บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 แคลเซียมในร่างกายและแคลเซียมในเซลล์

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุที่สำคัญ ในร่างกายมีแคลเซียม 20 – 30 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ส่วนใหญ่สะสมในกระดูก และฟันในรูปของ hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) ที่เหลือประมาณ 1 % จะอยู่ในของเหลวนอกเซลล์ (extracellular fluid) และของเหลวในเซลล์ (intracellular fluid) [21] การรักษาสมดุลของแคลเซียมในร่างกายต้องอาศัยอวัยวะที่สำคัญ 3 ชนิด คือ ไต ลำไส้เล็ก และกระดูกร่วมกับการทำงานของฮอร์โมน พาราธัยรอยด์ (parathyroid hormone) ฮอร์โมน แคลซิโทนิน(calcitonin hormone) วิตามินดี และการขนส่งที่ต้องใช้พลังงานโดยตรงและโดยอ้อมด้วยโปรตีนขนส่งต่างๆเพื่อรักษาความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับค่อนข้างคงที่

แคลเซียมนอกเซลล์ (Extracellular calcium) หรือแคลเซียมในเลือด มีระดับค่อนข้างคงที่ คืออยู่ระหว่าง 8.8 – 10.4 มิลลิกรัม / เดซิลิตร สามารถแบ่งแคลเซียมในเลือดออกได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ ดังนี้ (รูปที่ 1)

1. แคลเซียมที่กรองผ่านไตได้ (Ultrafiltrable หรือ Nonprotein – bound calcium) มี ประมาณร้อยละ 60 ของแคลเซียมในเลือด แบ่งออกได้อีก 2 ส่วน ได้แก่

1.1 แคลเซียมคอมเพล็กซ์ มีประมาณร้อยละ 10 ของพลาสมาแคลเซียม เช่น เกลือแคลเซียมที่จับเป็นคอมเพล็กซ์ อยู่กับไบคาร์บอเนต ซิเตรต ฟอสเฟต และซัลเฟต

1.2 แคลเซียมอิสระ (Ionized หรือ free calcium) มีประมาณร้อยละ 50ของพลาสมาแคลเซียม

2. แคลเซียมที่ไม่สามารถกรองผ่านไต (Non – ultrafiltrable หรือ protein – bound calcium) มีประมาณร้อยละ 40 ของแคลเซียมในเลือดทั้งหมด โดยร้อยละ 75 – 90 ของแคลเซียมในส่วนนี้จับอยู่กับ แอลบูมิน อีกร้อยละ 10 – 25 จับกับ alpha 2 – macroglobulin , haptoglobin , และ immunoglobulin

แคลเซียมในเซลล์

ปริมาณแคลเซียมในเซลล์น้อยมาก คืออยู่ระหว่าง 0.01 – 0.2 uM และในเม็ดเลือดแดงมีประมาณ 10 – 30 nM ซึ่งแตกต่าง จากภายนอก 10,000 เท่า [22] แคลเซียมทั้งหมดในเซลล์ทั่วๆไปกระจายอยู่ 3 รูปแบบ คือ

1. จับกับเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณที่เป็นกลัยโคโปรตีน (glycoprotein) และฟอสโฟลิปิด

2. อยู่ในออร์แกเนลล์ต่างๆ ได้แก่ เอนโดพลาสมิก เร็กติคูลัม (eoplasmic reticulm) ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และนิวเคลียส (nucleus) เป็นต้น

3. อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ในรูปจับกับโปรตีน(protein bound) ได้แก่ แคลโมดูลิน (calmodulin) และ โทรโปนิน (troponin) หรือจับกับสารที่มีประจุลบ (anion) เช่น ฟอสเฟต ซิเตรต

แคลเซียมภายในเซลล์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเซลล์ทุกชนิดทำให้สิ่งมีชีวิตดำรงชีพอยู่ได้ โดยทำหน้าที่เป็นสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signal) เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ทุกด้าน โดยเยื่อหุ้มเซลล์จะยอมให้แคลเซียมผ่านได้น้อย ควบคุมให้มีระดับแคลเซียมในเซลล์ต่ำตลอดเวลาเพื่อทำหน้าที่ส่งสัญญาณ(signal)หรือนำข่าวสาร (messenger) ได้โดยเฉพาะในภาวะพัก (resting) และเมื่อทำหน้าที่แคลเซียมสามารถแยกออกจากโปรตีนที่จับอยู่ และถูกปล่อยออกมาอย่างรวดเร็ว เป็นการเพิ่มแคลเซียมภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว (spike) ซึ่งได้มีผู้เสนอทฤษฎีการเพิ่มของแคลเซียมไว้คือ

เมื่อมีสิ่งกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ [20] เช่น ฮอร์โมน , growth factor , แสง และศักย์ไฟฟ้า ซึ่งจะไปกระตุ้นตัวรับ (receptor) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้กระตุ้นตัวส่งข่าวสารตัวที่ 2 (secondary messengers) ได้แก่ inositol (1,4,5) - triphosphate (IP_3) และ diacylglycol (DAG) ทำให้ Ca – channel เปิด แคลเซียมจากภายนอกเซลล์ และจากเอนโดพลาสมิกเร็กติคูลัม เข้าสู่ภายในไซโตพลาสซึม ซึ่งจะไปกระตุ้นกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ต่อไป

เช่น การเจริญเติบโต การส่งสัญญาณประสาท การหดตัวของกล้ามเนื้อ การหลั่งฮอร์โมน ควบคุมการทำงานของยีน (gene) เป็นต้น และการเปลี่ยนแปลง ของความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์เพียงเล็กน้อย ก็เพียงพอที่เซลล์จะตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นนั้นๆ ได้อย่างรวดเร็ว [22] (รูปที่ 2)

2.1.1 กระบวนการขนส่งแคลเซียมออกนอกเซลล์

แคลเซียมอิสระเท่านั้นที่จะถูกขนส่งออกนอกเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้ 2 กระบวนการ [23] คือ

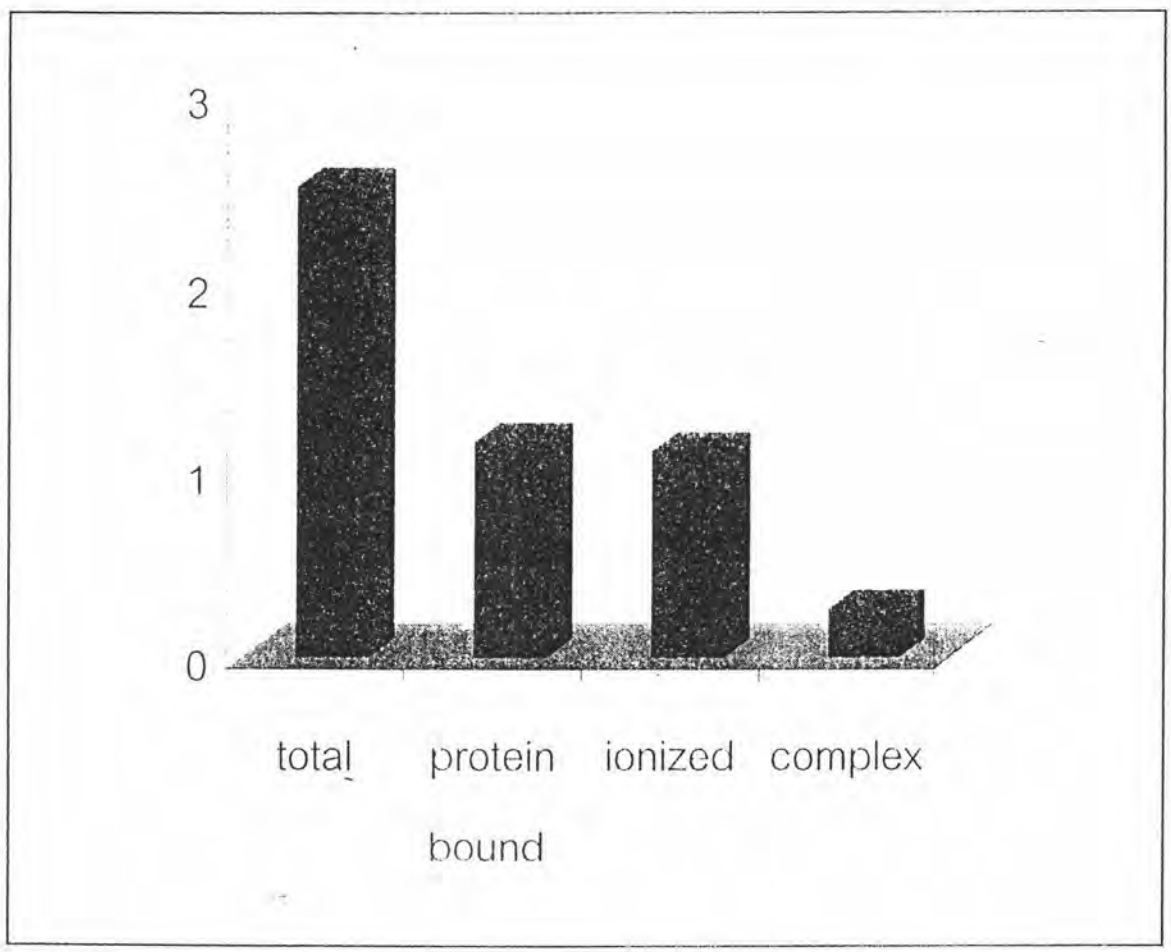
1. กระบวนการขนส่งกัมมันต์ปฐมภูมิ (primary active transport) อาศัย เอนไซม์ที่ต้องใช้ เอทีพี (ATP) เรียก แคลเซียม เอทีพีเอส (Ca – ATPase) หรือ ปั๊มแคลเซียม ทำหน้าที่ขนส่งแคลเซียมออกนอกเซลล์ ต้าน เกรเดียนท์ (against gradients of concentration and electrochemical gradients) คือสามารถกระตุ้นการขับ แคลเซียมออกนอกเซลล์ได้ แม้ว่าภายในเซลล์มีปริมาณแคลเซียมต่ำกว่าภายนอก

