO_2 в результате мышечного сокращения формируют системный гиперметаболизм и гипоксию, непрерывное мышечное сокращение становится причиной "механической" ишемии скелетной мышечной ткани, быстро исчерпывается кислородная емкость миоглобина, являющегося аккумулятором O_2 для сокращенных мышц. В итоге развивается рабдомиолиз [9] — разрушение поперечно-полосатых мышц. В дальнейшем грубые системные метаболические расстройства быстро приводят к полиорганной недостаточности.

Диагностика ПЗГ осуществляется двумя способами: при помощи галотан-кофеинового контрактурного теста (ГККТ) in vitro (в Европе его обычно называют in vitro contracture test — IVCT, а в США — Caffeine-halothane contracture test — СНСТ) [11] или при помощи методов генетического исследования [12, 13]. Несмотря на расширяющиеся возможности генетического анализа, ГККТ до сих пор остается "золотым стандартом" диагностики ПЗГ [14, 15]. В таблице приведена сравнительная характеристика методов.

Последовательность применения этих диагностических методов может быть разной. В некоторых странах ГККТ предпочитают проводить сразу и у кровных род-

Информация для контакта:

Казанцева Ангелина Александровна;

Correspondence to:

Kazantseva Angelina Aleksandrovna e-mail: vesnalinka@gmail.com

Сравнительная характеристика методов диагностики ПЗГ

Метод	Достоинства	Недостатки
Генетическое исследование	Высокая специфичность Малая инвазивность Для сдачи крови не обязательно ехать в специализированный стационар Низкая стоимость, если поиск направлен на мутацию, установленную ранее у других членов семьи	Невысокая чувствительность: отрицательные результаты не могут трактоваться как НЗГ ввиду возможности наличия мутации, ранее не доказанной как причина ПЗГ Отрицательный результат требует проведения ГККТ, однако пациенты часто недооценивают важность этого Если обнаружена ранее неизвестная мутация, требуется либо подтверждение ее как причины ЗГ при помощи сложных и дорогостоящих исследований, либо проведение ГККТ Нет возможности гистологического исследования мышц
ГККТ	Чувствительность 99% Специфичность (только для ПЗГ!) 98,5% Возможность проведения гистологического исследования Однозначность отрицательного результата	Невысокая специфичность для ВПЗГ Необходимость проведения мышечной биопсии в условиях стационара Ложноположительные результаты (ПЗГ и ВПЗГ) в 5% случаев

ственников пациента с ПЗГ, оставляя генетическое обследование дополнительной опцией [16], поскольку отрицательный результат генетического исследования не означает, что пациент не предрасположен к ЗГ. Алгоритм диагностики ПЗГ в виде блок-схемы представлен на рисунке.

В России проблема ЗГ в настоящее время остается нерешенной. Во-первых, в условиях большинства отечественных стационаров затруднительна даже ранняя диагностика криза ЗГ: капнографами, позволяющими максимально быстро диагностировать криз, зачастую не оснащены даже крупные клиники больших городов. Во-вторых, на сегодняшний день в России имеется единственный консультативный центр по проблеме ЗГ, где есть возможность проведения генетического исследования, но нет ни одной лаборатории для выполнения ГККТ.

В 2012 г. Федерацией анестезиологов и реаниматологов России был создан Комитет по проблеме ЗГ, отвечающий, в частности, за создание и развитие сети консультативно-диагностических центров в нашей стране. Грант Всемирной федерации обществ анестезиологов (WFSA) позволил подготовить специалиста по проведению ГККТ для России, переняв опыт европейских коллег. На данный момент кафедрой анестезиологии и реаниматологии им. В.Л. Ваневского Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова в Санкт-Петербурге проводятся работы по оснащению такой лаборатории на базе Клинического госпиталя МСЧ МВД России по Санкт-Петербургу и Ленинградской области.

Галотан-кофеиновый тест

ГККТ является лабораторной моделью реакции скелетных мышц на воздействие препаратов-триггеров ЗГ, основанной на использовании биопсийного материала.

