Unravelling the unseen metabolic changes in patients with malignant hyperthermia

Vikas Kaura, MD, PhD · Leon Chang, PhD · Paul D. Allen, MD, PhD

Received: 2 November 2020 / Accepted: 2 November 2020 / Published online: 2 February 2021
© Canadian Anesthesiologists' Society 2021

The first case of what eventually became known as malignant hyperthermia (MH) was reported by Denborough *et al.* in 1962.¹ Since then, great progress has been made in the field, from identifying the majority of genes predisposing patients to an MH reaction to gaining mechanistic insight into the calcium dyshomeostasis observed in cells from patients with MH (as well as in MH animal models). One recurrent observation has been an enhanced cytosolic intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) which has been found both in human MH susceptible (MHS) samples and in mouse models of MH.^{2–6} A question that remains is how skeletal muscles appear to function normally in the absence of a triggering anesthetic, despite persistent elevations in $[Ca^{2+}]_i$.

The study by Bojko *et al.* in this issue of the *Journal* has addressed this question using a novel metabolomics approach whereby two different methods were used to examine the cellular metabolites in skeletal muscle samples from MHS patients and non-susceptible control (MHN) patients.⁷ The authors found significant changes in the metabolites of various pathways involved in carbohydrate and lipid metabolism between MHS and MHN patients, with an overall shift in energy production from carbohydrate to lipid substrates. Alterations in carbohydrate utilization is consistent with the results of studies using muscle samples from human MHS patients and mouse models of MH,^{8,9} as well as showing an impaired aerobic metabolism that would be expected with such a shift in energy substrate.^{8,10–12}

Interestingly, these authors found that the shift to lipid metabolism appeared to be imperfect with an accumulation of fatty acids. Free fatty acids are a vital substrate for energy metabolism, and their accumulation is often attributed to defects in fatty acid transport and beta-oxidation. The accumulation of free fatty acids in human MHS muscle indicates a potential role in its pathophysiology and may reflect defects in mitochondrial function, the site of fatty acid beta-oxidation. In the 1980s, skeletal muscle mitochondria were suspected to contribute towards MH development based on similar observations in both MHS pigs¹³ and humans.¹⁴ Nevertheless, prior studies have been limited in their sample size and efforts in mitochondrial research on MH muscles have not been pursued until recently. These MHS mouse models have renewed research interests into mitochondrial function in MHS muscle, and all studies to date have shown evidence of mitochondrial dysfunction at rest.^{4,5,8} These mitochondrial defects include abnormal morphology, number, and functional capacity, which have also been found in recent studies of muscle from MHS patients.^{11,12} This present study by Bojko *et al.*⁷ contains the most comprehensive evidence of defective fatty acid metabolism in MH, and supports a connection between mitochondrial function and MH development.

The reported enhancement of several lipid molecules in the MHS patient cohort in the current paper is fascinating as these were detected across both the solid phase microextraction (SPME) and Metabolome platforms, indicating at least some degree of homogeneity in the results. Nevertheless, there was variation in the lipid species identified across these platforms, which could be due to either a direct consequence of the two methods themselves or the sample storage and processing at different times. One potential problem with the

V. Kaura, MD, PhD · L. Chang, PhD · P. D. Allen, MD, PhD (✉)
Leeds Institute of Medical Research at St James's, Leeds, UK
e-mail: P.D.Allen@leeds.ac.uk

methodology was that in neither case was the sample either preserved or analyzed immediately as the muscle biopsies were stored in carbogenated Krebs-Ringer buffer for an average of five minutes. This could have affected the metabolic profile of the tissue with the loss of some of the shorter-lived lipid species, an effect that may be compounded by the MH status of the sample. An interesting extension of this study would be to explore whether the same alterations in metabolites are observed when the experiment is conducted *in vivo* by applying the SPME fibres to human tissues while undertaking biopsies for the caffeine halothane contracture test or *in vitro* contracture test tests. Furthermore, another attractive analysis would be to examine the effect of sex on the altered metabolic profiles observed in MHS given that sex has been independently shown to play a role in MH by several different groups^{5,6,12}; presumably, the sample size in the study limited the ability to perform such comparisons. Nevertheless, the data from the study supports the current understanding of the altered metabolism observed in MH.

The Metabolome platform detected a change in some lipid metabolites, with elevations in diacylglycerols (DAG) in MHS. This is a particularly attractive result that is consistent with recent evidence for their role in MH.¹⁵ Diacylglycerols serve as an important intracellular membrane-bound secondary messenger affecting key cellular processes in skeletal muscle. They are produced by the cleavage of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) to generate inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) and DAG. The latter remains within the plasmalemma where it can recruit protein kinase C and activate TRPC3 and 6. Using the *RYR1*-p.G2435R mouse model of MH, Lopez *et al.*¹⁵ have shown that enhanced TRPC3 and 6 channel activity plays a significant role in mediating the Ca²⁺ dyshomeostasis observed in MH muscle at rest. In their studies, application of a membrane permeant DAG analogue to skeletal muscle fibres increased the cytosolic [Ca²⁺]_i in MHS muscles in a gene-dose dependent manner. A similar effect on the resting [Ca²⁺]_i was also seen in response to the DAG analogue in the *RYR1*-p.R163C MH mouse (see¹⁵ for further references). Consequently, the study by Bojko *et al.*⁷ provides further independent evidence for the role of lipid metabolites in mediating the perturbed Ca²⁺ homeostasis in resting MH tissue. The exact mechanism for this dyshomeostasis remains elusive, one hypothesis suggests MH tissue contains an enhanced RyR-1-mediated Ca²⁺ leak from the sarcoplasmic reticulum, as a result of mutations in the RYR1 protein or other proteins that affect the gating of the RYR1 channel. The leak leads to increased extracellular Ca²⁺ entry, which causes a long-term elevation in [Ca²⁺]_i; this in turn triggers an increase in reactive oxygen and nitrogen

species which further potentiate these processes as well as causing lipid peroxidation. The elevated oxidative stress has also been hypothesized to be the cause of the aforementioned mitochondrial dysfunction observed in MHS muscle.⁴ Further work is required to validate and/or refine this theory. A greater understanding of the molecular mechanisms underlying MH will not only help identify treatment targets but also provide a better understanding of skeletal muscle physiology.

Déchiffrer les changements métaboliques des patients atteints d'hyperthermie maligne

Le premier cas de ce qui deviendra connu sous le nom d'hyperthermie maligne (HM) a été rapporté par Denborough *et coll.* en 1962.¹ Depuis, d'importants progrès ont été réalisés, de l'identification de la majorité des gènes prédisposant les patients à une réaction d'HM à la compréhension de la perturbation de l'homéostasie calcique observée dans les cellules des patients atteints d'HM (ainsi que dans les modèles animaux d'HM). Plusieurs études ont relevé un calcium intracellulaire cytosolique augmenté ([Ca²⁺]_i) à la fois dans des échantillons provenant d'humains susceptibles à l'HM (SHM) et dans des modèles murins d'HM.^{2–6} Une question qui demeure est de savoir comment les muscles squelettiques semblent fonctionner normalement en l'absence d'un agent anesthésique déclencheur, malgré des élévations de [Ca²⁺]_i persistantes.

Dans leur étude publiée dans ce numéro du *Journal*, Bojko *et coll.* répondent à cette question en employant une nouvelle approche métabolomique, dans laquelle deux méthodes différentes ont été utilisées pour examiner les métabolites cellulaires dans des échantillons de muscles squelettiques provenant de patients SHM et de patients témoins non susceptibles (NSHM).⁷ Les auteurs ont observé d'importants changements dans les métabolites de diverses voies impliquées dans le métabolisme des glucides et des lipides entre les patients SHM et NSHM, avec une transition globale de la production énergétique des glucides aux substrats lipidiques. Les modifications dans l'utilisation des glucides concordent avec les résultats d'études utilisant des échantillons de muscles de patients humains SHM et de modèles murins d'HM,^{8,9} en plus de montrer une altération du métabolisme aérobie en accord avec un tel changement dans le substrat énergétique.^{8,10–12}

Il est intéressant de relever que ces auteurs ont constaté que le passage à un métabolisme lipidique semblait

imparfait, avec une accumulation d'acides gras. Les acides gras libres sont un substrat vital pour le métabolisme énergétique, et leur accumulation est souvent attribuée à des anomalies dans le transport et la bêta-oxydation des acides gras. L'accumulation d'acides gras libres dans les muscles humains SHM indique un rôle potentiel dans sa physiopathologie et pourrait refléter des anomalies de la fonction mitochondriale, le site de bêta-oxydation des acides gras. Dans les années 1980, en se fondant sur des observations semblables chez les porcs¹³ et les humains SHM,¹⁴ on soupçonnait les mitochondries des muscles squelettiques de contribuer au développement de l'HM. Ces études antérieures étaient cependant limitées par la taille de leur échantillon, et les efforts de recherche mitochondriale sur les muscles en HM ont été abandonnés jusqu'à récemment. Les modèles de souris de SHM ont ressuscité l'intérêt pour la recherche sur la fonction mitochondriale dans les muscles SHM et, à ce jour, toutes les études ont observé des signes d'un dysfonctionnement mitochondrial au repos.^{4,5,8} Ces anomalies mitochondriales incluent une morphologie, un nombre, et une capacité fonctionnelle anormaux, éléments qui ont également été observés dans les études récentes sur les muscles des patients SHM.^{11,12} L'étude de Bojko *et coll.*⁷ publiée ici présente les données probantes les plus complètes d'un métabolisme altéré des acides gras en HM, et elle appuie l'existence d'un lien entre la fonction mitochondriale et le développement d'une HM.

L'augmentation rapportée de plusieurs molécules lipidiques dans la cohorte de patients SHM dans l'étude présentée est fascinante : en effet, ces augmentations ont été détectées aussi bien dans la microextraction en phase solide (MPS) que dans les plateformes métabolomiques, indiquant au minimum un certain degré d'homogénéité dans les résultats. Néanmoins, des variations ont été remarquées dans les espèces lipidiques identifiées dans ces plateformes. Ces variations pourraient être dues soit à une conséquence directe des deux méthodes, soit à l'entreposage et au traitement des échantillons à des moments différents. Un problème potentiel avec la méthodologie de l'étude était que dans aucun des deux cas l'échantillon n'a été préservé ou analysé immédiatement alors que les biopsies musculaires étaient entreposées dans une solution tampon de Krebs-Ringer carbogénée pendant cinq minutes en moyenne. Cela aurait pu avoir un impact sur le profil métabolique du tissu en raison de la perte de certaines des espèces lipidiques à courte durée de vie, un effet qui pourrait être aggravé par le statut d'HM de l'échantillon. Une suite intéressante de cette étude serait de chercher à savoir si les mêmes altérations au niveau des métabolites pourraient être observées lorsque l'expérience est menée *in vivo* en appliquant la MPS aux fibres de tissus humains, au

moment des biopsies pour les tests de contracture à l'halothane et à la caféine ou des tests de contracture *in vitro*. En outre, une autre analyse intéressante serait d'examiner l'effet du sexe sur les profils métaboliques altérés observés en SHM; en effet, plusieurs groupes de chercheurs différents ont démontré que le sexe jouait un rôle indépendant dans l'HM^{5,6,12}; vraisemblablement, la taille d'échantillon de l'étude présentée ici a limité la capacité des auteurs à effectuer de telles comparaisons. Les données de l'étude appuient toutefois la compréhension actuelle d'un métabolisme altéré observé en HM.

La plateforme métabolomique a détecté un changement dans certains métabolites lipidiques, avec des élévations des diacylglycérols (DAG) dans les cas SHM. Il s'agit d'un résultat particulièrement séduisant qui est en accord avec les données récentes quant à leur rôle dans l'HM.¹⁵ Les diacylglycérols servent d'importants messagers secondaires intracellulaires liés à la membrane et affectent des processus cellulaires clés dans les muscles squelettiques. Ils résultent du clivage du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en de l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) et des DAG. Ces derniers restent dans la membrane plasmique, où ils peuvent recruter la protéine kinase C et activer les TRPC3 et 6. En utilisant le modèle de souris en HM *RYR1*-p.G2435R, Lopez *et coll.*¹⁵ ont montré qu'une augmentation de l'activité des canaux TRPC3 et 6 jouait un rôle important dans la médiation de l'homéostasie perturbée de Ca²⁺ observée dans les muscles HM au repos. Dans leurs études, l'application d'un analogue perméant de la membrane DAG aux fibres musculaires squelettiques a augmenté le [Ca²⁺]_i cytosolique dans les muscles SHM d'une manière dépendante gène-dose. Un effet semblable sur le [Ca²⁺]_i au repos a également été observé en réponse à l'analogue des DAG dans le modèle de souris HM *RYR1*-p.R163C (voir¹⁵ pour d'autres références). Ainsi, l'étude de Bojko *et coll.*⁷ fournit d'autres données probantes indépendantes concernant le rôle des métabolites lipidiques dans la médiation de l'homéostasie perturbée du Ca²⁺ dans les tissus HM au repos. Le mécanisme exact derrière ce déséquilibre demeure vague; une hypothèse suggère que le tissu en HM contient une fuite de Ca²⁺ médiée par le RyR-1 augmentée du réticulum sarcoplasmique à la suite de mutations dans la protéine RYR1 ou d'autres protéines qui affectent le blocage du canal RYR1. La fuite conduit à une augmentation de l'entrée de Ca²⁺ extracellulaire, ce qui provoque une élévation à long terme du [Ca²⁺]_i; ceci déclenche à son tour une augmentation des espèces réactives d'oxygène et d'azote, qui potentialisent davantage encore ces processus tout en causant une peroxydation lipidique. Une autre hypothèse est qu'un stress oxydatif élevé pourrait être la cause du dysfonctionnement mitochondrial susmentionné observé

dans le muscle SHM.⁴ D'autres travaux sont nécessaires pour valider et/ou affiner cette théorie. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'HM aidera non seulement à identifier des cibles de traitement, mais fournira également une meilleure compréhension de la physiologie musculaire squelettique.

Disclosures None.

Funding None.

Editorial responsibility This submission was handled by Dr. Hilary P. Grocott, Editor-in-Chief, *Canadian Journal of Anesthesia*.

Déclaration Aucune.

Déclaration de financement Aucune.

Responsabilité éditoriale Cet article a été traité par Dr Hilary P. Grocott, rédacteur en chef, *Journal canadien d'anesthésie*.

References

1. Denborough MA, Forster JF, Lovell RR, Maplestone PA, Villiers JD. Anaesthetic deaths in a family. *Br J Anaesth* 1962; 34: 395-6.
2. López JR, Alamo L, Caputo C, Wikinski J, Ledezma D. Intracellular ionized calcium concentration in muscles from humans with malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 1985; 8: 355-8.
3. Yang T, Riehl J, Esteve E, et al. Pharmacologic and functional characterization of malignant hyperthermia in the R163C RyR1 knock-in mouse. *Anesthesiology* 2006; 105: 1164-75.
4. Durham WJ, Aracena-Parks P, Long C, et al. RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. *Cell* 2008; 133: 53-65.
5. Yuen B, Boncompagni S, Feng W, et al. Mice expressing T4826I-RYR1 are viable but exhibit sex- and genotype-dependent susceptibility to malignant hyperthermia and muscle damage. *FASEB J* 2012; 26: 1311-22.
6. Lopez JR, Kaura V, Diggle CP, Hopkins PM, Allen PD. Malignant hyperthermia, environmental heat stress, and intracellular calcium dysregulation in a mouse model expressing the p.G2435R variant of RYR1. *Br J Anaesth* 2018; 121: 953-61.
7. Bojko B, Vasiljevic T, Boyaci E, et al. Untargeted metabolomics profiling of skeletal muscle samples from malignant hyperthermia susceptible patients. *Can J Anesth* 2021. <https://doi.org/10.1007/s12630-020-01895-y>
8. Giulivi C, Ross-Inta C, Omanska-Klusek A, et al. Basal bioenergetic abnormalities in skeletal muscle from ryanodine receptor malignant hyperthermia-susceptible R163C knock-in mice. *J Biol Chem* 2011; 286: 99-113.
9. Tamminen ER, Kraeva N, Figueroa L, et al. Intracellular calcium leak lowers glucose storage in human muscle, promoting hyperglycemia and diabetes. *Elife* 2020; . <https://doi.org/10.7554/eLife.53999>.
10. Thompson SJ, Riazi S, Kraeva N, et al. Skeletal muscle metabolic dysfunction in patients with malignant hyperthermia susceptibility. *Anesth Analg* 2017; 125: 434-41.
11. Chang L, Daly C, Miller DM, et al. Permeabilised skeletal muscle reveals mitochondrial deficiency in malignant hyperthermia-susceptible individuals. *Br J Anaesth* 2019; 122: 613-21.
12. Rutkowsky JM, Knotts TA, Allen PD, Pessah IN, Ramsey JJ. Sex-specific alterations in whole body energetics and voluntary activity in heterozygous R163C malignant hyperthermia-susceptible mice. *FASEB J* 2020; 34: 8721-33.
13. Cheah KS, Cheah AM. Mitochondrial calcium transport and calcium-activated phospholipase in porcine malignant hyperthermia. *Biochim Biophys Acta* 1981; 634: 70-84.
14. Fletcher JE, Rosenberg H. In vitro muscle contractures induced by halothane and suxamethonium. II: human skeletal muscle from normal and malignant hyperthermia susceptible patients. *Br J Anaesth* 1986; 58: 1433-9.
15. Lopez JR, Kaura V, Hopkins P, et al. Transient receptor potential cation channels and calcium dyshomeostasis in a mouse model relevant to malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 2020; 133: 364-76.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.