2. กระบวนการขนส่งกัมมันต์ทุติยภูมิ (secondary active transport) ไม่ต้องใช้ เอทีพี โดยตรงโดยใช้โปรตีนขนส่งชนิดแลกเปลี่ยน(exchanger protein)คือ Na/ Ca exchanger ทำหน้าที่ขนส่ง โซเดียมเข้าเซลล์ 3 อะตอม แลกกับดึงแคลเซียมออกไปนอกเซลล์ 1 อะตอม การที่โปรตีนขนส่งชนิดแลกเปลี่ยนสามารถขนส่ง โซเดียมเข้าเซลล์ได้ เพราะ ภายในเซลล์มีปริมาณ โซเดียมต่ำ การที่ภายในเซลล์มีโซเดียมต่ำก็เพราะโซเดียมภายในเซลล์ถูกขับออกโดยอาศัยโซเดียม โพแทสเซียม-เอทีพีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่เยื่อหุ้มเซลล์ที่ต้องใช้ เอทีพี ทำหน้าที่ขับโซเดียมออกนอกเซลล์แลกกับการดึงโพแทสเซียม เข้าในเซลล์

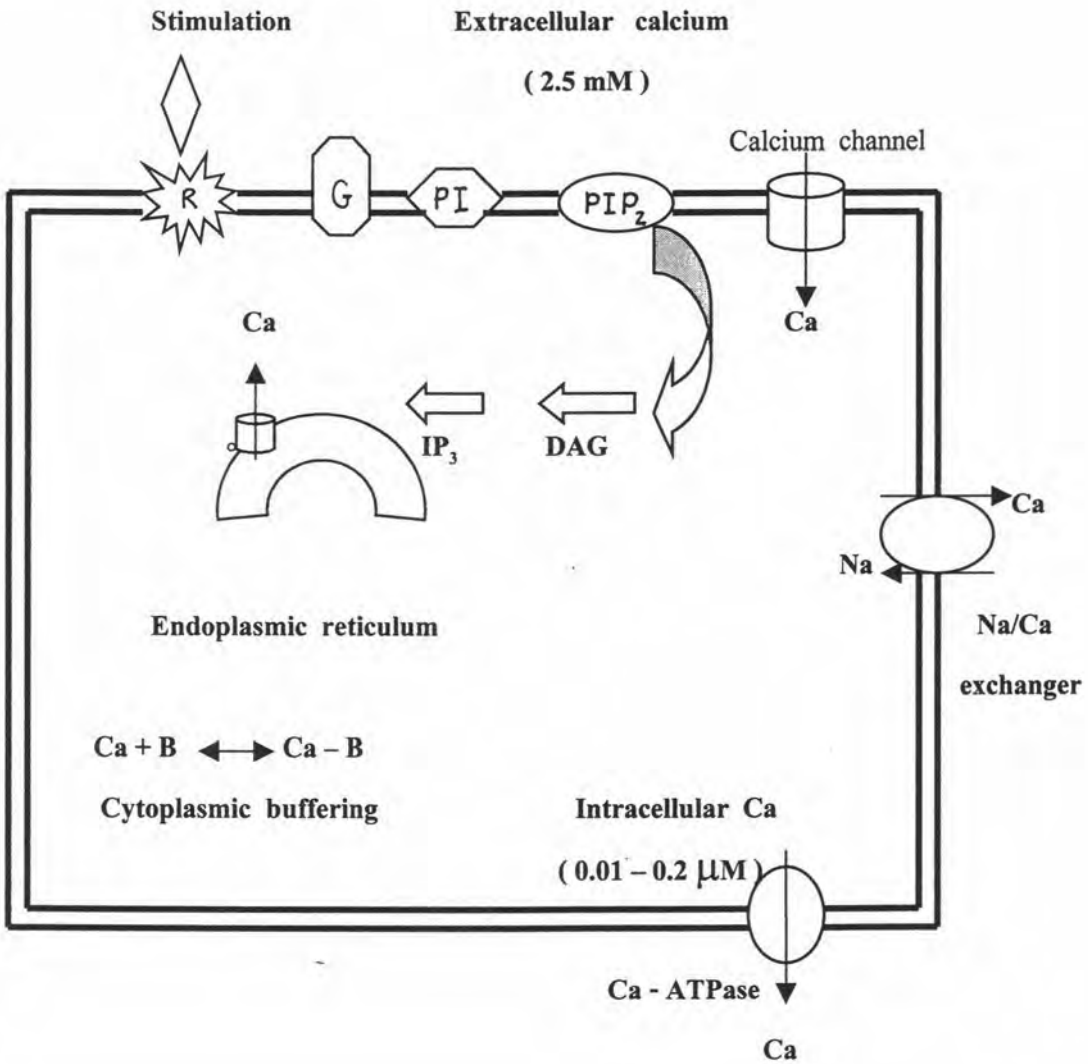
2.1.2 กระบวนการขนส่งแคลเซียมเข้าเซลล์

การขนส่งแคลเซียมเข้าเซลล์อาศัยช่องทางพิเศษที่เรียกว่าcalcium channel มี ลักษณะ คล้ายประตูปิด เปิด คือเมื่อประตูเปิดจะยอมให้ แคลเซียมผ่านเข้าเซลล์ได้ การเคลื่อนที่ของแคลเซียมเข้าในเซลล์ดังกล่าว ไม่ต้องอาศัย เอทีพี หรือกระบวนการขนส่งกัมมันต์ปฐมภูมิหรือโปรตีนขนส่งชนิดแลกเปลี่ยนเพราะปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์

รูปที่ 1 แสดงรูปแบบของแคลเซียมในเลือด



<u>รูปที่ 2</u> แสดงทฤษฎีการเพิ่ม แคลเซียม ภายในเซลล์



ต่ำกว่า ภายนอกถึง 10,000 เท่าดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อมีตัวกระตุ้นจากภายนอกเซลล์จะทำให้ calcium channel เปิดแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภาย ในเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็ว