Для биопсии чаще всего используют mm. quadriceps femoris, vastus medialis, vastus lateralis и biceps brachii. Операцию проводят открытым способом, по возможности в условиях регионарной анестезии [17]. Биопсия должна выполняться строго при отсутствии рефлекторной чувствительности мышечных волокон. Крайне важна техника взятия биоптата: следует избегать натяжения мышцы и не использовать электрокоагуляцию до момента полного иссечения мышечного фрагмента [18].

По протоколу Европейской группы по злокачественной гипертермии (EMHG), после забора биоптат мышцы немедленно помещают в емкость с преоксигенированным O_2 (можно использовать линию подачи увлажненного O_2 непосредственно от наркозного аппарата) или прекарбоксигенированным (используется 5% карбоген)

раствором Рингера или Кребса—Рингера комнатной температуры, а затем в течение максимум 15 мин доставляют его в диагностическую лабораторию. Жизнеспособность биоптатов мышечной ткани зависит от условий, в которых они находятся в лаборатории, и варьирует в пределах от 5 до 24 ч. Наиболее сохранены цельные биоптаты, помещенные в карбоксигенируемый раствор Кребса—Рингера комнатной (23—25°C) температуры с pH 7,4 [19].

Для теста готовят пучки мышечных волокон пациента толщиной 2—3 мм и массой 100—200 мг, которые лигируют ниткой с обеих сторон для фиксации. Длина образца между фиксирующими лигатурами должна быть 15—25 мм. Фрагмент мышцы помещают в ванночку для изолированных органов объемом 5—10 мл, перфузируемую подогреваемым до 37°C раствором Кребса—Рингера. Верхняя фиксирующая лигатура оканчивается петлей, которая прикрепляется к датчику мышечного усилия (изометрическому трансдюсеру) [17].



Алгоритм диагностики ПЗГ в виде блок-схемы: ПЗГ — предрасположенность (предрасположен) к злокачественной гипертермии; ГККТ — галотан-кофеиновый контрактурный тест; НЗГ — не предрасположен к злокачественной гипертермии; пояснения в тексте.

Мышечный фрагмент растягивают до достижения усилия 2 г; необходимо дождаться стабилизации мышцы, т.е. момента, когда колебания изолинии не будут превышать 0,2 г. После проверки качества образца (достижение сокращений ≥ 2 г) можно начинать тест. Для этого в ванночку добавляют препарат-триггер в различных концентрациях и измеряют силу мышечного сокращения, развивающегося при прямой электрической стимуляции мышцы. Рекомендуется выбирать частоту стимуляции 0,1—0,2 Гц, продолжительность импульса от 1 до 10 мс и напряжение от 20 до 100 В.

В классическом варианте ГККТ используют кофеин и галотан [11, 20, 21], однако описаны методики с применением рианоидина [22—24] и 9,21-дегидрорианоидина [25], 4-хлор-метакрезола [22, 26—29] и севофлурана [30, 31]. В экспериментах на свиньях были предложены протоколы контрактурных тестов с теофиллином [32] и 4-хлор-3-этилфенолом [33]; последний был не информативен в эксперименте на образцах мышечной ткани человека [34].

Есть предположение, что 4-хлор-метакрезол может позволить поставить окончательный диагноз пациентам, у которых результат ГККТ был качественно или количественно неопределенным [29]. В то же время есть данные о том, что применение дополнительных препаратов для ГККТ не повышает ни чувствительности, ни специфичности метода [35]. Были попытки модифицировать протокол ГККТ, заменив галотан на более распространенные современные ингаляционные анестетики — севофлуран, энфлуран, изофлуран и десфлуран. Однако именно галотан пока остается самым сильным провокатором ЗГ в эксперименте [31].

