روش جدید تشخیص هیپرترمی بدخیم بااستفاده ازپلاکت ها

دکتر نصرا...عبادتی [۱]

خلاصه :

هیپر ترمی بدخیم یک بیماری فارماکوژنتیک بوده و ظهور علایم بیماری مشروط به دارابودن ژن غیر طبیعی واستفاده‌ازمواد بیهوش کننده بعنوان یک فاکتور محیطی می‌باشد . اساس تشخیص این بیماری مبتنی‌است بر تعیین میزان ATP بیماران دردستگاه فتومتر ATP (ATP Photometer).درروش جدید تشخیص این بیماری پلاکت ها بعنوان نمونه بیمارمورد مطالعه قرارگرفته است . تعداد ۳ نفر بیمار یاافراد حامل ژن غیر طبیعی و ۲۰ نفرافراد سالم بعنوان کنترل یاشاهد درایالت تگزاس آمریکا انتخاب شده‌اند ومورد بررسی قرارگرفته‌اند . میزان ATP پلاکت های بیمارکه تحت تاثیر هالوتان که یک ماده بیهوش دهنده است قرارگرفته‌اند بطور قابل توجه‌و معنی داری کاهش یافته درحالیکه پلاکت‌های افراد سالم بعنوان شاهد درهمین شرایط تغییر بسیار جزئی و غیر قابل توجه داشته است . نتیجه این بررسی نشان می دهد که می توان ازپلاکت ها که به راحتی دردسترس است و قابل اجراء دربسیاری ازمراکز درمانی می‌باشد روش جدید مناسبی برای تشخیص آزمایشگاهی بیماری فوق بوده و محدودیت های روش قبلی که از بیوپسی عضلانی استفاده شده است راندارد .

مقدمه :

سندرم هیپرترمی بدخیم وکشنده یکی ازعوارض استفاده ازموادبیهوش کننده می‌باشد و به نظر می‌رسد که این سندرم بصورت فارماکوژنیک بوده زیرابرای ظهور علایم آن علاوه برژن غیر طبیعی نیازبه یک فاکتورمحیطی دارد و درغیر اینصورت علایم ظاهر نمی شوند . بنابراین افرادی که عامل ژن غیر طبیعی می‌باشند وبهردلیلی تحت عمل جراحی قرارمی‌گیرند به محض استفاده از مواد فوق علایم بصورت افزایش دما ی‌بدن یا هیپرترمی ، تاکی کاردی و افزایش حرکات تنفسی ظاهر می شوند که نهایتا" ممکن است منجر به مرگ شود .در چنین مواردی قطع ماده بیهوش کننده تا قطع عمل جراحی و یااتمام آن دراسرع وقت ، تنفس بااکسیژن صددرصد ، تزریق وریدی دانترولن سدیم (Dontrolen Sodium)(۸)و سرد کردن سطح بدن بایخ ضروری است .

افزایش دمای بدن دراثر استفاده موادی مثل هالوتان (Halothane)اینست که مواد مذکور بعنوان یک عامل جداکننده (Uncoupling agent)فسفریلاسیون ازاکسیداسیون می باشدودرنتیجه حرارت حاصل ازسوخت‌مواد بعدازاکسیداسیون به جای اینکه بصورت ATP ذخیره شود دربدن پخش شده و باعث افزایش دمای بدن می شود .

اساس تشخیص مبتنی است برتعیین میزان ATP درسلولهای عضلانی که ازطریق بیوپسی عضلانی بدست می‌آید (۲و۶)وفقط در دومرکز درآمریکا قابل

۱ -استادیاردانشگاه علوم پزشکی گیلان

اجرامی‌باشد . باتوجه به اینکه برای نمونه برداری به تکنیک خاصی نیاز است و برای بیمار بسیار دردناک وناراحت کننده می‌باشد و محدودیت مراکز انجام آزمایش وجود دارد لذا،رروش جدید سعی شده است ازپلاکت ها به جای سلولهای عضلانی که به راحتی قابل به دسترسی بوده ازبعضی جنبه‌ها مثل سیستم انقباضی ، مکانیسم ذخیره و آزادسازی کلسیم و تولید سیستم فعال ATP که درواقع نقص اولیه هیپرترمی بدخیم درآزادسازی ATP و ذخیره کلسیمی بوده (۱و۶) به سلولهای عضلانی شبیه می‌باشد . درنتیجه پلاکت ها که دارای خصوصیات مشترک فوق باعضلات هستند به این منظورمورد مطالعه قرارگرفته است .

مواد و روش کار :

این بررسی که برای اولین بار انجام شده است ۳ نفر بیمار از بیمارستانهای شهرهای دالاس (Dallas) و فورت ورث (FortWorth)درایالت تگزاس آمریکا که نسبت‌به داروی بیهوش کننده حساس بوده و قبلا" بطریقه بیوپسی عضلانی‌حامل بودن ژن غیرطبیعی درآنهااثبات شده انتخاب شدند.همچنین تعداد ۲۰ نفرافرادسالم که هیچگونه سابقه حساسیت به داروی بیهوش کننده نداشته اند بعنوان شاهد یاکنترل ازافراد داوطلب از دانشگاه ایالتی شمال تگزاس انتخاب شده‌اند .

دراین روش میزان ۵ تا ۱۰ میلی لیتر خون از افرادمورد آزمایش گرفته ودرلوله هپارینه وسیلیکانه(Silicanized) ریخته و بادور ۸۰۰ تا ۹۰۰ دور درقیقه (باقطر روتاتور۱۲ اینچ)به‌مدت۱۷دقیقه درحرارت اتاق سانتریفوژ می کنیم.به یک میلی لیترازپلاسمای‌بدست آمده درلوله پلاستیکی ۵ میکرو لیتر هالوتان اضافه گردیده و سپس نیم ساعت درحرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم . بعدازاین مدت،نمونه رادرظرف یخ قرارداده ودرحدود ۳ تا ۵ دقیقه صبر می‌کنیم و سپس توسط میکروفوزباحداکثر سرعت‌بمدت ۳۰ثانیه آنراسانتریفوژمی‌کنیم.به پلاکت های بدست آمده درقسمت ته نشین شده یک میلی لیتراسید فسفریک ۰/۳۷ مول که درظرف یخ قراردارد اضافه کرده و سپس به ۴۰ میکرولیتر ازمحلول استخراج شده فوق ۳۰ میکرولیتر بافر استاندارد اضافه کرده و حجم نهائی آن راتوسط همین بافر به ۱۰۰ میکرولیتر می رسانیم. به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه بدست آمده ۴۰ میکرولیتر لوسیفراز (Luciferase)افزوده وبا ۱۵ ثانیه تأخیرو ۶۰ ثانیه مدت آزمایش باحساسیت ۷ دردستگاه‌فتومترATP تعدادفوتون آزادشده‌ازATPخوانده می شود . قبلا" منحنی استاندارد که توسط ATPاستاندارد تهیه شده دستگاه فوق راتنظیم می‌کنیم .

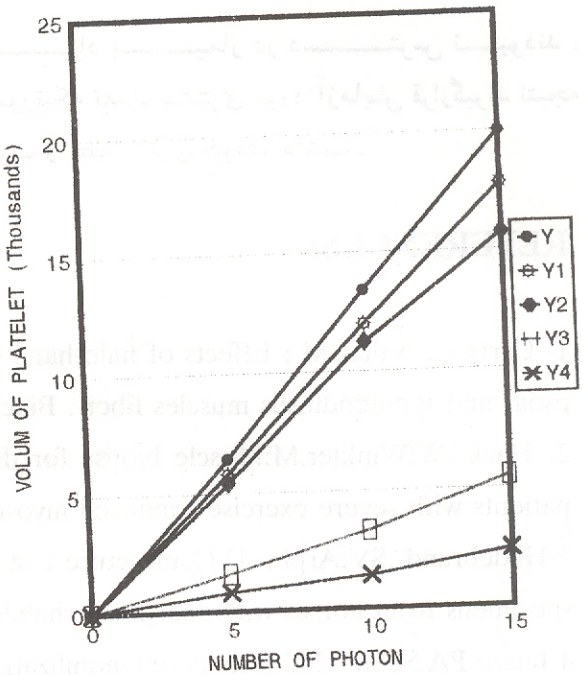
ATP موجود درپلاکت تحت تاثیر لوسیفراز قرارگرفته و طبق فرمول زیرATPتوسط آنزیم مذکور تجزیه وایجاد نور یافوتون می کند.

$$ATP + D\text{-}Luciferine + O_2 \xrightarrow[Mg^{++}]{Luciferase} Oxyluciferine + ATP + PPi + AMP + CO_2 + photon$$

میزان ATP براساس تولید تعدادفوتون یانوردرحجم های مختلف نمونه موردازمایش درحضور حجم مختلف هالوتان ودرغیاب آن دردستگاه اندازه گیری وبه صورت نمودار نشان داده می شود .برای صحت بیشترجواب آزمایش عمل فوق برای هرنمونه بیمار۳ بارتکرارشده و متوسط آن در نظر گرفته شد . درضمن ازنمونه بیمار درزمانهای مختلف بعدازتهیه خون آزمایش بعمل آمده که نتیجه آن تفاوتی نداشته ولی توصیه می شود که اگر بین ۴-۶ ساعت بعدازگرفتن خون انجام گیرد نتیجه مطلوبتری خواهد داشت .

نتیجه :

نتایج آزمایش دراین مطالعه بصورت دونمودارنشان داده شده است که درنمودار ۱ تاثیر حجم مختلف هالوتان برروی تشکیل ATP درپلاکت های افراد بیمارودرنمودار ۲ تحت همان شرایط برای افراد سالم یاکنترل درنظر گرفته شده است .

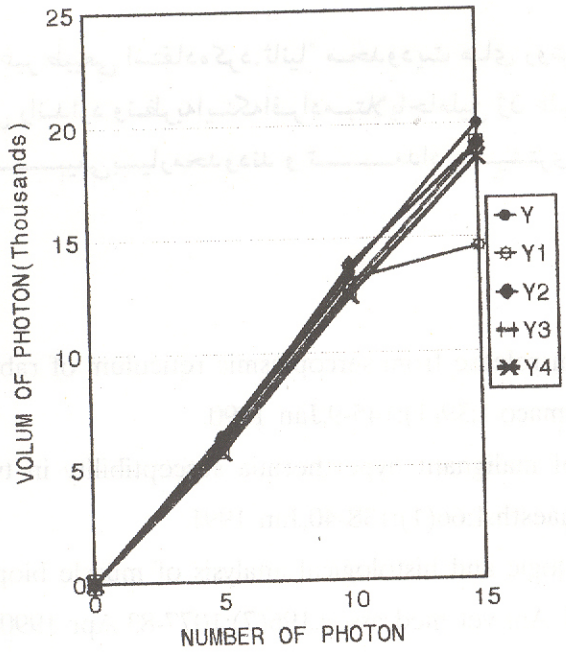


نمودارشماره ۱ : تاثیرحجم مختلف هالوتان برروی تشکیل ATPدرپلاکت های افراد بیمار

دراین بررسی تفاوت قابل ملاحظه‌ای درتاثیر ماده بیهوش کننده هالوتان برروی ATP پلاکت های بیمار بخصوص زمانی که ۵ و ۱۰ میکرولیتر ازاین ماده بکاربرده می شوند کاملا" مشهوداست . زمانی که یک میکرو لیترازماده فوق بکاربرده شده است میزان ATPاندازه گیری شده ۱۵ درصد در حالیکه با ۵ میکرولیتر ازهمین ماده حدود ۸۰ درصد کاهش داشته است .موقعی که پلاکت های بیمار تحت تاثیر هالوتان قرارنگیرد میزان ATPاندازه گیری شده کاملا" مشابه ATPافراد سالم می‌باشد ودرافرادشاهد که ژن غیر طبیعی ندارند استفاده ازهالوتان حتی بمیزان ۵ تا ۱۰ میکرولیتر تاثیر چندانی درمیزان ATP نداشته واین مختصر کاهش آن درهمه افراد سالم دیده شده است وازنظر آماری هم قابل چشم پوشی است .

بحث :

سندرم هیپرترمی بدخیم درانسان ناشی‌از عوارض استفاده‌ازبعضی داروهامثل موادبیهوش کننده‌و عوامل محیطی‌است،درحیوانات نیزعوامل ناشناخته از



نمودارشماره ۲ : تاثیرحجم مختلف هالوتان برروی تشکیل ATPدرپلاکت های افراد سالم

جمله‌استرس (۷) که زمینه ژنتیکی دارند،باعث بروزاین بیماری است.امروزه تشخیص این بیماری با استفاده از سلولهای عضلانی که ازطریق بیوپسی عضلانی انجام می گیردمیسرمی‌شوددرروش جدید که پلاکت هابجای سلولهای عضلانی بکاربرده‌شده‌اند(نمودارشماره ۱ و۲) تفاوت کاملا" فاحشی بین افراد بیمار و افراد تحت کنترل حتی درشرایط مختلف آزمایش بطور مکرر دیده می شود علت اینکه میزان ATPدرپلاکت های بیمار دراثراستفاده ازهالوتان کاهش می‌یابد اینست که این ماده بعنوان عامل جداکننده (Uncouplinay agent)فسفریلاسیون ازاکسیداسیون می‌باشد یعنی انرژی حاصل ازاکسیداسیون مواد سوختنی درپلاکت هابجای اینکه بصورت ATP ذخیره شود درمحیط اطراف پخش می شود درصورتی که این محیط یک محیط بیولوژیک مثل بدن انسان باشد حرارت حاصل ازسوخت مواد باعث افزایش دمای بدن یا هیپرترمی می شود .

این بررسی نشان می د هد که اولا" می شود ازپلاکت هابرای تشخیص هیپرترمی بدخیم یا به عبارتی حاملین

ژن غیر طبیعی استفاده کرد. ثانیا" محدودیت های روش قبلی راندارد ونظربه اینکه افرادمبتلایاحاملین ژن غیر طبیعی بسیارمحدودند و تعداد بیشتری ازافراد بیمار در دسترس نبودند . درصورتیکه تعداد بیشتری مورد آزمایش قرارگیرند نتیجه مطلوب و مطمئن تری خواهد داشت .

REFERENCES:

1- Carrjer,L:Villaz.M : Effects of halothane on calcium release from sarcoplasmic reticulum of rabbit psoas and semitendinsus muscles fiber . Biochem pharmaco.1:39(1):145-9,Jan 1990.

2- Hack ,W:Winkler,M:Muscle biopsy for diagnosis of malignant hyperthermia susceptibility in two patients with severe exercise - induced myosis Br J Anaesth.1:66(1):138-40,Jan 1991.

3-Hildebrand ,SV:Arpin ,D;Contracture test and histologic and histological analysis of muscle biopsy specimens from horses with exertional rhabdomyosis .J Am vet med assoc.196(7):1077-83,Apr 1990.

4-Iaizzo.PA:Seewal.MJ:Enhancced mobilization of interacellular cat induced by halothan in hepatocyte isolated from swine susceptible to malignant hyperthermia .Anesthesiology .74(3):531-8,Mar 1991.

5-Loopez.JR;Sanchez.V:The effects of extrcellular magnesium myoplasmic {Ca+}in malignant hyperthermia susceptible swine.Anesthesiology.73(1):109-17, 1990.

6-McSweeney .DM:Heffron.JJ:Uptake and release of calcium ion by sarcoplasmic reticulum fraction of normal and malignant hyperthermia-susceptible human skeletal muscle int J Biochem. 22(4) :329-33,1990.

7- Nelson ,NE;Procine malignant hyperthermia:critical temperature for in vivo and in vitro response. Anesthesiology. 73(3) :449 -54 ,Sep 1990.

8-Muis .EW;Vree,TB :Pharmocokinetics of intravenously adminstered dantrolene and its 5-hydroxy metabolite in dogs ,Int J clin pharmocology, Res.1990.

New procedure for Diagnosis of Malignant Hyperthermia with Using Plateletes.

Ebadati .N, MD

ABSTRACT:

The malignant hyperthermia is recognized as one of the causes of anesthesia related death and is pharmacogenetic because both an abnormal gene and environmental factor are necessary .The basic diagnostic procedure is based on the measurement of ATP in patient specimen by ATP photometer.Platelets are used for the new diagnostic laboratory procedure in this study .Three individuals with abnormal gene and 20 people with normal one as control were selected in the state of Texas in United States of America.The experiment showed that halothane decreases the level of ATP in individuals with malignant hyperthermia . Halothane may show little inhibition on normal people.The results of this study show that platelets worked out well and do not have those limitations of the previous procedure.