2.1.3 วิธีการวิเคราะห์แคลเซียมภายในเซลล์ที่นิยมทั่วไป [24] ได้แก่

1. Calcium – selective microelectrode มีหลักการคือในสารละลายที่ไม่ทราบองค์ประกอบว่ามีไอออนชนิดใดนั้น สามารถคำนวณค่ากัมมันตภาพของไอออนแต่ละชนิดได้จากความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้า (electrical potential) ของเยื่อเลือกผ่านจำเพาะ (ionselective membrane) เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายที่ทราบองค์ประกอบทำให้ทราบความเข้มข้นของแคลเซียมได้

2. Bioluminescent indicators คือการศึกษาโดยใช้โปรตีนเรืองแสง (photoprotein)ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะเกิดการเรืองแสงได้เมื่อจับกับแคลเซียมไอออน และอัตราการเรืองแสงจะขึ้นกับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน

3. Metallochromic indicators เป็นวิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์โดยใช้ metallochromic dye ซึ่งจะเปลี่ยนสีเมื่อจับกับแคลเซียม

4. NMR ร่วมกับการใช้ fluorinate (^{19}F) intracellular indicator เชื่อว่าให้ค่าแม่นยำ และถูกต้องมากที่สุด แต่มีข้อจำกัดคือ เครื่องมือมีราคาแพง

5. Atomic absorbtion เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่ทำได้ง่ายแต่มีข้อจำกัด คือให้ค่าที่ไม่ถูกต้อง และไม่แม่นยำ

6. Fluorescent tetracarboxylate indicators เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด นำมาใช้วิเคราะห์ความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ตั้งแต่ปี ค. ศ. 1989 [25] ที่รู้จักกันดีคือ quin 2 , fura 2 , และ indo 1 ทั้ง 3 ชนิดนี้เป็น สารที่มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับ EGTA คือ ใน 1 โมเลกุล จะมีหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylate group) ถึง 4 หมู่ทำให้โมเลกุลของ สารข้างต้นมีขั้ว จึงผ่านเยื่อเซลล์ไม่ได้ดังนั้นได้มีการใช้อนุพันธ์ของหมู่ อะซิทอกซีเมทิล เอสเทอร์ (acetoxymethyl ester , Am group) ซึ่งมีคุณสมบัติคือไม่จับกับ แคลเซียม และผ่านเยื่อเซลล์ได้ดีเมื่อสารดังกล่าวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์แล้วจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดย เอนไซม์ เอนโดจีนัส เอสเตอเรส (endogenous esterase) ทำให้หมู่คาร์บอกซิลิกเป็นอิสระและจับกับแคลเซียมไอออนได้รวมทั้งไม่สามารถผ่าน

เยื่อหุ้มเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ด้วยเมื่อจับกับแคลเซียมแล้ว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่น (wavelength) ซึ่งนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของแคลเซียมได้

ได้สรุประดับของแคลเซียมในเซลล์ของเม็ดเลือดแดงที่วิเคราะห์โดยวิธีต่างๆ ไว้ในตารางที่ 1

2.1.4 การเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมในเซลล์เม็ดเลือดแดง

มีรายงานพบการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมในเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงกว่าเกณฑ์ปกติในโรคต่างๆ เช่นในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง[31] ผู้ป่วยโรค Cystic fibrosis[29] ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง (Chronic renal failure)[32] ผู้ป่วยโรค Sickle cell anemia[33] ผู้ป่วยโรค β - Thalassemia[34] ผู้ป่วยโรค Glucose – 6 – phosphate – dehydrogenase deficiency[35] ผู้ป่วยโรค Anemia[36] ผู้ป่วย End stage renal disease[37] ดังตารางที่ 2

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคไตวายมีค่าแคลเซียมในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย[38]

2.2 เอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส (Ca – ATPase , EC 3.6.1.3 หรือ แคลเซียมปั๊ม (calcium pump) เป็นเอนไซม์เอทีพีเอสชนิด P (phosphorylated ATPase ,P – type) เนื่องจากเกิดโครงรูป แอสปาติค ฟอสเฟต (phospho – aspartyl) หรือมีการจับกับฟอสเฟตโดยตรงบริเวณกรดอะมิโนแอสปาเตต (aspartate) เหมือนกับเอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม เอทีพีเอส และเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส ทำให้การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ถูกยับยั้งด้วย วานาเดต (vanadate) เริ่มมีการศึกษาเอนไซม์แคลเซียม – เอทีพีเอส ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อปี ค. ศ. 1961[39] พบว่าในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์แคลเซียม เอทีพีเอส ประมาณร้อยละ 0.01 – 0.1 ของโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมด[40]

2.2.1 โครงสร้างเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส

จากการศึกษาโครงสร้าง ของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส พบว่าเป็นโปรตีนแก่น (intergral protein) ที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 3) มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ประมาณ 14,000 ดาลตัน (Da) ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) คือ

หน่วยย่อย แอลฟา (α - subunit) และ หน่วยย่อย บีตา (β - subunit)มีส่วนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เป็นช่วงๆ ประมาณ 8 – 10 ช่วง และส่วนใหญ่จะยื่นเข้าไปใน ไซโตพลาสซึม (80 %) มี 3 ขอบเขต (domain) สำคัญ [41,42,43] คือ ขอบเขต ที่อยู่ระหว่างส่วนที่ 2 กับ 3 ระหว่างส่วนที่ 4 กับ 5 และส่วนที่ 10 ดังนี้

1. catalyticunitเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา ฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) และมีตำแหน่งจับกับ เอทีพี 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่มีความจำเพาะสูง (high affinity site) หรือ catalytic site มีค่า Michaelis constant (Km) เท่ากับ 1 – 2μM และ 2.5 μM และตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่ำ (low affinity site) มีค่า Km ระหว่าง 145 – 180 μ M เชื่อว่าเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อการ เปลี่ยนโครงรูป E1-P เป็นโครงรูป คือ E2-P

2. transducing unit เป็นตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลสิส ของ เอทีพี ซึ่งจะทำให้เกิดการขนส่งแคลเซียม จากภายในเซลล์สู่ภายนอกเซลล์

3. ปลาย คาร์บอกซี (COOH – terminal) เป็นบริเวณที่มีตำแหน่งสำหรับจับกับแคลโมดูลิน (calmodulin – binding domain, CaM – binding domain) รวมทั้งเป็นบริเวณที่เกิด ปฏิกิริยา ฟอสโฟริเลชัน โดย protein kinase C และ protein kinase A และเป็นตำแหน่งที่มี ลักษณะคล้ายบานพับ (hinge region) ซึ่งเกิดจากสายโซ่โพลีเปปไทด์ 2 สาย (α - helices 2 สาย) หมุนรอบแกน ที่สำคัญคือมีตำแหน่งของ autoinhibitory calmodulin binding domain

จากการศึกษาเมื่อเร็วๆนี้พบว่า เอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane Ca – ATPase : PMCA) มีรูปแบบอย่างน้อย 5 รูปแบบ และถูกควบคุมโดย multigene family สำหรับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงนั้นพบรูปแบบ PMCA 4 มากที่สุด รองลงมาคือ PMCA 1 b และ PMCA 2 [43]

ได้สรุปคุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์แคลเซียม เอทีพีเอส ไว้ในตารางที่ 3

2.2.2 การทำงานของเอนไซม์แคลเซียม เอทีพีเอส ที่เยื่อหุ้มเซลล์

เอนไซม์แคลเซียม เอทีพีเอส มีหลักการทำงานเหมือนกับ เอนไซม์ เอทีพีเอส ชนิด P ตัวอื่นๆ และจะทำงานได้เมื่อเกิดปฏิกิริยา ฟอสโฟริเลชัน ทำให้เกิด การขนส่งแคลเซียม ภายในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกนอกเซลล์ [44] และเอนไซม์จะมีการเปลี่ยนแปลง