Кофеиновый тест

Концентрацию кофеина в растворе последовательно повышают до 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; и 32 ммоль \cdot л⁻¹ (по химическому чистому свободному основанию). Каждое последующее повышение концентрации проводится либо после достижения максимального контрактурного плато на предыдущем этапе, либо после экспозиции мышцы в растворе в течение 3 мин, если контрактура не возникла. Кофеин может добавляться в ванночку как инъекционным болюсом, так и низкообъемной инфузией в раствор. Смену концентрации кофеина следует производить быстро, без промывки биоптата свежим раствором Кребса—Рингера.

Результат этого теста фиксируется как пороговая концентрация, т.е. наименьшая концентрация кофеина, вызвавшая достоверное (по меньшей мере на 2 мН — 0,2 г) стойкое увеличение мышечной силы по сравнению с минимальной силой.

Качество мышечного фрагмента можно оценить при концентрации кофеина 32 ммоль \cdot л⁻¹; развитие контрактуры ≥ 5 г свидетельствует о хорошем качестве образца.

Галотановый тест

Различают статические и динамические варианты галотанового теста. Статические тесты могут быть выполнены как по протоколу Европейской группы ЗГ (EMHG), так и по протоколу Американской ассоциации ЗГ (Malignant Hyperthermia Association of the United States — MHAUS). Динамические тесты более трудоемки и используют их редко.

Европейский статический галотановый тест

Галотановый порог определяют при концентрациях 0,11, 0,22, 0,44 и 0,66 ммоль \cdot л⁻¹, что эквивалентно 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 об. % галотана соответственно. Концентрацию

галотана в газовой смеси измеряют максимально близко к входному порту ванночки. Для обеспечения заданной концентрации галотана газоток должен быть не менее 2 л \cdot мин⁻¹.

Образец мышечной ткани последовательно экспонируют в растворе в течение 3 мин при каждой концентрации. Вычисление галотанового порога такое же, как и при выполнении кофеинового теста. Отмечают максимальное сократительное усилие при концентрации галотана 0,44 ммоль \cdot л⁻¹ (т.е. 2 об. %).

Американский статический галотановый тест

Этот вариант галотанового теста более прост в выполнении. После стабилизации мышцы в ванночку подают 3 об. % галотана, экспозицию осуществляют в течение 10 мин. Если возникает контрактура ≥ 5 г, то тест признается положительным.

Диагностические критерии оценки результатов ГККТ

Предрасположенный к ЗГ (ПЗГ): кофеиновый порог находится в диапазоне концентраций кофеина $\leq 2,0$ ммоль \cdot л⁻¹, а галотановый — в диапазоне $\leq 0,44$ ммоль \cdot л⁻¹.

Не предрасположенный к ЗГ (НЗГ): кофеиновый порог находится в диапазоне концентраций выше 3,0 ммоль \cdot л⁻¹, галотановый — выше 0,44 ммоль \cdot л⁻¹.

Вероятно, предрасположенный к ЗГ (ВПЗГ): все прочие результаты считаются сомнительными, но обозначаются как "вероятно, ПЗГ": ВПЗГ, когда положительным был только галотановый тест, или ВПЗГ, когда положительным был только кофеиновый тест. Все пациенты с ВПЗГ тактически проводятся как ПЗГ.

Наибольшая чувствительность ГККТ (97% при 95% ДИ 84—100%) была достигнута при 2-компонентном тесте с диагностическими пороговыми значениями контрактуры $\geq 0,5$ г для 3% галотана и/или $\geq 0,3$ г для кофеина в концентрации 2 ммоль \cdot л⁻¹. Специфичность такого теста равна 78% (95% ДИ 69—85%) [35]. Если за критерий диагноза ПЗГ принимать положительные результаты, полученные хотя бы в одном из тестов (галотановом или кофеиновом), то чувствительность ГККТ достигает 99% (95% ДИ 94,8—100%), а специфичность — 93,6% (95% ДИ 89,2—96,5%) [36]. Чувствительность и специфичность рианоидинового теста равны 84,6 и 90,4% соответственно [22]. Тест с севофлураном считается еще менее чувствительным [30, 31, 37]. Близкие к пороговым значениям показатели (например, < 5 мН (0,5 г) в протоколе EMHG) маловоспроизводимы и, строго говоря, являются ненадежными, однако и такие результаты в целях безопасности пациента также должны трактоваться как положительные [38].

Различие пороговых концентраций в ГККТ у разных пациентов с ПЗГ и ВПЗГ является, по всей видимости, следствием того, что чувствительность RyR1 к триггерным препаратам зависит от варианта и локализации генетического дефекта [39].

Методы генетического анализа

Генетика синдрома ЗГ достаточно разнообразна. ПЗГ наследуется по аутосомно-доминантному типу с вариабельной экспрессивностью и неполной пенетрантностью [40]. Семейная генетическая диагностика ПЗГ ограничена достоверностью только положительных результатов и только у тех, кто является носителем доказанных (проверенных в физиологических исследованиях) мутаций [41].

На сегодняшний день известно более 300 мутаций гена RyR1, ассоциированных с ПЗГ, но лишь 31

из них по результатам функциональных исследований была внесена ЕМНГ в список причинных для ПЗГ, а Северо-Американская группа злокачественной гипертермии (NAMHG) формально признала причинными только 29 [42]. Это означает, что лишь эти мутации могут быть использованы для скрининга ПЗГ [43]. Молекулярно-генетический анализ показал, что мутации в RyR1 определяются у 70—80% людей с доказанной ПЗГ [44—46].

В качестве методов генетического анализа чаще всего используются секвенирование и мультиплексная амплификация лигазносвязанных проб (multiplex ligation dependent probe amplification — MLPA). Дешевизна, точность, а также сравнительная простота автоматизации секвенирования делает этот метод своеобразным эталоном среди всех существующих способов определения последовательности ДНК. MLPA позволяет амплифицировать несколько участков ДНК с помощью одной пары праймеров, что делает метод менее трудоемким, но в то же время и менее чувствительным: наборы для MLPA позволяют проанализировать строго определенное количество небольших фрагментов ДНК. В последнее время применяется и высокоточный анализ кривых плавления (High Resolution Melting — HRM) — чувствительный и экономически эффективный инструмент для определения вариантов последовательности нуклеотидов в сложных генах [47].

Выявление мутаций у пациентов с результатами ГККТ, расцененными как ВПЗГ, может верифицировать диагноз ПЗГ [48]. Отрицательный результат ГККТ при наличии доказанной мутации гена RyR1 позволяет предположить, что пенетрантность может варьировать вследствие пока еще неизвестных факторов [49].

В семьях с известными ЗГ-мутациями вероятность подтвердить ПЗГ равна 50%. Прогностическая ценность отрицательного результата генетического анализа равняется 0,95 (95% ДИ 0,75—0,99), но для безопасности пациента, в соответствии с рекомендациями ЕМНГ, следует выполнить ГККТ [12]. Поскольку отрицательный результат молекулярно-генетического анализа не исключает ПЗГ, в настоящее время он не может считаться эквивалентной заменой ГККТ [50].

Основным преимуществом генетического анализа, если мутация была найдена, является возможность обследовать всех кровных родственников с минимальными затратами (проводится исследование только на одну данную мутацию) [51].

Гистологическое исследование

В некоторых центрах часть биоптата отправляют на гистологическое и биохимическое исследование. Морфологический анализ мышечной ткани помогает уточнить патолофизиологию ЗГ, но не является рутинной методикой выявления ПЗГ.

Заключение

Таким образом, создание в России всего спектра современных возможностей для диагностики ПЗГ предполагает воспроизведение технологий ГККТ и генетического исследования, описанных в настоящем обзоре. Пока в нашей стране освоена только вторая из них, которую может выполнять консультативный центр по проблеме ЗГ, работающий при кафедре анестезиологии и реаниматологии им. В.Л. Ваневского Северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург). Авторы надеются, что в 2014 г. у них появится возможность впервые в России выполнить и ГККТ.

REFERENCES * ЛИТЕРАТУРА

1. Dong-Chan K. Malignant hyperthermia. *Korean J. Anesthesiol.* 2012; 63 (5): 391—401.
2. Wappler F. Malignant hyperthermia. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2001; 18: 632—52.
3. Bendixen D., Skovgaard L.T., Ørding H. Analysis of anaesthesia in patients suspected to be susceptible to malignant hyperthermia before diagnostic in vitro contracture test. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1997; 41: 480—4.
4. Puschel K., Schubert-Thiele I., Hirth L., Benkmann H.G., Brinkmann B. Maligne Hyperthermie in der 13 Vollnarkose. *Anästhesist.* 1978; 27: 488—91.
5. MacLennan D.H., Zvaritch E. Mechanistic models for muscle diseases and disorders originating in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1813: 948—64.
6. Melzer W., Herrmann-Frank A., Luttgau H.C. The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; 1241: 59—116.
7. MacLennan D.H., Duff C., Zorzato F., Fujii J., Phillips M., Korneluk R.G. et al. Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature.* 1990; 343: 559—61.
8. Gillard E.F., Otsu K., Fujii J., Khanna V.K., de Leon S., Derdemezi J. et al. A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics.* 1991; 11: 751—5.
9. Rosenberg H., Davis M., James D., Pollock N., Stowell K. Malignant hyperthermia. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2007; 2: 21. Available at: <http://www.orphandis.com/content/2/1/21> (Accessed 9 September 2013).
10. Mickelson J.R., Gallant E.M., Litterer L.A., Johnson K.M., Rempel W.E., Louis C.F. Abnormal sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor in malignant hyperthermia. *J. Biol. Chemistry.* 1988; 263: 9310—5.
11. Ellis F.R., Harriman D.G.F., Currie S., Cain S. Screening for malignant hyperthermia in susceptible patients. In: *International Symposium on Malignant Hyperthermia, 2nd: Proceedings / Ed. J.A. Aldrete.* New York: Grune & Stratton; 1978: 273—85.
12. Girard T., Treves S., Voronkov E., Siegemund M., Urwyler A. Molecular genetic testing for malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology.* 2004; 100: 1076—80.
13. Urwyler A., Deufel T., McCarthy T., West S. Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br. J. Anaesthesiol.* 2001; 86: 283—7.
14. Bandschapp O., Girard T. Malignant hyperthermia. *Swiss Medical Weekly.* 2012; 142: w13652. Available at: <http://www.smw.ch/content/smw-2012-13652/> (Accessed 1 December 2013).
15. Litman R.S., Rosenberg H. Malignant hyperthermia: update on susceptibility testing. *J. A. M. A.* 2005; 293 (23): 2918—24.
16. Haugen T., Toft M., Müller C.R., Aasly J. Malign hypertermi — en arvelig og potensielt livstruende tilstand. *Tidsskr. Norske Laegeforen.* 2005; 125 (20): 2792—4.
17. Rosenberg H., Antognini J.F., Muldoon S. Testing for malignant hyperthermia. *Anesthesiology.* 2002; 96 (1): 232—7.
18. Tautz T.J., Urwyler A., Antognini J.F., Riou B. Case scenario: Increased end-tidal carbon dioxide: a diagnostic dilemma. *Anesthesiology.* 2010; 112 (2): 440—6.
19. Bina S., Holman S., Muldoon S.M. Extending the skeletal muscle viability period in the malignant hyperthermia test. *Anesth. & Analg.* 2003; 96 (1): 153—8.
20. Larach M.G. North American Malignant Hyperthermia Group. Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. *Anesth. & Analg.* 1989; 69: 511—5.
21. The Malignant Hyperpyrexia Group. A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br. J. Anaesth.* 1984; 56: 1267—9.
22. Bendahan D., Guis S., Monnier N., Kozak-Ribbens G., Lunardi J., Ghattas B. et al. Comparative analysis of in vitro contracture tests

- with ryanodine and a combination of ryanodine with either halothane or caffeine: a comparative investigation in malignant hyperthermia. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2004; 48 (8): 1019—27.
23. Weissshorn R., Wappler F., Fiege M., Gerbershagen M.U., Kolodzie K., Alberts P. et al. Ryanodine contracture threshold times for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility: an experimental approach from a single laboratory. *J. Clin. Anesth.* 2004; 16 (5): 353—7.
 24. Hartung E., Koob M., Anetseder M., Schoemig P., Krauspe R., Högrefe G. et al. Malignant hyperthermia (MH) diagnostics: a comparison between the halothane-caffeine- and the ryanodine-contracture-test results in MH susceptible, normal and control muscle. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1996; 40 (4): 437—44.
 25. Wappler F., Roewer N., Lenzen C., Köochling A., Scholz J., Steinfath M. et al. High-purity ryanodine and 9,21-dehydroryanodine for in vitro diagnosis of malignant hyperthermia in man. *Br. J. Anaesthesiol.* 1994; 72 (2): 240—2.
 26. Ben-Abraham R., Krivosic-Horber R.M., Haudcoeur G., Perel A., Adnet P.J. Effect of chlorocresol vs caffeine on muscle contracture in malignant hyperthermia susceptible patients. *Harefuah.* 1997; 132 (12): 839—41.
 27. Baur C.P., Bellon L., Felleiter P., Fiege M., Fricker R., Glahn K. et al. A multicenter study of 4-chloro-m-cresol for diagnosing malignant hyperthermia susceptibility. *Anesth. Analg.* 2000; 90 (1): 200—5.
 28. Ørding H., Glahn K., Gardi T., Fagerlund T., Bendixen D. 4-Chloro-m-cresol test—a possible supplementary test for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1997; 41 (8): 967—72.
 29. Gilly H., Musat I., Fricker R., Bittner R.E., Steinbereithner K., Kress H.G. Classification of malignant hyperthermia-equivocal patients by 4-chloro-M-cresol. *Anesth. Analg.* 1997; 85 (1): 149—54.
 30. Metterlein T., Hartung E., Schuster F., Roewer N., Anetseder M. Sevoflurane as a potential replacement for halothane in diagnostic testing for malignant hyperthermia susceptibility: results of a preliminary study. *Minerva Anesthesiol.* 2011; 77 (8): 768—73.
 31. Metterlein T., Schuster F., Kranke P., Roewer N., Anetseder M. In-vitro contracture testing for susceptibility to malignant hyperthermia: can halothane be replaced? *Eur. J. Anaesthesiol.* 2011; 28 (4): 251—5.
 32. Gerbershagen M.U., Fiege M., Weissshorn R., Kolodzie K., Wappler F. Theophyllin induziert Kontraktionen an Skelettmuskelpräparaten des Schweines mit Disposition zu Maligner Hyperthermie. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 2004; 39 (3): 147—52.
 33. Gerbershagen M.U., Wappler F., Fiege M., Weissshorn R., Kolodzie K., Schulte am Esch J. Ist eine präsymptomatische Maligne Hyperthermie in-vitro Diagnostik mit 4-Chlor-3-Ethylphenol möglich? Eine Studie an Skelettmuskelpräparaten des Schweins. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 2004; 39 (2): 81—6.
 34. Gerbershagen M.U., Fiege M., Weissshorn R., Kolodzie K., Schulte am Esch J., Wappler F. Cumulative and bolus in vitro contracture testing with 4-chloro-3-ethylphenol in malignant hyperthermia positive and negative human skeletal muscles. *Anesth. Analg.* 2005; 101 (3): 710—4.
 35. Allen G.C., Larach M.G., Kunselman A.R. The sensitivity and specificity of the caffeine-halothane contracture test: a report from the North American Malignant Hyperthermia Registry. The North American Malignant Hyperthermia Registry of MHAUS. *Anesthesiology.* 1998; 88 (3): 579—88.
 36. Ørding H., Brancadoro V., Cozzolino S., Ellis F.R., Glauber V., Gonano E.F. et al. 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 Anaesthesiol. Scand.* 1997; 41: 955—66.
 37. Johannsen S., Klingler W., Schneiderbanger D., Heiderich S., Roewer N., Schuster F. Sevoflurane is less sensitive than halothane for in vitro detection of malignant hyperthermia susceptibility. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2013; 57 (9): 1161—6.
 38. Ørding H., Islander G., Bendixen D., Ranklev-Twetman E. Between-center variability of results of the in vitro contracture test for malignant hyperthermia susceptibility. *Anesth. Analg.* 2000; 91 (2): 452—7.
 39. Fiege M., Wappler F., Weissshorn R., Ulrich Gerbershagen M., Steinfath M., Schulte Am Esch J. Results of contracture tests with halothane, caffeine, and ryanodine depend on different malignant hyperthermia-associated ryanodine receptor gene mutations. *Anesthesiology.* 2002; 97 (2): 345—50.
 40. Hirshey Dirksen S.J., Larach M.G., Rosenberg H., Brandom B.W., Parness J., Lang R.S. et al. Future directions in malignant hyperthermia research and patient care. *Anesth. Analg.* 2011; 113: 1108—19.
 41. Stowell K.M. DNA testing for malignant hyperthermia: the reality and the dream. *Anesth. Analg.* 2014; 118 (2): 397—406.
 42. Rosenberg H., Rueffert H. Clinical utility gene card for: malignant hyperthermia. *European Journal of Human Genetics.* 2011; 19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110041/pdf/ejhg2010248a.pdf> (Accessed 08 September 2013).
 43. Kim D.C. Malignant hyperthermia. *Korean J. Anesthesiol.* 2012; 63 (5): 391—401.
 44. Kraeva N., Riazi S., Loke J., Frodis W., Crossan M.L., Nolan K. et al. Ryanodine receptor type 1 gene mutations found in the Canadian malignant hyperthermia population. *Can. J. Anaesthesiol.* 2011; 58: 504—13.
 45. Robinson R., Carpenter D., Shaw M.-A., Halsall J., Hopkins P. Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum. Mutat.* 2006; 27: 977—89.
 46. Sambuughin N., Holley H., Muldoon S., Brandom B.W., de Bantel A.M., Tobin J.R. et al. Screening of the entire ryanodine receptor type 1 coding region for sequence variants associated with malignant hyperthermia susceptibility in the north american population. *Anesthesiology.* 2005; 102: 515—21.
 47. Broman M., Heinecke K., Islander G., Schuster F., Glahn K., Bodelsson M. et al. Screening of the ryanodine 1 gene for malignant hyperthermia causative mutations by high resolution melt curve analysis. *Anesth. Analg.* 2011; 113 (5): 1120—8.
 48. Rüffert H., Olthoff D., Deutrich C., Thamm B., Froster U. In-vitro Kontrakturtest und Gentyptisierung in der Maligne Hyperthermie-Diagnostik. *Anästhesist.* 2000; 49 (2): 113—20.
 49. Tammaro A., Di Martino A., Bracco A., Cozzolino S., Savoia G., Andria B. et al. Novel missense mutations and unexpected multiple changes of RYR1 gene in 75 malignant hyperthermia families. *Clin. Genet.* 2011; 79 (5): 438—47.
 50. Steinfath M., Singh S., Scholz J., Becker K., Lenzen C., Wappler F. et al. C1840-T mutation in the human skeletal muscle ryanodine receptor gene: frequency in northern German families susceptible to malignant hyperthermia and the relationship to in vitro contracture response. *J. Mol. Med.* 1995; 73 (1): 35—40.
 51. Monnier N., Kozak-Ribbens G., Krivosic-Horber R., Nivoche Y., Qi D., Kraev N. et al. Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional, and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. *Hum. Mutat.* 2005; 26 (5): 413—25.

Received. Поступила 20.04.14