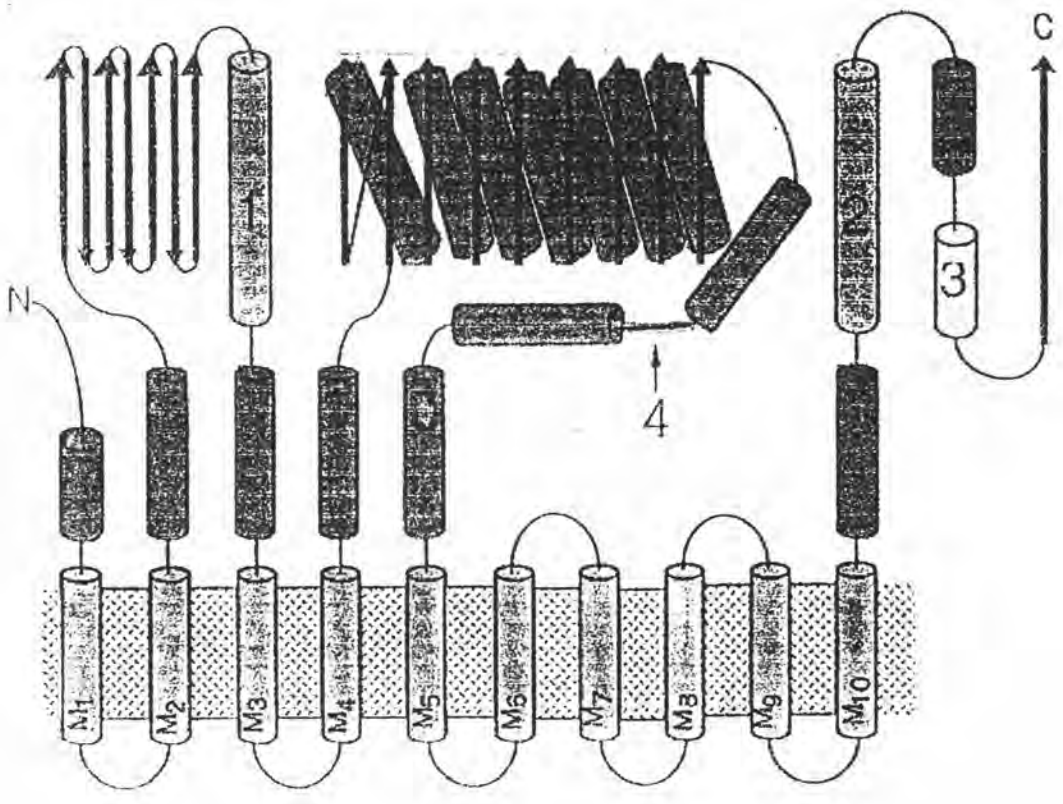
ตารางที่ 1 แสดงระดับของแคลเซียมภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่วิเคราะห์โดยวิธีต่าง ๆ

วิธีการ	(nM)	เอกสารอ้างอิง
NMR – 19F – bapta – AM	61 ± 6	Murphy et al. , 1986
Fura 2 AM (direct)	76 ± 16	Dufino , 1988
Fura 2 – AM (direct)	20	Udom ,1992
Quin 2 – AM (indirect)	29	Waller et al. ,1985
Benz 2 – Am or quin 2 – AM (indirect)	19	Rhoda et al. ,1985

ตารางที่ 2 แสดงโรคต่างๆที่พบค่าความเข้มข้นของแคลเซียมในเม็ดเลือดแดงผิดปกติ

โรค	เอกสารอ้างอิง
Essential hypertension	David – Dufilho et al. 1992 [31]
Cystic fibrosis	Waller et al. 1985 [29]
Chronic renal failure	Gafter et al. 1990 [32]
Sickle cell anemia	Eaton et al. 1984 [33]
β - Thalassemia	Shalev et al. 1984 [34]
Glucose – 6- phosphate – dehydrogrnase defiency	T urrini et al. 1985 [35]
Carcinoma with mild anemia	Engelmann et al. 1990 [36]
End stage renal insufficient	Paschen et al. 1971 [37]

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ แคลเซียม – เอทีเนส



ตารางที่ 3 แสดงคุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส

General properties of the plasma membrane Ca^{2+} pump	
Distribution	All eucaryotic cells
Molecular mass	About 134,000
Mechanism	Formation of a phosphoryiated intermediate (aspartyl phosphate)
Inhibition	Vanadate ($K_{1/2}$ about 3 μM); La^{3+} ($K_{1/2}$ about 1μM)
Charge balance	Obligatory exchange with H^+:Ca^{2+}:H^+ stoichiometry undetermined (0.5 or 1.0)
ATP affinity (Km)	High affinity site.1 – 2.5 μM Low affinity site .145 – 180 μM
Ca^{2+} affinity (Km)	~ 10μM in the resting state ~ 0.5 μM in the optimally activated state
Activators	CaM (Kd about 1μM) Polyunsaturated fatty acids , acidic phospholipid Kinase – meadiate phosphorylation (PKA , PKC) in at least isoform Oligomerization

โครงรูปได้ 2 แบบ คือโครงรูป E 1 และโครงรูป E 2การเกิดปฏิกิริยาเริ่มจากการย้ายหมู่ฟอสเฟต หมู่สุดท้ายของ เอทีพี มาที่เอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ที่เป็นโครงรูป E 1 และเกิดเป็นโครงรูป phosphorylated intermediate (E_1~P) ซึ่งใช้เวลาน้อยมาก คือมีค่า half maximal phosphorylation เท่ากับ 8 – 15 วินาที โดยมีค่า affinity ต่อแคลเซียมไอออน ขณะเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 0.2 – 7 μM

การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์แคลเซียม เอทีพีเอส ในกระบวนการขนส่งแบบกัมมันต์ มีลำดับดังนี้ (รูปที่ 4)

1. โครงรูป $\mathbf{E_1}$ จะจับกับ แคลเซียม และเอทีพี ซึ่งอยู่ภายในเซลล์โดยมีแมกนีเซียมเป็นตัวกระตุ้น เกิดเป็นโครงรูป $\mathbf{E_1 - ATP : Ca}$

2. โครงรูป $\mathbf{E_1 - ATP : Ca}$ เกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน เกิดโครงรูปเชิงซ้อนที่มีพลังงานสูง $\mathbf{E_1 \sim P : Ca}$ และขนส่งแคลเซียมไอออนออกนอกเซลล์

3. โครงรูป $\mathbf{E_1 \sim P : Ca}$ จะเปลี่ยนเป็น $\mathbf{E_2 \sim P : Ca}$ ซึ่งพร้อมสำหรับปล่อยแคลเซียมออกนอกเซลล์เมื่อขนส่งแคลเซียมไอออนออกนอกเซลล์แล้ว เกิดโครงรูป $\mathbf{E_2 \sim P}$

4. โครงรูป $\mathbf{E_2 \sim P}$ เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลสิส

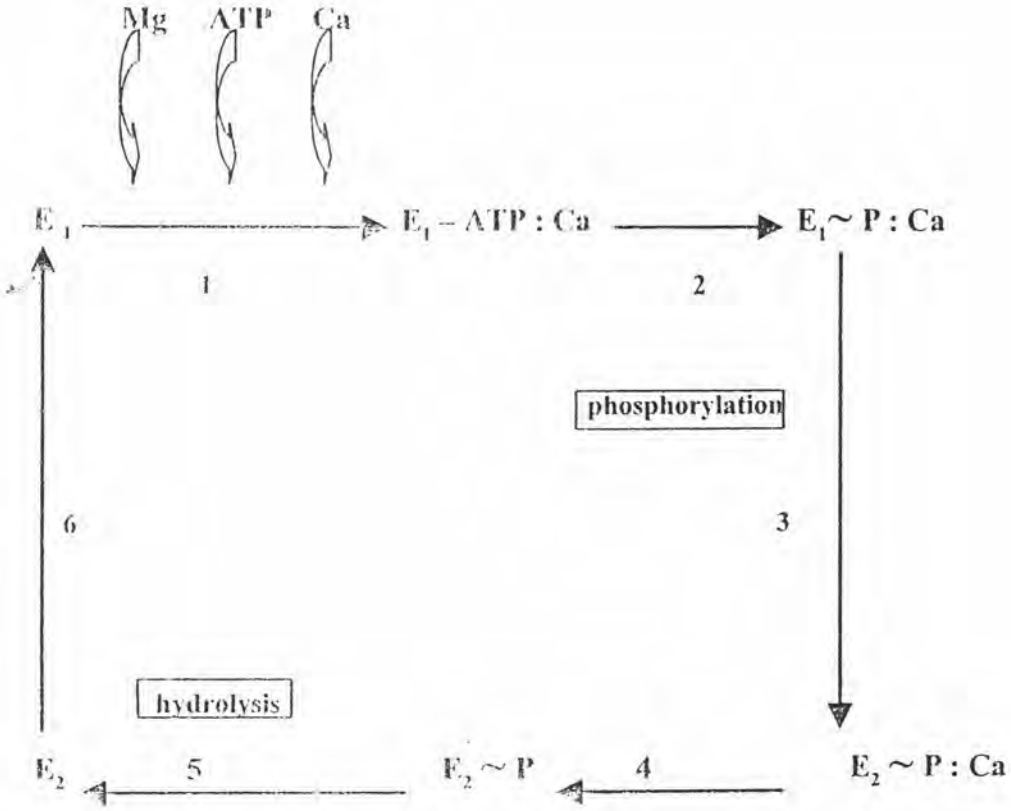
5. เคลื่อนหมู่ฟอสเฟตออกจากโครงรูป $\mathbf{E_2 \sim P}$ เกิดเป็นโครงรูป $\mathbf{E_2}$

6. โครงรูป $\mathbf{E_2}$ เปลี่ยนเป็นโครงรูป $\mathbf{E_1}$ พร้อมที่จะทำงานต่อไป

2.2.3 สารที่ช่วยหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส

1. แคลโมดูลิน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในไซโตพลาสซึมของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีโปรตีนชนิดหนึ่งที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แคลเซียมเอทีพีเอสได้ ต่อมา พบว่าโปรตีนในไซโตพลาสซึมก็คือ แคลโมดูลิน ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญที่สุด [41] ซึ่งมีกระบวนการกระตุ้น 2 กระบวนการคือ การจับกันโดยตรงของ แคลโมดูลิน กับเอนไซม์แคลเซียม เอทีพีเอส และการกระตุ้นของ แคลโมดูลิน โดยอาศัย protein kinase ร่วมด้วย และมีอัตราส่วนของแคลโมดูลิน ต่อเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส เท่ากับ 1 ต่อ 1 เมื่อ แคลโมดูลิน จับกับเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ที่บริเวณตำแหน่งจำเพาะแล้ว ทำให้ค่า ความจำเพาะต่อแคลเซียม และอัตราการขนส่ง (maximal transport rate) ของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยา ฟอสโฟริเลชัน

รูปที่ 4 แสดงขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์แคลเซียม – เอทีพีเอส



2. ตัวกระตุ้นอื่นๆ ได้แก่ polyunsaturated fatty acid, acidic phospholipid, kinase- mediated phosphorylation ทั้ง protein kinase A และ C (PKA, PKC), proteolysis และ oligomerization [41]

2.2.4 สารที่ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส

1. Lanthanides (La^{3+}) จะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลสิส ของโครงรูป phosphorylated intermediate [41]

2. Orthovanadate [VO3 (OH)]$^{2-}$ เป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ เอทีพีเอส ชนิด P รวมทั้งพบว่า ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอสด้วย โดยจับกับกรดอะมิโน แอสปาติค (aspartic amino acid) ของ โครงรูป E2 ทำให้ยับยั้งการเปลี่ยนโครงรูป E2 เป็นโครงรูป E1[41]

3. ตัวยับยั้งที่ไม่จำเพาะเช่น quercetin, suramin sodium , vinblastine [41]

4. ฮอร์โมนหลายชนิดมีฤทธิ์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส เช่น vasopressin, glucagon [45]

2.2.5 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีเอส

วิธีการที่นิยมใช้เพื่อการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ แคลเซียมเอทีพีเอส มี 2 วิธี คือ

1. การศึกษาค่ากัมมันตภาพ หมายถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ในการย่อยสลาย เอทีพี แล้ววัดปริมาณฟอสฟอรัสอิสระ (free phosphorus) ที่เกิดขึ้น ต่อหน่วยความเข้มข้นของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ต่อหน่วยเวลา (nmol/ Pi/ mg. Protein/hr.) [46]

2. การศึกษาอัตราการขนส่งแคลเซียม ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Ca efflux) โดยการใช้ 45 Ca ซึ่งเป็นสารไอโซโทป (isotope) ใส่ไว้ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (medium) ทีอยู่ในสภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสม นำมา ฟักเลี้ยง (Incubate) กับเซลล์ที่ต้องการศึกษา ภายในเวลาที่กำหนด วัดอัตราการขนส่ง 45 Ca ออกนอกเซลล์ โดยคำนวณ อัตราการขนส่งไอออนต่อจำนวนเซลล์ต่อหน่วยเวลา[47]

2.2.6 การเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ในโรคต่างๆ

มีรายงานการศึกษาค่ากัมมันตภาพ ของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง หรือเพิ่มขึ้นในโรคต่างๆ เช่นผู้ป่วยโรค Cystic fibrosis [48] ผู้ป่วยโรค Sickle cell anemia [49] ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง (chronic renal failure) [50] มีค่ากัมมันตภาพเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลงหรือ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ในขณะที่ ผู้ป่วยโรคจิต (Psychiatric) [51] ผู้ป่วยโรค Duchenne' s muscular dystrophy [52] และผู้ป่วยที่เป็น familial benign hypercalcemia [53] มีค่ากัมมันตภาพ ของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส ที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง เพิ่มขึ้น หรือสูงกว่ากลุ่มควบคุม (ดังตารางที่ 4)

2.3 ความเป็น กรด – ด่าง ภายในเซลล์

การที่เซลล์ในร่างกายจะดำเนินไปอย่างปกตินอกจากจะต้องมีตัวกระตุ้นหรือสัญญาณต่างๆ รวมทั้ง อุณหภูมิที่เหมาะสมภายในเซลล์ แล้วยังต้องการ ความเป็นกรด - ด่าง ที่พอเหมาะอีกด้วย เนื่องจากกระบวนการทางชีวเคมีหรือ เมตาบอลิสมต่างๆ ในร่างกาย ต้องใช้เอนไซม์ โดยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีให้เกิดขึ้น และเอนไซม์จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดนั้นขึ้นอยู่กับ ความเป็นกรด – ด่าง ในเซลล์[54] แต่เนื่องจาก ในแต่ละวันความเป็นกรด – ด่างในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งมีสาเหตุจากภายในร่างกายเอง หรือได้รับจากภายนอก คือเกิดจาก ระบบเมตาบอลิสมของเซลล์ และจากอาหารที่ร่างกายได้รับในแต่ละวัน ซึ่งเมื่อได้ผ่านการเผาผลาญแล้ว จะให้เมตาบอไลท์ (metabolites) ที่มีฤทธิ์ เป็นกรด หรือ ด่างก็ได้ แต่โดยรวมแล้ว ทำให้ร่างกายหรือเซลล์เป็นกรด มากขึ้น หากสมดุลของกรด – ด่าง เปลี่ยนแปลงไป มีผลทำให้ปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ เกิดขึ้นเร็ว หรือช้าเกินไป ย่อมมีผลต่อการทำงานของเซลล์ และเกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ดังนั้น เซลล์จำเป็นต้องมีกลไกบางอย่างเพื่อขับกรดที่เกินนี้ออกไปเพื่อรักษาสมดุลย์ของความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์ และยังมีกลไกที่จะป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด – ด่าง ด้วย ระบบ บัฟเฟอร์ (buffer) หลายชนิด

ในการศึกษาค่า ความเป็นกรด – ด่าง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิสมในร่างกาย นิยมศึกษาค่า ความเป็นกรด – ด่าง ในเลือดซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายนอกเซลล์ แต่ความจริงแล้วความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์น่าจะบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิสม

ของร่างกายได้ดีกว่าเนื่องจากเมตาบอลิสมของร่างกายเกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าความเป็นกรด – ด่าง ภายนอกเซลล์ และค่าความเป็นกรด – ด่างภายในเซลล์ อาจจะไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค่าความเป็น กรด – ด่าง ภายในเซลล์ขึ้น

2.3.1 วิธีการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์[55]

1. weak acid / base distribution มีหลักการคือเมื่อกรดอ่อน และเบสอ่อนแตกตัวจะเกิดความแตกต่างของประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ และจะคำนวณค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์ได้

2. pH microelectrode ใช้หลักการเดียวกันกับ glass sensitive electrode แต่จะมีขนาดเล็กมาก

3. tissue homogenate และ lysate โดยศึกษาค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์ ที่แตกแล้ว

4. chemical equilibrium ศึกษาค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายใน เซลล์ โดยใช้ปฏิกิริยาเคมี

5. colorimeter และ fluorescent probe ใช้หลักการเปลี่ยนสี และการเปลี่ยนความยาวคลื่นของ fluorescent

6. nuclear magnetic resonance (NMR) เป็นวิธีการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์ที่ให้ค่าถูกต้อง แม่นยำมากที่สุด

ได้แสดงการวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ ไว้ในตาราง ที่ 5

2.3.2 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง

มีรายงานพบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์ในผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูง[58] ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง[59] และผู้ป่วยโรคมะเร็ง[59]

2.3.3 ระบบบัฟเฟอร์ภายนอกเซลล์

บัฟเฟอร์นอกเซลล์ (Extracellular buffer)[55] ควบคุมโดยระบบ

1. ไบคาร์บอเนต / กรดคาร์บอนิก (HCO_3^- / H_2CO_3 system)

ตารางที่ 4 แสดงโรคต่างๆที่พบความผิดปกติของเอนไซม์ แคลเซียม เอทีพีเอส

โรค	เอกสารอ้างอิง
ต่ำกว่าปกติ	
Cystic fibrosis	Ansah and Katz 1980[48]
Sickle cell disease	Bookchin and Lew 1980[49]
Chronic renal failure	Gafter et.al 1989[50]
สูงกว่าปกติ	
Psychiatric	Monti 1989[51]
Duchenne's muscular dystrophy	Dunn et.al[52]

ตารางที่ 5 แสดงวิธีการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด – ด่าง ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีต่างๆ

วิธีการ	pH	เอกสารอ้างอิง
NMR	7.31	Monti et.al , 1987
NMR	7.22	Vanida ,1997
Fluorescent (BCECF)	7.33	Amalia et.al ,199-

2.ระบบบัฟเฟอร์ที่เกิดจาก โปรตีน และสารประกอบฟอสเฟตในพลาสมา ทั้ง 2 ระบบสามารถบัฟเฟอร์กรด ได้ประมาณ ร้อยละ 40 – 50 ของปริมาณกรดทั้งหมด

2.3.4 บัฟเฟอร์ในเซลล์ (Intracellular buffer)

ควบคุมโดย 3 กระบวนการคือ (รูปที่ 5)

1. การบัฟเฟอร์ด้วยโปรตีนภายในเซลล์ ได้แก่ ฮีสติดีน
2. การควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยา ไฮโดรไลสิส ของ เอทีพี
3. การขับโปรตอนออกนอกเซลล์ [60]

เซลล์มีกลไกที่จะรักษาความ สมดุลของกรด – ด่าง ภายในเซลล์ด้วยการขับกรดหรือโปรตอนโดยการขนส่งโปรตอนออกเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดย 2 กระบวนการคือ

1. กระบวนการขนส่งกัมมันต์ปฐมภูมิ อาศัยเอนไซม์ที่ใช้งใช้ เอทีพี ได้แก่ เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส (H, K – ATPase หรือ K – ATPase) และเอนไซม์ไฮโดรเจน เอทีพีเอส (H – ATPase) หรือปั๊มโปรตอน จะกระตุ้นการขับโปรตอนออกนอกเซลล์

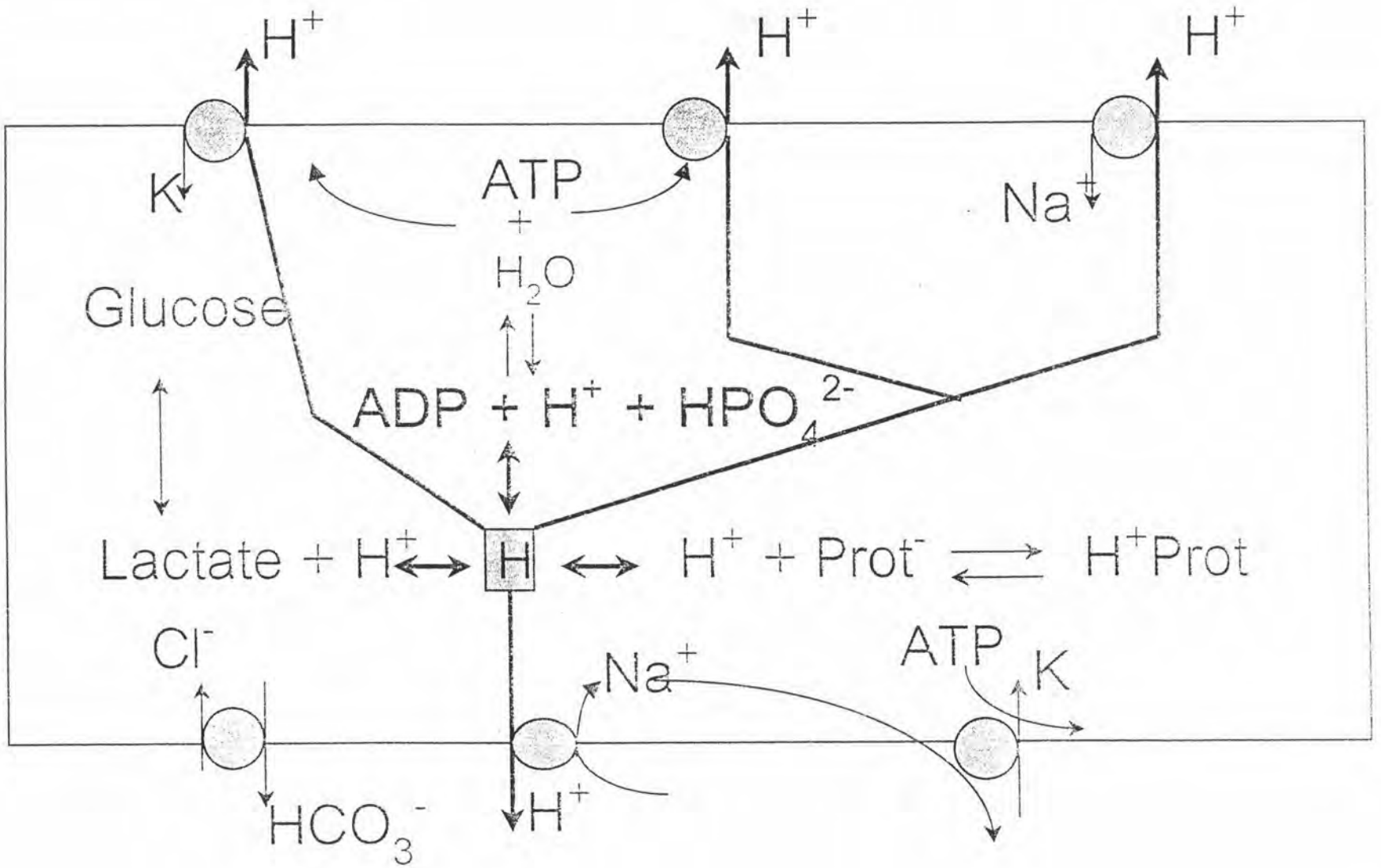
2. กระบวนการขนส่งกัมมันต์ทุติยภูมิ ใช้โปรตีนขนส่งที่เยื่อหุ้มเซลล์ คือ Na / H exchanger ทำหน้าที่ขนส่งโซเดียมเข้าเซลล์ แลกกับการดึง โปรตอนออกไปนอกเซลล์โดยไม่ใช้ เอทีพีโดยตรง

โดยเหตุที่รายงานนี้ศึกษา H, K – ATPase ดังนั้นจะกล่าวถึงลักษณะ และความสำคัญของเอนไซม์ชนิดนี้ต่อไป

2.4 เอนไซม์ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส (H,K – ATPase)

เป็นเอนไซม์ เอทีพีเอสที่ค้นพบได้ไม่นาน และเริ่มมีการศึกษาเมื่อ 15ปี ที่ ผ่านมา โดยได้ทำการศึกษาในเยื่อเมือกกระเพาะอาหาร (gastric mucosa) [61] และพบว่า เป็นโปรตีนแก่น (intergral protein) ที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ สลาย เอทีพี ให้เป็นพลังงาน และพลังงานที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการขนส่งไฮโดรเจน ไอออน หรือโปรตอนออกนอกเซลล์ แลกกับการขนส่งโพแทสเซียม เข้าเซลล์ โดย เอนไซม์ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส สลายเอทีพี1 โมเลกุลจะเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างไฮโดรเจนและโพแทสเซียม ในอัตราส่วน 1 : 1

รูปที่ 5 แสดงระบบบัฟเฟอร์ในเซลล์



จากการศึกษาเมื่อเร็วๆนี้ พบว่า เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส มีรูปแบบ (isoform) จำนวนมาก ที่ถูกควบคุมโดย ยีน(gene) ต่างๆ กัน และยังพบว่าเนื้อเยื่ออื่นๆก็มี เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เช่นกัน[62] เชื่อว่าเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส นอกจากจะมีความสำคัญ เกี่ยวกับการทำงานของกระเพาะอาหารแล้ว ยังมีความจำเป็นกับเนื้อเยื่ออื่นๆ ด้วย โดยเฉพาะที่ไตนอกจากมีบทบาทสำคัญในการควบคุม กรด – ด่าง แล้วยังควบคุมระดับโพแทสเซียมในเลือดด้วยถ้าเอนไซม์ทำงานลดลงจะทำให้เกิดความ ผิดปกติของ กรด – ด่าง และสูญเสีย โพแทสเซียมออกทางปัสสาวะ ทำให้ระดับโพแทสเซียมในเลือดลดลง (hypokalemia)[63]

2.4.1 โครงสร้างเอนไซม์ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส

โครงสร้างพื้นฐานของเอนไซม์ไฮโดรเจนโพแทสเซียม-เอทีพีเอสคล้ายกับ เอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม เอทีพีเอส ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) ได้แก่ หน่วยย่อย แอลฟา (α - subunit) และหน่วยย่อย บีตา (β - subunit)[62]

หน่วยย่อย แอลฟา มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100 กิโลดาลตัน (Kda) ประกอบด้วย กรดอะมิโน 1,035 ตัวเรียงตัว เป็นสายโพลีเปปไทด์ โดยที่สายโพลีเปปไทด์ส่วนใหญ่ รวมทั้ง ส่วน ปลาย อะมิโน (N – terminal) ปลายคาร์บอกซี (C – terminal) อยู่ทางด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ และมีบางส่วนของ โซ่โพลีเปปไทด์เรียงตัวแทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์เป็นช่วงๆ ประมาณ 7 – 10 ช่วง สายของโซ่โพลีเปปไทด์ที่อยู่ระหว่างส่วนที่ 4 กับส่วนที่ 5 จะมีตำแหน่งให้ATPเข้ามาจับได้เชื่อว่ากรดอะมิโนไลซีนทางด้านปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีเป็นตำแหน่งให้ ไฮโดรเจน ไอออน เข้ามาจับ

หน่วยย่อย บีตา (β - subunit) เป็น glycoprotein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 – 90 กิโลดาลตัน (Kda) ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 294 ตัว โซ่โพลีเปปไทด์ของหน่วยย่อยบีตา เรียงตัวแทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์เพียงช่วงเดียว โดยที่กรดอะมิโนประมาณ 36 ตัว ที่อยู่ปลายคาร์บอกซีอยู่ทางด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ และกรดอะมิโนอีก 224 ตัว ด้านปลายอะมิโน อยู่นอกเยื่อหุ้มเซลล์ เชื่อว่าหน่วยย่อย บีตา ควบคุมปริมาณของเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส และจำเป็นต่อการขนส่ง หรือการเคลื่อนย้าย เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส จากเอนโดพลาสมิก เร็กติคูลัม มาแทรกตัวและเรียงตัวอยู่ใน

เยื่อหุ้มเซลล์ให้ถูกต้อง ซึ่งเหมือนกับ หน่วยย่อย บีตาของเอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม เอทีพีเอส (รูปที่ 6)

จากการศึกษาพบว่า ลำดับของการเรียงตัวของกรดอะมิโนบนโซ่โพลีเปปไทด์ของหน่วยย่อย แอลฟา มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม เอทีพีเอส ถึง 60 % และหน่วยย่อยบีตา ของเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส มีโครงสร้างคล้ายกับหน่วยย่อยบีตา 1 และ บีตา 2 ของเอนไซม์ โซเดียม โพแทสเซียม เอทีพีเอส ถึง 30 % และ 37 % ตามลำดับ

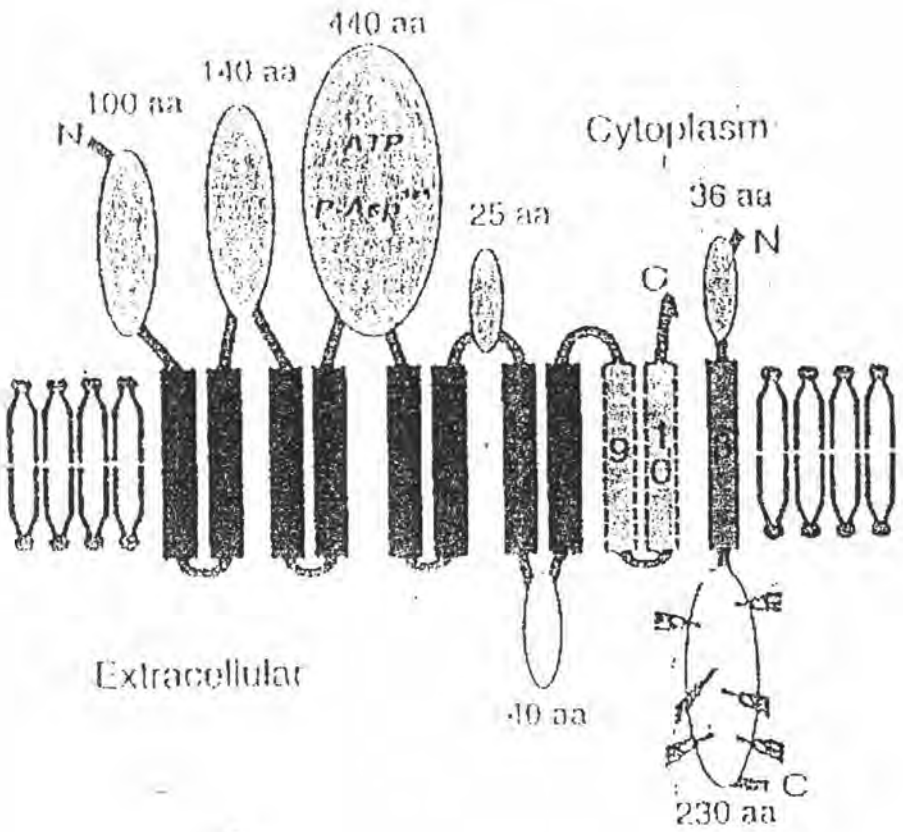
2.4.2 การควบคุมการทำงานของ เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส

เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส นอกจากทำหน้าที่ขับโปรตอนออกมาในกระเพาะอาหารหรือในรูหลอดฝอยไตที่บริเวณ cortical collecting duct ยังทำหน้าที่ดูดกลับโพแทสเซียมเข้าสู่เซลล์ด้วย ดังนั้นถ้าเอนไซม์ทำงานลดลงนอกจากจะทำให้เกิด ภาวะเซลล์เป็นกรดยังทำให้สูญเสียโพแทสเซียมออกไปในทางเดินอาหารและในปัสสาวะด้วย (โพแทสเซียม reabsorption ลดลง) และเอนไซม์นี้จะทำงานเพิ่มขึ้นในภาวะร่างกายขาดโพแทสเซียม [63] และถูกยับยั้งได้ด้วย omeprazole (โดยใช้เป็นยาทำให้การขับกรดในกระเพาะลดลง) และสารวานาเดต [62]

2.4.3 การศึกษาการเปลี่ยนของ เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส

การศึกษา เอนไซม์ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอสยังมีไม่มากนัก เนื่องจากเป็น เอทีพีเอสที่เพิ่งพบได้ไม่นาน โรคที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส ได้แก่ โรค distal renal tubular acidosis (dRTA) ที่เกิดร่วมกับภาวะโพแทสเซียมในเลือดต่ำที่มีรายงานพบว่าค่ากัมมันตภาพของ เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส ที่ collecting tublue ลดลง ทำให้ขับกรดออกทางรูหลอดฝอยไตไม่ได้ และสูญเสีย โพแทสเซียมออกทางปัสสาวะ [63] มีรายงานการศึกษาในสัตว์ทดลอง dRTA ที่ให้ โซเดียมวานาเดต เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำให้เกิดภาวะ โพแทสเซียมในเลือดต่ำด้วย [64] และการศึกษาเมื่อเร็วๆนี้พบว่า ในผู้ป่วยโรคท้องร่วง มีค่ากัมมันตภาพ ของ เอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง ด้วย[65]

รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ไฮโดรเจน โพแทสเซียม – เอทีพีเอส



2.4.4 การเกิดปฏิกิริยาในขบวนการขนส่ง โดยไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส

เมื่อเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม เอทีพีเอส ทำงานจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (conformation change) ของเอนไซม์ได้เป็น 2 โครงรูป คือโครงรูป E_1 และ E_2 เป็นลำดับ[62] ดังนี้ (รูปที่ 7)

1. โครงรูป E_1 จะจับกับ ไฮโดรเจน และ เอทีพี ภายในเซลล์ มีแมกนีเซียมเป็นตัวกระตุ้นเกิดเป็นโครงรูป $E_1 - ATP : H$

2. โครงรูป $E_1 - ATP : H$ เกิดปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน ย้ายหมู่ฟอสเฟตตัว สุดท้าย ของเอทีพี ไปที่กรดอะมิโน Aspartic ตำแหน่งที่ 385 ทำให้เกิดโครงรูป ที่มีพลังงานสูง **E1 ~ P : H** ซึ่งพร้อมสำหรับขนส่งไฮโดรเจนออกนอกเซลล์

3. เมื่อขนส่งไฮโดรเจนออกนอกเซลล์ โครงรูป **E1 ~ P : H** จะเปลี่ยนเป็นโครงรูป **E2 ~ P**

4. โครงรูป **E2 ~ P** จะจับกับโพแทสเซียม ด้านนอกเซลล์เกิดเป็นโครงรูป **E2 ~ P : K**

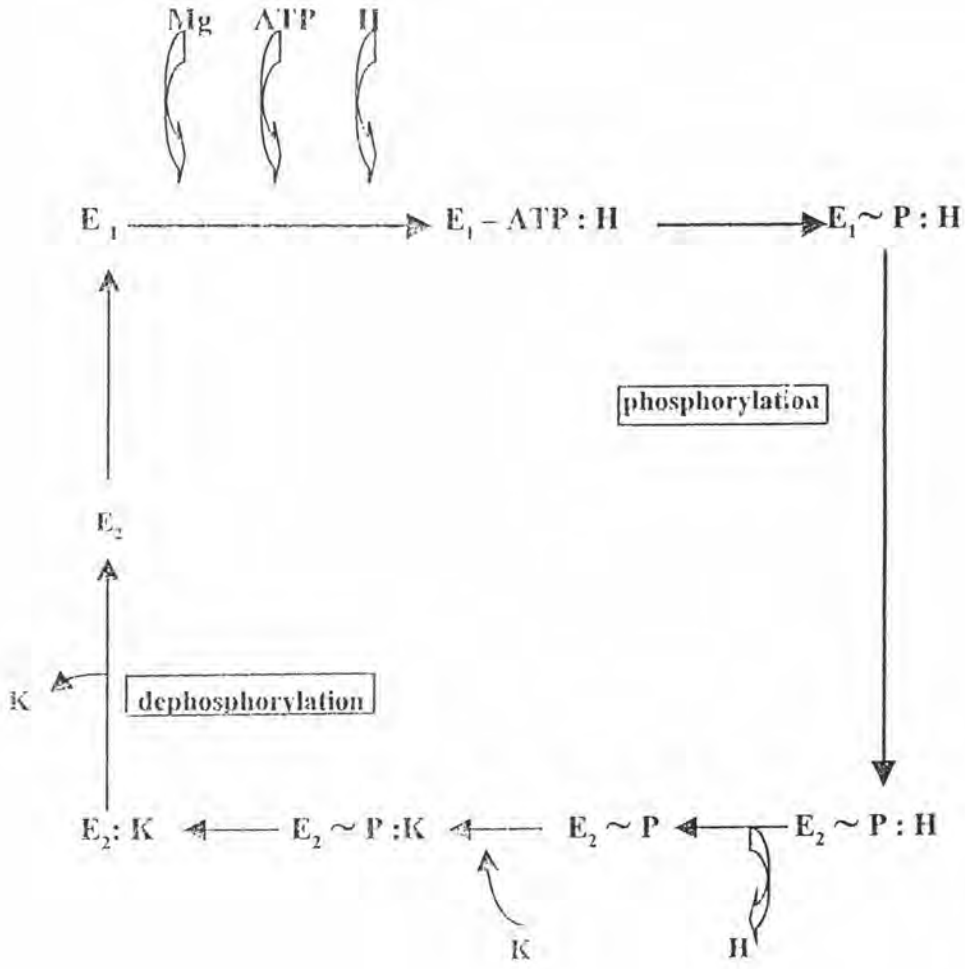
5. โครงรูป **E2 ~ P : K** เกิด ปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันอีกครั้งหนึ่ง ทำให้ฟอสเฟตถูกปล่อยออกจากตัวเอนไซม์ เกิดโครงรูป **E2 : K** และทำให้ โพแทสเซียมถูกปล่อยเข้าในเซลล์

6. เมื่อโพแทสเซียมถูกปล่อยเข้าในเซลล์แล้วจะมีการเปลี่ยนโครงรูปเป็นโครงรูป **E1** พร้อมที่จะจับกับไฮโดรเจนภายในเซลล์ต่อไป

2.4.5 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม – เอทีพีเอส

นิยมศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ไฮโดรเจน โพแทสเซียม – เอทีพีเอส โดยการวัดปริมาณฟอสฟอรัสอิสระที่เกิดขึ้นจากการสลาย เอทีพี เช่นเดียวกันกับการศึกษาเอนไซม์แคลเซียม – เอทีพีเอส [66]

รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรเลส โพแทสเซียม – เอทีพีเอส



จากการพบการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ แคลเซียม - เอทีพีเอส และเอนไซม์ไฮโดรเจน โพแทสเซียม – เอทีพีเอส ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ในโรคต่างๆ ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดแดงน่าจะเป็นตัวแทนของเนื้อเยื่ออื่นได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ตัวอย่างในการศึกษาเนื่องจากมีความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และไม่เป็นอันตรายต่อประชากรที่ศึกษา การที่เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่มีออร์แกเนลล์ ทำให้ง่ายต่อการศึกษาเอนไซม์ในเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย