

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

เรื่อง

ความผิดปกติด้านชีวเคมีของไมโทคอนเดรียในโรคกล้ามเนื้อ
Biochemical Abnormalities of Mitochondria in Neuromuscular Disease

ทุน

วิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

โดย

ธาดา	สิงหเสนีวงศ์
สังคม	จงพิพัฒน์วณิชย์
ธีระศักดิ์	วรภักดิ์สุบรร

รหัส
ศ 15
010585

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
กุมภาพันธ์ 2542

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

เรื่อง



ความผิดปกติด้านชีวเคมีของไมโทคอนเดรียในโรคกล้ามเนื้อ

Biochemical Abnormalities of Mitochondria in Neuromuscular Disease

ทุน

วิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

โดย

ธาดา

สีบลินวงศ์

สังคม

จงพิพัฒน์วณิชย์

ธีระศักดิ์

นรภัคดีสุนทร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2542

24 ก.ย. 2546

I20141695

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการผู้อนุมัติทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540 และคณะกรรมการประเมินและติดตามงานวิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบคุณอย่างสูงต่อ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ประกิต เทียนบุญ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์พงศ์ศักดิ์ ยุกตะนันท์ แพทย์ประจำบ้าน พยาบาล และเจ้าหน้าที่ห้องผ่าตัด ภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อตลอดงานวิจัย

ขอบคุณ น.ส.อัญชลี ก่องศรีสุข และคุณเอกชีพ นิเวศน์วงศ์กุล ซึ่งช่วยงานพิมพ์คอมพิวเตอร์ในรายงานนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่

เลขทะเบียน 010 585

วัน,เดือน,ปี 18 มี.ย. 40

บทคัดย่อ

อาการแสดงทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อลีบจากความผิดปกติของไมโทคอนเดรียจะคล้าย ๆ กันในกลุ่มโรคต่าง ๆ อาการเหล่านี้ได้แก่ กล้ามเนื้ออ่อนแรงลงเป็นลำดับ ระดับแลคเตตรทและไพรูเวทในเลือดสูงเกินปกติ การตรวจทางห้องปฏิบัติการเช่น การตรวจกล้ามเนื้อด้วยเทคนิคทางพยาธิวิทยาและการย้อมพิเศษ ตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติในระดับดีเอ็นเอ และปริมาณวิเคราะห์เพื่อหาระดับการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ห้วงลูกโซ่หายใจถูกนำมาใช้เป็นเครื่องช่วยการวินิจฉัยแยกโรคกล้ามเนื้อลีบจากความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย แต่เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานค่าปกติในคนไทยของ Specific activity ของกลุ่มเอนไซม์ห้วงลูกโซ่หายใจแต่ละกลุ่ม คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อจากผู้ป่วยที่ต้องได้รับการผ่าตัดกระดูก จากภาควิชาออร์โทปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 75 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ เพื่อหาค่าปกติของกลุ่มเอนไซม์ Complex I, II, III, IV, Complex I-III, II-III และ Complex V ทั้งในกล้ามเนื้อสด และในไมโทคอนเดรียจากกล้ามเนื้อ ค่าปกติที่คำนวณได้อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับค่าที่ยอมรับกัน นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ห้วงลูกโซ่หายใจในตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อ 56 ตัวอย่าง พบว่าแต่ละตัวอย่างจะพบความผิดปกติของเอนไซม์ที่ลดต่ำลงมากกว่าหนึ่งถึงสอง หรือมากกว่าสองกลุ่มเอนไซม์ ไม่ค่อยพบความผิดปกติของกลุ่มเอนไซม์เพียงกลุ่มใดกลุ่มเดียวในผู้ป่วยคนไทย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Clinical manifestations found in mitochondrial myopathies are similar in most of the disease syndromes which include progressive muscle weakness and high blood level of lactate and pyruvate. Laboratory investigations namely : histopathological study of muscle fibers with special stains; analysis of mitochondrial DNA and quantitation of the respiratory chain enzyme complexes are known to be important tools in the differential diagnosis of mitochondrial disease syndromes. Since there are no known normal values of the mitochondrial respiratory chain enzyme complexes for Thai ethnic group. We collected 75 human muscle samples from patients admitting for bone surgery at Orthopedics Surgery Department, King Chulalongkorn Hospital. Muscle homogenate and mitochondrial homogenate were prepared from each muscle sample and analyzed for Complex I, II, III, IV, Complex I-II; II-III and V Normal value of Specific activity of each complex is established which is within acceptable range. We also analyzed 56 muscle biopsies taken from patients exhibiting muscle abnormalities for the specific activity of mitochondrial enzyme complexes. Deficit of more than one or two complexes were more common than single abnormality in most studied Thai cases.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
บทนำ	1
สืบค้นเอกสาร	4
วัสดุวิธีการ	16
ผลการวิจัย	23
วิจารณ์ผลการวิจัย	37
สรุปผลการวิจัย	40
เอกสารอ้างอิง	41



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทนำ

โรคกล้ามเนื้อ (myopathies) พบได้ในผู้ป่วยไม่จำกัดอายุ อาการแสดงที่ชี้บ่งถึงความผิดปกติในการทำงานของกล้ามเนื้อลายในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้แก่ อาการแขนขาไม่มีแรง มีความผิดปกติในการเคลื่อนไหว ถ้าเป็นเด็กเล็กอาจพบว่ามีการพัฒนาการของร่างกายช้า เช่น คลาน นั่ง ยืน เดินได้ช้ากว่าปกติ หรืออาจพบมีขนาดของกล้ามเนื้อเล็กลีบ กระทั่งถึงขั้นเกิดความพิการได้ ทั้งนี้อาการแสดงจะรุนแรงมาก หรือน้อยขึ้นอยู่กับสาเหตุ อายุที่พบและระยะเวลาที่เริ่มเป็นจนกระทั่งได้รับการวินิจฉัยและรักษา อาการแสดงออกถึงความผิดปกติของกล้ามเนื้ออาจแบ่งเป็น 3 ลักษณะ⁽¹⁾

1. Muscular dystrophies อาการแสดงในกลุ่มนี้จะพบว่า กล้ามเนื้ออ่อนแรง มักปรากฏอาการช้า ๆ และค่อยทวีความรุนแรง จนไม่สามารถเดิน หรือเคลื่อนไหว
2. ลักษณะสำคัญที่พบบ่อยได้แก่ ความผิดปกติในกระบวนการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์พลังงานจากสารอาหารและสารตัวกลางจากวิถีเมตาบอลิซึม ดังนั้นจึงไม่ทนต่อการออกกำลังกายที่กินเวลา มักเกิดกล้ามเนื้อล้า เกร็งได้ง่ายหรือมี exercise intolerance
3. กลุ่มนี้มาด้วยอาการเกิดอัมพาตเฉียบพลันของกล้ามเนื้อ เนื่องจากมีความผิดปกติในกลไกการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อ

โรคกล้ามเนื้ออีกกลุ่มอาการต่าง ๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่เกิดจากมีความผิดปกติของยีน ทั้งยีนที่อยู่บนโครโมโซมและยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย ดังนั้น จึงสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรม ซึ่งแบ่งลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมออกได้ดังนี้

- ก. X-linked recessive ได้แก่ Duchenne's และ Becker's muscular dystrophies ซึ่งความผิดปกติของยีนส่งผลให้โปรตีน dystrophin ในเซลล์กล้ามเนื้อผิดปกติ
- ข. Autosomal dominant ได้แก่ Limb Girdle muscular dystrophy type I (LGMD 1) ความผิดปกติอยู่บน chromosome 5
- ค. Autosomal recessive ได้แก่ Limb Girdle muscular dystrophy type II (LGMD 2)⁽²⁾

โรคกล้ามเนื้อซึ่งเกิดจากความผิดปกติของ autosomal gene จะแสดงความผิดปกติของโปรตีนซึ่งเรียกรวมว่า dystrophin associated proteins ที่พบกระจายอยู่ใน membrane cytoskeletal ของ myofibers โปรตีนกลุ่มนี้ถูกแบ่งย่อยออกเป็น dystroglycan, sarcoglycan และ syntrophin subcomplexes ความผิดปกติของโปรตีนกลุ่มนี้จะพบใน Limb Girdle muscular dystrophy type II (LGMD 2), sarcoglycan เป็น glycoprotein ซึ่งแบ่งชนิดย่อยได้เป็น

- α - sarcoglycan
- β - sarcoglycan พบเฉพาะใน striated muscle (skeletal & cardiac)
- γ - sarcoglycan
- δ - sarcoglycan

จึงทำให้ Limb Girdle muscular dystrophies type II ถูกแบ่งย่อยเป็น LGMD 2A, LGMD 2B, LGMD 2C ฯลฯ

โรคกล้ามเนื้ออาจแบ่งตามช่วงอายุที่เริ่มแสดงอาการผิดปกติ แบ่งตามตำแหน่งของเซลล์ที่เกิดพยาธิสภาพ หรือแบ่งตามพยาธิสภาพที่พบในชั้นเนื้อ การแบ่งตามพยาธิสภาพเป็นวิธีดั้งเดิม และแยกโรคกล้ามเนื้อเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. Muscular dystrophy โครงสร้างของเซลล์กล้ามเนื้อเสียหาย และมีเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrous tissue) เข้าไปแทรกแทนที่เซลล์กล้ามเนื้อ มีสาเหตุจากผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, Limb Girdle muscular dystrophy

2. Myopathy โครงสร้างเซลล์กล้ามเนื้อยังคงดี ไม่ถูกทำลาย แต่ไม่พบเนื้อเยื่อไขมัน อาจพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแทรกอยู่ สาเหตุของความผิดปกติมีทั้งที่เกิดจากพันธุกรรมและไม่ใช่พันธุกรรม เช่น ความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรีย^(3,7)

3. Muscular atrophy เซลล์กล้ามเนื้อเหี่ยวตัวลง โดยโครงสร้างเซลล์และเซลล์กล้ามเนื้อยังคงดีอยู่ สาเหตุส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากพันธุกรรม เช่น spinal muscular atrophy และอาจเกิดเนื่องจากการที่กล้ามเนื้อไม่ถูกใช้งาน (Disuse atrophy)

สาเหตุของโรคกล้ามเนื้อยังแบ่งได้อีกหลายวิธี แต่อาการแสดงของโรคกล้ามเนื้อไม่ต่างกันมากนัก โดยมากคล้าย ๆ กัน เช่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง กล้ามเนื้อฝ่อลีบ เป็นต้น โรคกล้ามเนื้อซึ่งเกิดจากความผิดปกติของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย อาจเนื่องจากขาดเอนไซม์ หรือ เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ผิดปกติที่เบสในระดับดีเอ็นเอ แล้วทำให้กรดอะมิโนบริเวณ catalytic site ของเอนไซม์ ผิดต่างจากเดิมทำให้การจับตัวระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทลดลง เป็นผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดไปด้วย

ไมโทคอนเดรียเป็น subcellular organelle ที่เป็นแหล่งกำเนิดพลังงานและเป็นส่วนของเซลล์ที่ทำหน้าที่หายใจใช้ O_2 โครงสร้างของไมโทคอนเดรียมีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นในเป็นส่วนที่พบกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ (respiratory chain complex) มี 5 กลุ่มได้แก่

Complex I	=	NADH - CoQ oxidoreductase
Complex II	=	FADH - CoQ oxidoreductase (Succinate dehydrogenase complex)
Complex III	=	CoQ - Cytochrome C oxidoreductase
Complex IV	=	Cytochrome C oxidase (COX)
Complex V	=	Mitochondrial ATPase (F, ATPase)

ความผิดปกติของกลุ่มเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียทำให้เกิดโรคและอาการต่าง ๆ ได้ดังนี้^(5,6,7,8)

Clinical subgroup	Respiratory chain biochemistry
● CPEO and KSS	Depression of all respiratory complexes with mitochondrial DNA encoded subunits. Single locus deficiency less common
● Limb myopathy and Fulminant infantile lactic acidosis	Single locus deficiency Complex I or IV combined deficiencies less common
● MELAS	Complex I deficiency (I and IV less common)
● MERRF	Variable loci abnormalities

CPEO	-	Chronic Progressive External Ophthalmoplegia
KSS	-	Kerns – Sayre Syndrome
MELAS	-	Mitochondrial myopathy Encephalopathy Lactic Acidosis Stroke-like episode syndrome
MERRF	-	Myoclonus Epilepsy Ragged Red Fiber syndrome

ดังนั้นการศึกษาความผิดปกติทางชีวเคมีโดยวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ของห่วงลูกโซ่หายใจของไมโตคอนเดรียด้วยวิธีวัด enzyme activity จึงมีประโยชน์ช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคของกล้ามเนื้อที่เกิดจากความผิดปกติของไมโตคอนเดรียได้ แต่เนื่องจากระดับเอนไซม์ของห่วงลูกโซ่หายใจของไมโตคอนเดรียแปรตามหลายปัจจัยเช่น อายุ⁽⁹⁾ สภาพการไ้ใช้งานของกล้ามเนื้อและยังมีระดับแตกต่างกันในระหว่างแต่ละมัดของกล้ามเนื้อ อีกทั้งในคนไทยยังไม่มีรายงานตัวเลขค่าปกติของระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจของไมโตคอนเดรีย คณะวิจัยจึงดำเนินการศึกษาหาค่าปกติของเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจของไมโตคอนเดรียจากตัวอย่างกล้ามเนื้อของคนไทย และศึกษาระดับของเอนไซม์ดังกล่าวในผู้ป่วยด้วยอาการของโรคกล้ามเนื้อซึ่งถูกรับเข้าไว้รักษาตัวในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เพื่อวิเคราะห์ความผิดปกติของระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจซึ่งเป็นการศึกษาด้านชีวเคมีเทียบกับผลวินิจฉัยที่ได้รับจากการตรวจชิ้นเนื้อ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สืบค้นเอกสารวิจัย

โรคกล้ามเนื้อพบได้บ่อยทั้งในเด็กเล็ก วัยรุ่น และผู้ใหญ่ มีทั้งที่เป็นโรคทางพันธุกรรม เช่น Duchenne muscular dystrophy และเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ ซึ่งอาจแบ่งออกได้ดังนี้

ก. Spinal muscular atrophy (SMA) กล้ามเนื้ออ่อนแรงเนื่องจาก motor neuron ในไขสันหลังเสื่อม ดังนั้น กล้ามเนื้อที่ถูกเลี้ยงด้วยเส้นประสาทจาก motor neuron เหล่านี้จะมีขนาดเล็กและอ่อนแรง เช่น ที่พบในโรค Werdnig Hoffman disease ผู้ป่วยเหล่านี้มักให้ประวัติทางครอบครัวว่า มีพี่น้องเป็นโรคนี้ด้วย จึงเชื่อว่าน่าจะถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้

ข. Muscular dystrophies กลุ่มของโรคกล้ามเนื้อซึ่งมีความผิดปกติระดับยีน อาจเกิดจากความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ transport proteins บางอย่างในเซลล์กล้ามเนื้อ เช่น Duchenne muscular dystrophy ซึ่งมีการสังเคราะห์ Dystrophin ที่ผิดปกติ การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรคกล้ามเนื้อในกลุ่ม muscular dystrophies แบ่งออกได้ 3 แบบดังนี้

- X-linked recessive เช่น Duchenne, Becker, Emery Driefus และ Mabry muscular dystrophies
- Autosomal recessive เช่น Limb girdle, Scapulo humeral และ Congenital muscular dystrophies
- Autosomal dominant เช่น Facio-Scapulo-Humeral, Ocular และ Scapuloharyngeal dystrophy

และ กลุ่มโรค Myotonia

ค. Congenital myopathy ผู้ป่วยจะมีอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง พัฒนาการช้า ตั้งแต่แรกเกิดกระทั่งอายุ 2 ปี หลังจากอายุ 2 ปีแล้วอาการค่อยดีขึ้น ลักษณะแบบนี้พบได้ในโรคกล้ามเนื้อหลายโรคได้แก่ Central Core, Minicore, Myotubular myopathy, Congenital fibre type disproportion และ Congenital myopathies with abnormalities of subcellular organelles

ง. Metabolic myopathies เช่น glycogen storage disease (ยกเว้น type 1 และ type VI), Myoadenylate deaminase deficiency, Mitochondrial myopathies ซึ่งเกิดเพราะมีการทำงานผิดปกติของ enzyme complex ต่าง ๆ ใน mitochondria

จ. Endocrine myopathies สาเหตุจากความผิดปกติของต่อมธัยรอยด์ (thyroid) พาราธัยรอยด์ (parathyroid), pituitary และต่อมหมวกไต (adrenal glands)

ฉ. Inflammatory myopathies โรคกล้ามเนื้ออักเสบ อ่อนแรง เกิดจากสาเหตุต่าง ๆ ดังนี้

- unknown etiology เช่น polymyositis, dermatomyositis, rheumatoid arthritis, polymyalgia rheumatica

- Miscellaneous (Borderline etiology) เช่น Sarcoidosis, Inclusion body myositis

ช. Miscellaneous

- Myasthenia gravis

- Stiff man syndrome

- Disorders associated with contracture of muscle เช่น Arthrogryposis, Contracture of the Quadriceps และ Rigid spine syndrome.

ผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อซึ่งเกิดเนื่องจากพยาธิสภาพที่ไมโทคอนเดรียแรก ได้รับการวินิจฉัยที่ Stockholm ทั้งนี้เนื่องจากไมโทคอนเดรีย เป็น subcellular organelle ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งผลิตพลังงานของเซลล์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก

โครงสร้างไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial structure)

ไมโทคอนเดรีย⁽¹⁾ เป็น subcellular organelle ที่มีรูปร่างยาวรี (elongated structure) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 – 0.5 μm แทรกอยู่ระหว่าง myofibrils ได้ plasma membrane มักจับกลุ่มอยู่ใกล้หลอดเลือดฝอย (capillaries) ที่มาเลี้ยงกล้ามเนื้อ หรือใกล้นิวเคลียส หรือใกล้ sole plates of neuromuscular junction ไมโทคอนเดรียมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น โดย outer membrane แยกจาก inner membrane ด้วย intermembrane space

เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane)

เยื่อหุ้มชั้นนอกเรียบ และยอมให้โมเลกุลเล็ก ไอออน ผ่านเข้าออกได้ (permeable) เอนไซม์ที่เป็น outer membrane marker ได้แก่ monoamine oxidase (MAO) นอกจากนี้ยังพบเอ็นไซม์ long chain acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) และ receptors

เยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane)

เยื่อหุ้มชั้นในจะมีส่วนหว่าและยื่นเป็นลอนและ cristae ประกอบด้วย mobile carriers สำหรับขนส่ง อิเล็กตรอน เอนไซม์ของกลุ่มลูกโซ่หายใจ (respiratory chain complexes) องค์ประกอบของเยื่อชั้นในมีปริมาณ โปรตีน phospholipid เช่น cardiolipid อยู่สูง และไม่ยอมให้โมเลกุลเล็ก กับไอออนผ่านเข้าออก (impermeable)

Matrix space

ส่วนใจกลางไมโทคอนเดรีย เป็นแหล่งที่พบเอนไซม์ของ Krebs' cycle, Pyruvate dehydrogenase complexes, enzymes of β -oxidation, enzymes for synthesis of urea, ketones, กรดอะมิโน, pyrimidines นิวคลีโอไทด์และฮีม (heme) และ mitochondrial DNA ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นคู่ขดเป็นวงกลม ~ 10 อัน

สารพันธุกรรมในไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียมี DNA และ RNA และมีกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมจาก mitochondrial DNA (mt DNA) ลงมาเป็น mRNA และแปลเป็นลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน สังเคราะห์ขึ้นเป็นโปรตีนได้

Mitochondrial DNA (mt DNA)

mt DNA ที่พบในเซลล์ของร่างกายคน มีลักษณะเป็น closed circular double-stranded DNA ขนาด 16.5 kb ประกอบด้วย 37 ยีน^(12,13,14) (รูปที่ 1) ดีเอ็นเอ สาย guanine rich heavy (H) strand ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ ของ

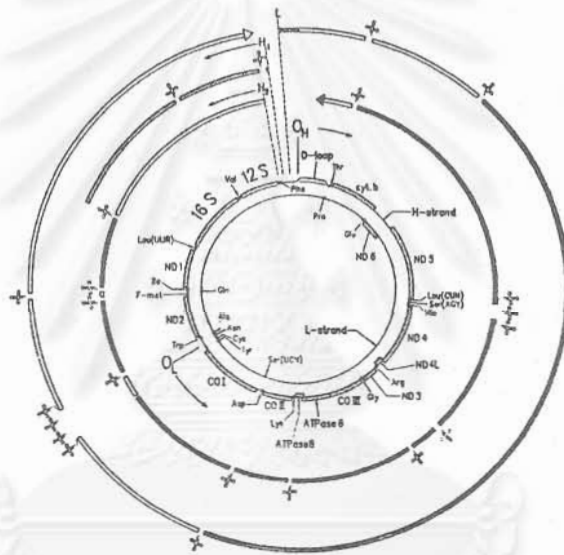
- 12 S rRNA และ 16 S rRNA
- tRNA 14 สาย

- 6 หน่วยย่อย (subunit) ของ Complex 1 (Cpx 1) ได้แก่ ตำแหน่ง ND 1, 2, 3, 4, 4L และ 5
- apocytochrome b ของ Cpx III
- 3 หน่วยย่อยของ Cpx IV ได้แก่ตำแหน่ง COX I, II และ COX III
- หน่วยย่อยที่ 6 และ 8 ของ Cpx V

ส่วนสาย cytosine-rich light (L) strand จะมีรหัสพันธุกรรมสำหรับการสังเคราะห์ของ

- tRNA 8 สาย
- 1 หน่วยย่อยของ Complex 1 (ND6)

ยีนในไมโตคอนเดรียจัดเรียงตัวชิดกัน จนแทบไม่พบ noncoding region หรือ intervening sequence รวมทั้งอาจมีการซ้อนทับของ open reading frames ของยีนบางตำแหน่ง แม้ว่าสารพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียทั้งสาย



รูปที่ 1 แผนภาพโครงสร้างยีนและดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียในคน⁽¹¹⁾

H และสาย L เมื่อถูกถอดรหัส จะนำไปสู่การสังเคราะห์โปรตีนซึ่งมีเพียงแค่ 10% ของเอนไซม์ลูกโซ่หายใจเท่านั้น อีก 90% ของโปรตีนเอนไซม์ลูกโซ่หายใจจะถูกควบคุมโดยรหัสพันธุกรรมที่อยู่ในดีเอ็นเอในส่วนนิวเคลียสของเซลล์ อาจสรุปจำนวนโปรตีนในลูกโซ่หายใจซึ่งถูกควบคุมโดยดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียได้ดังนี้

- 7 หน่วยย่อยของ complex 1 (NADH-Ubiquinone reductase)⁽¹⁴⁾
- Cytochrome b apoprotein ของ Ubiquinone/cytochrome C reductase (Complex III)
- 3 หน่วยย่อยของ Cytochrome C oxidase
- 2 หน่วยย่อยของ ATP synthase (H^+ -ATPase)^(12,15)

mt DNA transcription

การถอดรหัสสายดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียจะเกิดขึ้นกับทั้งสาย H และ L ในลักษณะสวนทิศทางกัน

อย่างสมมาตร (symmetrical) และได้สาย polycistronic RNA โดยมีจุดเริ่มหลายจุดพร้อม ๆ กัน ตำแหน่งเริ่มต้น (initiation site) จะอยู่ที่ประมาณ 150 bases จาก D-loop และจะหยุดบริเวณรอยต่อของ 16S rRNA-tRNA และเนื่องจาก mt mRNA ไม่มี 5'-end leader ดังนั้นในการแปลรหัสจาก mRNA ไปเป็นกรดอะมิโนใน mt ribosome จะอ่านรหัสเดี่ยวเช่น AUG หรือ AUA และแปลว่า "start" แต่กลไกเริ่มต้นการทำงานของ mt ribosome ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ รหัสใน mt mRNA ยังต่างจาก universal code ดังนี้

<u>Universal code</u>		<u>mitochondrial code</u>	
AUA	= isoleucine	AUA	= methio
UGA	= stop	UGA	= tryptof
AGA } AGG }	= arginine	AGA } AGG }	= stop

ไมโตคอนเดรียจะถ่ายทอดจาก ovum ไปสู่เซลล์ลูกเท่านั้น ดังนั้นลักษณะทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียจะมาจากแม่เท่านั้น ไมโตคอนเดรีย 1 อันจะมี mtDNA 5-10 copies และมีอัตราการผ่าเหล่าสูงกว่า ดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส การผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นกับ tRNA ในไมโตคอนเดรีย จะให้อาการทางระบบประสาทดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อาการแสดงทางระบบประสาทที่พบในโรคของไมโตคอนเดรีย⁽¹⁶⁾

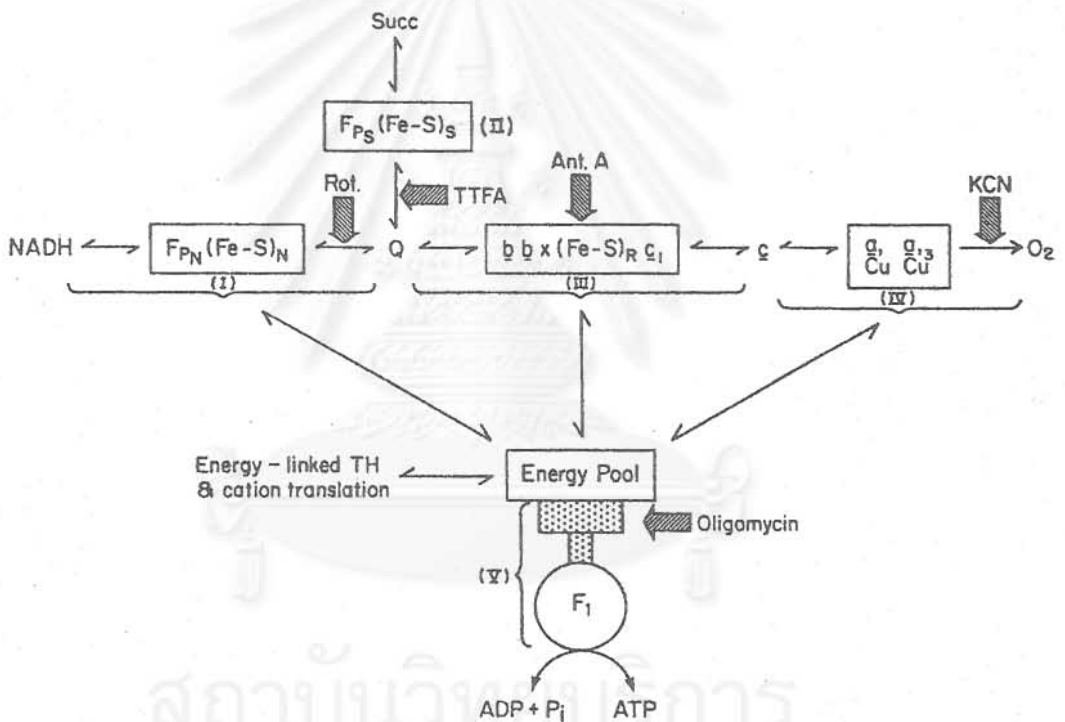
Ophthalmoplegia
 Stroke in young person
 Seizures
 Myoclonus
 Optic neuropathy
 Myopathy
 Fatigability and exercise intolerance
 Elevated levels of cerebrospinal fluid protein
 Sensorineural hearing loss
 Ataxia
 Dermatitis
 Peripheral neuropathy
 Vascular headache
 Myelopathy
 Dystonia
 Basal-ganglia calcification

ห่วงลูกโซ่หายใจ (The respiratory chain)⁽¹⁷⁾

ห่วงลูกโซ่หายใจพบอยู่ที่เยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย ประกอบด้วยเอนไซม์ โคเอนไซม์ ทำหน้าที่ขนส่ง อิเล็กตรอน ไฮโดรเจน และ reducing equivalents ที่เกิดขึ้นในวัฏจักรเครบส์และสับสเตรทอื่นไปให้ O₂ (รูปที่ 2) กระบวนการส่งทอดอิเล็กตรอนที่เยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรียมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากขณะที่มีการส่งทอดอิเล็กตรอนจากลูกโซ่หายใจหนึ่งไปอีกลูกโซ่หายใจหนึ่ง จะมีพลังงานปลดปล่อยออกมา และในบางตำแหน่ง พลังงานที่เกิดขึ้นมากพอที่จะถูกนำกลับไปสังเคราะห์สารพลังงานสูงในรูปของ ATP ได้ จึงเห็นได้ว่ามี 2 กระบวนการเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันภายในเยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย ได้แก่

ก. กระบวนการส่งทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) ซึ่งเรียกอีกว่าห่วงลูกโซ่หายใจ (respiratory chain) เนื่องจากกระบวนการนี้ต้องใช้ O₂ จึงถือเป็นการหายใจในระดับเซลล์

ข. กระบวนการสังเคราะห์ ATP (oxidative phosphorylation)



รูปที่ 2 แสดงการนำสับสเตรทเข้าสู่ห่วงลูกโซ่หายใจ และตำแหน่งที่การส่งทอด อิเล็กตรอนถูกยับยั้งด้วยยาและสารเคมี⁽¹⁷⁾

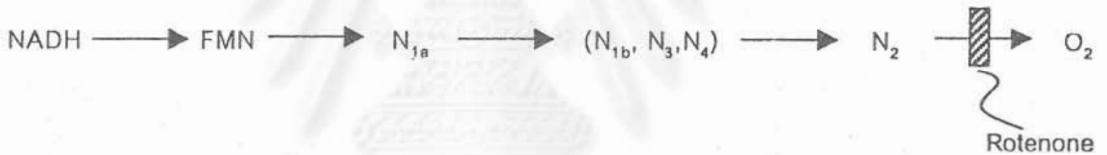
ทั้ง 2 กระบวนการเกิดขึ้นได้โดยกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ ประกอบด้วย กลุ่มเอนไซม์ทำหน้าที่ส่งทอด อิเล็กตรอน 4 กลุ่มคือ Complex I-IV และกลุ่มเอนไซม์สังเคราะห์ ATP 1 กลุ่มคือ Complex V

Complex I (NADH – Ubiquinone Oxidoreductase)⁽¹⁷⁾

ทำหน้าที่นำ H จาก NADH ไปสู่ Ubiquinone เป็น lipoprotein complex น้ำหนักโมเลกุล 700,000 มี phospholipid 20%/mg protein^(18,19) และประกอบด้วย

- โปลิเปปไทด์ 30 หน่วยย่อย (polypeptide subunit) ในจำนวนนี้มี 7 โปลิเปปไทด์ (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L ND5 และ ND6) ซึ่งควบคุมโดย mtDNA และสังเคราะห์ภายในไมโทคอนเดรีย
- 22-24 nonheme irons ซึ่งจับกับ sulfur ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็น Fe-S cluster ที่ทราบโครงสร้างแล้วมีอย่างน้อย 5 กลุ่ม ได้แก่ N_{1a} , N_{1b} , N_2 , N_3 และ N_4 ซึ่งส่วนแกนกลางของ Fe-S cluster ยังแบ่งตาม redox midpoint potential ออกเป็นกลุ่ม low potential (≤ -0.240 V) ได้แก่ N_{1a} , N_{1b} , N_3 และ N_4 ส่วน N_2 จัดเป็น high-potential (-0.020 V)
- 1 FMN

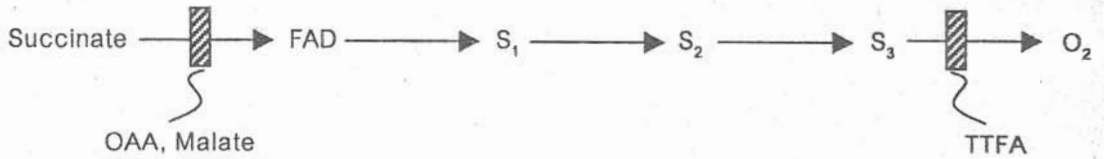
การทำงานของ complex I อาจแบ่งเป็นส่วนที่เรียกว่า NADH - Ubiquinone Oxidoreductase activity ซึ่งส่วนนี้ถูกยับยั้งได้โดย Amytal, Rotenone และ Piericidine กับ ส่วน Type 2 NADH dehydrogenase ซึ่ง catalyze ดึง H ออกจาก NADH ไปให้ artificial electron acceptors ต่าง ๆ เช่น ferricyanide ก็จะใช้เรียก NADH - ferricyanide oxidoreductase ซึ่งไม่ถูกยับยั้งด้วย Rotenone, artificial electron acceptors อื่น ๆ ได้แก่ Cytochrome C, Menadione, Ubiquinone-1 และ Dichlorophenol indolphenol (DCIP) ส่วนลำดับการส่งทอดอิเล็กตรอนภายใน Complex 1 เป็นดังนี้



Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase)⁽¹⁷⁾

ทำหน้าที่นำ reducing equivalent จาก succinate ส่งให้ Ubiquinone เป็น lipoprotein ซึ่งมี 20% phospholipids /mg protein^(20,21) และประกอบด้วย

- 1 FAD
- 8 nonheme, Fe-S cluster ที่ทราบโครงสร้างแล้วได้แก่ S_1 , S_2 และ S_3
- 1 Cytochrome b ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โดย nuclear DNA และถูกสังเคราะห์ใน cytoplasm ก่อนจะ import เข้าสู่ไมโทคอนเดรีย
- 7 polypeptide subunits เฉพาะส่วนเอนไซม์ succinate dehydrogenase จะมี 2 polypeptide chain ขนาด 70,000 มี FAD เกาะและขนาด 27,000 เอนไซม์นี้จะ catalyzes oxidation ของ succinate แล้วส่งทอด H จาก succinate ไปยัง ferricyanide และสี เช่น Phenazine methosulfate (PMS) แต่ไม่ส่งให้ Ubiquinone มีหน่วยย่อยอื่นขนาด 15,000 และ 7,000 ใน Complex II เรียกอีกว่า Q-binding proteins⁽²³⁾ รับหน้าที่ส่งทอดอิเล็กตรอนจาก succinate ไปให้ Ubiquinone และ ปฏิกิริยาส่วนนี้จะถูกยับยั้งโดย 2-thenoyl trifluoroacetone (TTFA) และ Carboxins แต่การส่งอิเล็กตรอนนี้ไปยังสี PMS กับ ferricyanide ไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร 2 ตัวนี้ thiol agent สามารถยับยั้งการทำงานของ Complex II ทั้งหมด และ Oxaloacetate (OAA) กับ malonate (malon) จัดเป็น potent competitive inhibitor ของ succinate dehydrogenase ลำดับการส่งทอดอิเล็กตรอนใน Complex II เป็นดังนี้



Complex III (Dihydrouriquinone – Cytochrome C Oxidoreductase) หรือ Cytochrome b-c₁Complex ^(23,24)

Complex III catalyzes ปฏิกิริยา oxidation ของ dihydrouriquinone และ reduction ของ Cytochrome C น้ำหนักโมเลกุลของ Complex III = 250,000 จับอยู่กับเยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย และเป็น dimer ซึ่งแต่ละหน่วยประกอบด้วย

- 10-11 polypeptide subunits
- 2 cytochrome b (Cyt b) น้ำหนักโมเลกุลของ Cyt b = 43,000 ควบคุมโดย mtDNA และสังเคราะห์ขึ้นในไมโทคอนเดรีย, Cytochrome C, น้ำหนักโมเลกุล 27,000
- Fe-S protein (22,000), Q-binding protein (15,000), Core protein และโปรตีนย่อย ๆ (mol. wt ≤ 15,000) อีก 5-6 หน่วย

Cytochrome b⁽¹⁷⁾

เป็น ferroprotoporphyrin เรียกอีกว่า protoheme และ Fe ที่อยู่ตรงกลางมี coordination number = 6, Cyt b เป็น integral protein ขวางตลอด inner membrane ของไมโทคอนเดรีย และยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด

- high potential (+0.030 v) Cyt b หรือ Cyt b562
- low potential (-0.030 v) Cyt b หรือ Cyt b566

Cytochrome C⁽¹⁷⁾

เป็น integral membrane protein อยู่ด้าน cytoplasmic ของเยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย น้ำหนักโมเลกุล 27,000 และยังมีอีก 2 หน่วยย่อย (น้ำหนักโมเลกุล 9,200 และ 7,200)

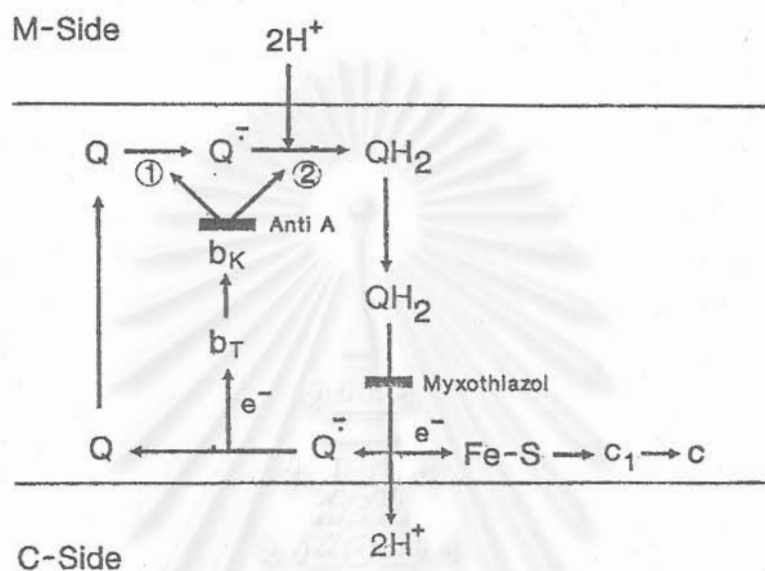
Fe-S protein⁽¹⁷⁾

เป็น integral membrane protein ซึ่งปลายด้านหนึ่งยื่นเข้าไปใน inter membrane space ⁽²⁵⁾ ขนาด 22,000 เรียกอีกชื่อว่า Reiske protein ⁽²⁶⁾ จำเป็นต่อการนำอิเล็กตรอนมา succinate หรือ quinols ไป Cyt C₁ และถ้ามี Antimycin A อยู่, Reiske protein จะช่วยนำอิเล็กตรอนจาก succinate ไป cyt b

Core protein

มีขนาดใหญ่ที่สุดในหน่วยย่อยต่าง ๆ ของ Complex III พบได้ 2 ชนิดคือ Core protein 1 (mol. wt 48,000) และ Core protein 2 (mol. wt 46,000) เป็น peripheral membrane protein ทั้งสองจำเป็นต่อ assembly ของ Complex III

การส่งทอดอิเล็กตรอนระหว่างห่วงโซ่มีความซับซ้อนเนื่องจาก QH_2 เป็น two-electron (hydrogen) donor ในขณะที่ Cyt c เป็น one-electron acceptor กลไกการส่งทอดอิเล็กตรอนที่ยอมรับในขณะนี้ได้แก่ Q-Cycle ของ Mitchell⁽²⁷⁾ ดังรูปที่ 3 ซึ่ง H เพียง 1 ตัวเท่านั้นจาก QH_2 donor จะถูกส่งตรงให้ Cyt c, อีกอะตอมของ H ถูก recycled ภายใน Complex III โดยมี Q เป็น redox carrier วิ่งระหว่าง Cyt b และ c,



รูปที่ 3 การส่งทอดอิเล็กตรอนแบบ Q-cycle⁽²⁷⁾ ใน Complex III ของไมโทคอนเดรีย

เอนไซม์ QH_2 -Cytochrome C reductase ถูกยับยั้งโดย Antimycin (= most potent inhibitor), N-heptylquinone N-oxide (HOQNO), SN 5949, myxothiazol และ stigmatellin

Complex IV (Cytochrome C - Oxygen Oxidoreductase)⁽¹⁷⁾

มักถูกเรียกเป็น Cytochrome C oxidase เป็นลูกโซ่สุดท้ายในลูกโซ่หายใจของไมโทคอนเดรีย เป็น transmembrane lipoprotein enzyme complex มี phospholipid 10% น้ำหนักโมเลกุล 200,000, dimeric และ ยังประกอบด้วย

- heme 2 โมเลกุล
- protein bound copper 2 โมเลกุล; Cu_A และ Cu_B
- polypeptides 13 สาย (I, II, III, IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc และ VIII) polypeptides เหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 56,993 (I) ถึง 4962 (VIII)^(28,29) โดย I, II และ III ถูกควบคุมด้วย mt DNA และสังเคราะห์ในไมโทคอนเดรีย

Heme ทั้ง 2 โมเลกุล คือ Cytochrome a (Cyt a) และ Cytochrome a_3 (Cyt a_3) มีสัดส่วน 1 : 1 ใน Complex IV แขนข้างที่ 6 ของอะตอม Fe ที่ใจกลาง Cyt a_3 จับอยู่กับ O_2 และ Cyt a_3 ยังจับได้กับ Carbon monoxide (CO) และ Cyanide (CN) แต่ Cyt a ไม่จับ

reduced form ของ cytochrome แถบ α , β และ γ จะมี maximum absorption ที่ 605, 517 และ 445 nm ส่วน copper ใน Cyt a และ Cyt a_3 จะอยู่ในรูปของ Cu^{+2}

Cytochrome C oxidase จะทำงานได้เมื่อองค์ประกอบต่าง ๆ ได้จับตัวเป็น complex สมบูรณ์ ซึ่งต้องมีสายโพลีเปปไทด์ทั้งที่สังเคราะห์จาก cytosol และ ไมโทคอนเดรียอยู่ครบ ส่วนของ catalytic subunit มาจากโปรตีนที่สังเคราะห์โดยไมโทคอนเดรีย ทำให้ catalytic subunit เหมือนกันในทุกเซลล์ของทุกอวัยวะของร่างกาย ค่า midpoint redox potential ที่ศูนย์กลางทั้ง 4 ของ Cytochrome oxidase complex เป็นดังนี้

$$\text{Cytochrome } a_3 = 0.340 \pm 0.010 \text{ volts}$$

$$\text{Cytochrome } a = 0.215 \pm 0.010 \text{ volts}$$

$$\text{Cu}_A = 0.215 \pm 0.010 \text{ volts}$$

$$\text{Cu}_B = 0.350 \pm 0.010 \text{ volts}$$

ศูนย์กลาง redox center อยู่กันเป็น 2 คู่ คือ Cyt $a_3 - \text{Cu}_B$ และ Cyt a - Cu_A ทั้ง carbon monoxide และ cyanide เป็น potent inhibitor ต่อ Cytochrome C Oxidase นอกจากนี้ยังมี sulfide, azide และ hydroxylamine

Cytochrome C และ Ubiquinone (Coenzyme Q)⁽¹⁷⁾

Cyt c และ Ubiquinone (mobile carrier) เป็น electron transfer อีก 2 โมเลกุลที่รับ reducing equivalent จาก NADH และ/หรือ succinate ส่งต่อให้แก่ O_2

Cytochrome C⁽³⁰⁾ เป็น stable water soluble protein, $\text{pI} = 10.5$, Cyt c ที่สกัดจาก horse heart เป็นโปรตีนสายเดี่ยว น้ำหนักโมเลกุล 12,400 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 104 ตัว ในจำนวนนี้ 26 ตัวเป็นกรดอะมิโนที่ไม่เคยเปลี่ยนแปลงเลยนานกว่า 1.5 ล้านล้านปี โครงสร้างสามมิตินี้จะเห็น Cyt c ขดหุ้ม heme ไว้ตรงกลางโมเลกุล และมีค่าการดูดแสงเฉพาะ Ferricytochrome C จะให้แถบที่ 520 nm และ 410 nm แห่งละ 1 แถบ มี midpoint redox potential 0.250-0.280 volts ซึ่งเท่ากับ Cyt C₁ (= electron donor) และ Cyt a (Cu_A , electron acceptor) Cyt C ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง Complex III กับ Complex IV โดยปริมาณของ Cyt ทั้ง 3 จะสมดุลกัน

Ubiquinone (CoQ)⁽¹⁷⁾

เป็น redox component ขนาดเล็กที่สุดในห่วงโซ่ไซโทโครมของไมโทคอนเดรีย โครงสร้างของ Ubiquinone ทั้งหมดเหมือน ๆ กัน คือประกอบด้วย

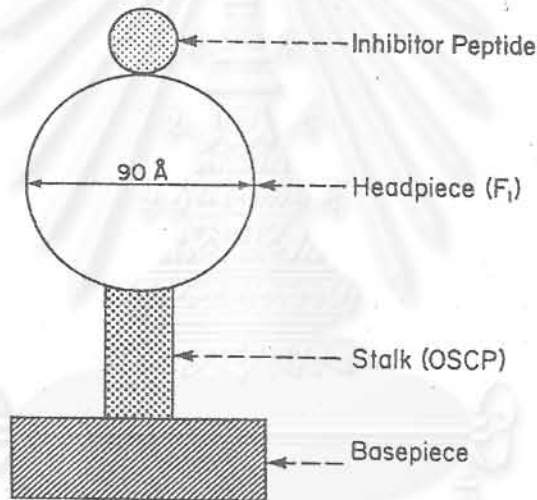
- 2,3 dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone
- polyisoprenoid side chain 6-10 units

CoQ ที่พบมากที่สุดคือ CoQ₁₀ หมายถึง มี 10 isoprenoid side chain ในไมโตคอนเดรียจะมีปริมาณของ CoQ มากกว่า Cytochrome carrier ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนระหว่าง Complex I และ II ไป Complex III โดยกลไกที่เรียกว่า protein motive Q cycle นอกจากนี้ reduced form ของ Ubiquinone (QH₂) ยังมีบทบาทช่วยกำจัด reactive oxygen specie (ROS)⁽³¹⁾

Complex V (ATP Synthase)⁽¹⁷⁾

water – insoluble lipoprotein enzym complex ที่ซับซ้อนที่สุด อาจเรียกอีกว่า ATPase complex หรือ Oligomycin-sensitive ATPase complex หรือ Proton-translocating ATPase หรือ Energy-transducing ATPase

Complex V ที่มาจากต่างแหล่ง เช่น beef heart, rat liver และ yeast ล้วนมีโครงสร้างคล้าย ๆ กันโดยประกอบด้วย 4 ส่วน (รูปที่ 4) ได้แก่



รูปที่ 4 แสดงส่วนประกอบของ ATP synthase⁽¹⁷⁾

- headpiece (F₁; Factor 1) เป็นส่วน water soluble และ catalyze hydrolysis ของ ATP
- basepiece หรือ membrane sector จะเป็นส่วน detergent – soluble ซึ่งเชื่อมกับ energy transfer inhibitor oligomycin และ dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)
- Stalk (OSCP = Oligomycin – Sensitivity – Conferring Protein)
- Inhibitor Peptide ยับยั้ง hydrolysis ของ ATP ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น

ส่วน Stalk และ Basepiece เรียกรวมว่า Fo (Foligomycin)⁽³²⁻³⁵⁾ จำนวนหน่วยย่อยของ Fo ที่พบในแบคทีเรียมีตั้งแต่ 3-8 หน่วยย่อย ถูกควบคุมโดยยีนทั้ง nuclear DNA และ mt DNA ในคนมี mt DNA gene 2 ตำแหน่ง คือ subunit 6 ควบคุมโดย ATPase-6 gene และ subunit 8 ควบคุมโดย A6L gene สรุปลักษณะสมบัติของหน่วยย่อยใน Complex V ดังในตารางที่ 2

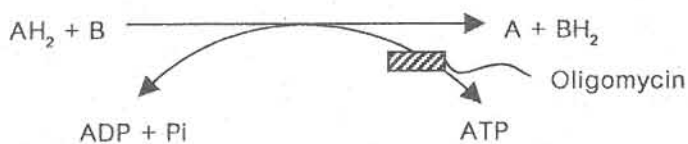
ตารางที่ 2 คุณสมบัติของส่วนประกอบของ beef heart ATP synthase⁽¹⁷⁾

Component	Mol. Wt	Function(s)	Location
α	53,000	?	F1
β	50,000	Hydrolytic site	F1
γ	33,000	?	F1
δ	17,000	?	F1
ϵ	~7,500	?	F1
F ₁ -inhibitor	10,000	Inhibits the hydrolytic activity	-
OSCP	18,000	Binding of F ₁ to the membrane sector	Stalk
F ₆ (F _{c2})	8,000	Binding of F ₁ to the membrane sector	Stalk/membrane sector
DCCD-binding protein	10,000-14,000	Binding site for DCCD & Oligomycin	Membrane sector
F _B	12,000-44,000	?	Membrane sector

การทำงานของกลูเมอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจที่เยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเกิด 2 กระบวนการพร้อม ๆ กัน ทั้ง electron transport และ energy transduction อาจถูกยับยั้งโดยยาและสารเคมีต่าง ๆ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม

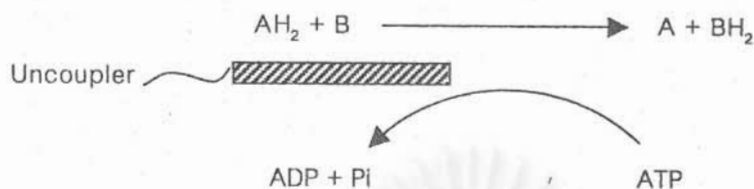
1. Inhibitor of electron transport สารเหล่านี้ยับยั้งการนำ reducing equivalent เข้าสู่ตำแหน่งต่าง ๆ อย่างเฉพาะเจาะจงของกลูเมอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ โดยไม่มีผลต่อตำแหน่งอื่นของห่วงลูกโซ่หายใจ (รูปที่ 2) เช่น Rotenone ยับยั้งเฉพาะการส่ง H จาก NADH สู่ Ubiquinone เท่านั้น ไม่มีผลโดยตรงต่อห่วงลูกโซ่หายใจตำแหน่งอื่น

2. Energy Transfer Inhibitors สารเคมี เช่น Oligomycin และ Aurovertin⁽³⁶⁾ จะยับยั้งปฏิกิริยา phosphorylation คือ การสลาย และการสังเคราะห์ ATP ซึ่งจะเป็นผลให้เกิดยับยั้งการส่งทอดอิเล็กตรอนตามมา เนื่องจากกระบวนการทั้งสองเกิดร่วมกัน ดังนี้



3. Uncoupling agents จะแยกกระบวนการ phosphorylation ที่เกิดร่วมกับการส่งทอดอิเล็กตรอนออกจากกัน จึงทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP โดยปริยาย ถึงแม้ uncoupler จะไม่ยับยั้งปฏิกิริยาโดยตรง แต่ทำให้พลัง

งานที่เกิดขึ้นจากการส่งทอดอิเล็กตรอน ไม่ถูกนำกลับมาใช้สังเคราะห์สารพลังงานสูง (ATP) ดังนั้นพลังงานจะสูญเสียออกไปในรูปความร้อน และ uncoupler ไม่ยับยั้งการสลาย ATP Uncoupler agents⁽³⁷⁾ ได้แก่ Dinitrophenol



(DNP), Pentachlorophenol (PCP), p-Trichlorophenylhydrazine (CCP) และ Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) กลไกการทำงานของ Uncoupling agent เชื่อว่า สารเหล่านี้ไปเพิ่มการสลายของ ATP ขณะเกิดปฏิกิริยา redox หรือไปเปลี่ยนแปลงสภาพ pH gradient ที่เยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรียขณะเกิด redox reaction

ส่วน Matrix ซึ่งอยู่ตรงกลางล้อมรอบด้วยเยื่อชั้นในของไมโทคอนเดรีย มีกลุ่มเอนไซม์เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของสารตัวกลางที่ได้จากการสลายไขมันและคาร์โบไฮเดรต ดังนั้น ถ้าเกิดความผิดปกติของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมเหล่านี้ จะทำให้น้ำที่ของไมโทคอนเดรียผิดปกติได้เช่นกัน Di Mauro และคณะ⁽⁷⁾ จึงจำแนกความผิดปกติของไมโทคอนเดรียโดยแบ่งตามหน้าที่การทำงานออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. Defects of substrate utilization ความผิดปกติที่อาจเกิดตั้งแต่การนำ intermediate และ substrate เข้าออกไมโทคอนเดรีย เช่นการนำ acetyl CoA และ long chain fatty acid เข้าออกไมโทคอนเดรีย กลไกที่ผิดปกติ อาจจะอยู่ที่พาหะ (carrier หรือ transporter) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น Pyruvate dehydrogenase ซึ่งช่วยเร่งการเปลี่ยน pyruvate เป็น acetyl CoA และ Carnitine palmitoyl transferase ซึ่งช่วยในปฏิกิริยานำเข้า long chain fatty acid สู่มิโทคอนเดรีย

2. Defect of oxidation and phosphorylation coupling อาจเกิดความผิดปกติของการส่งต่ออิเล็กตรอน เป็นผลทำให้ไม่สามารถนำพลังงานที่เกิดขึ้นกลับเข้าสู่การสังเคราะห์ ATP ดังนั้นจะเกิดความผิดปกติได้เช่นที่พบใน Luft's disease ซึ่งพบอาการ nonthyroidal hypermetabolism, heat intolerance, polyphagia, polydipsia, weight loss, weakness and myopathy

3. Defects of the respiratory chain ความผิดปกติที่เกิดกับกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ มักจะแสดงอาการที่ระบบกล้ามเนื้อ และระบบประสาท ที่เป็นเช่นนี้สันนิษฐานกันว่า เนื่องจากเซลล์เนื้อเยื่อประสาทและกล้ามเนื้อเป็นเซลล์ที่ต้องทำงานหนัก ต้องการพลังงานสูง ดังนั้น ถ้าเกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งผลิตพลังงาน เนื้อเยื่อเหล่านี้ย่อมมีอาการแสดงออกก่อนเนื้อเยื่ออื่น จากการที่กลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจมีโครงสร้างซับซ้อน มีหน่วยย่อยซึ่งส่วนมากถูกควบคุมโดยยีนจาก nuclear DNA และส่วนหนึ่งควบคุมด้วย mitochondrial DNA ดังนั้นจึงพบว่าโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงจากไมโทคอนเดรียบางโรคจะกระทบการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจได้หลายกลุ่มพร้อม ๆ กัน เช่น PEO, CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia) ที่พบว่า activity ของทั้ง Complex I และ IV⁽³⁸⁾ ลดลงเป็นต้น

วัสดุ วิธีการ

3.1 ตัวอย่างกล้ามเนื้อคนปกติ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อคน โดยเก็บจากผู้ป่วยซึ่งจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดกระดูก จากห้องผ่าตัด ภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ป่วยเหล่านี้ไม่มีประวัติและไม่มีอาการทาง กล้ามเนื้อ เมื่อแพทย์ผ่าตัดกระดูกและจำเป็นต้องตัดบางส่วนของกล้ามเนื้อออก จึงเก็บตัวอย่างเหล่านั้นใส่กล่อง ใส่อากาศซึ่งแช่ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 4°C พร้อมชื่อ นามสกุล อายุ เพศ

จำนวนตัวอย่างกล้ามเนื้อคนซึ่งถือเป็นกล้ามเนื้อปกติทั้งหมดที่เก็บในปี 2539 - 2541 มีจำนวน 100 ตัวอย่าง และเก็บเพิ่มเติมในปี 2541 จนปัจจุบันอีก 75 ตัวอย่าง

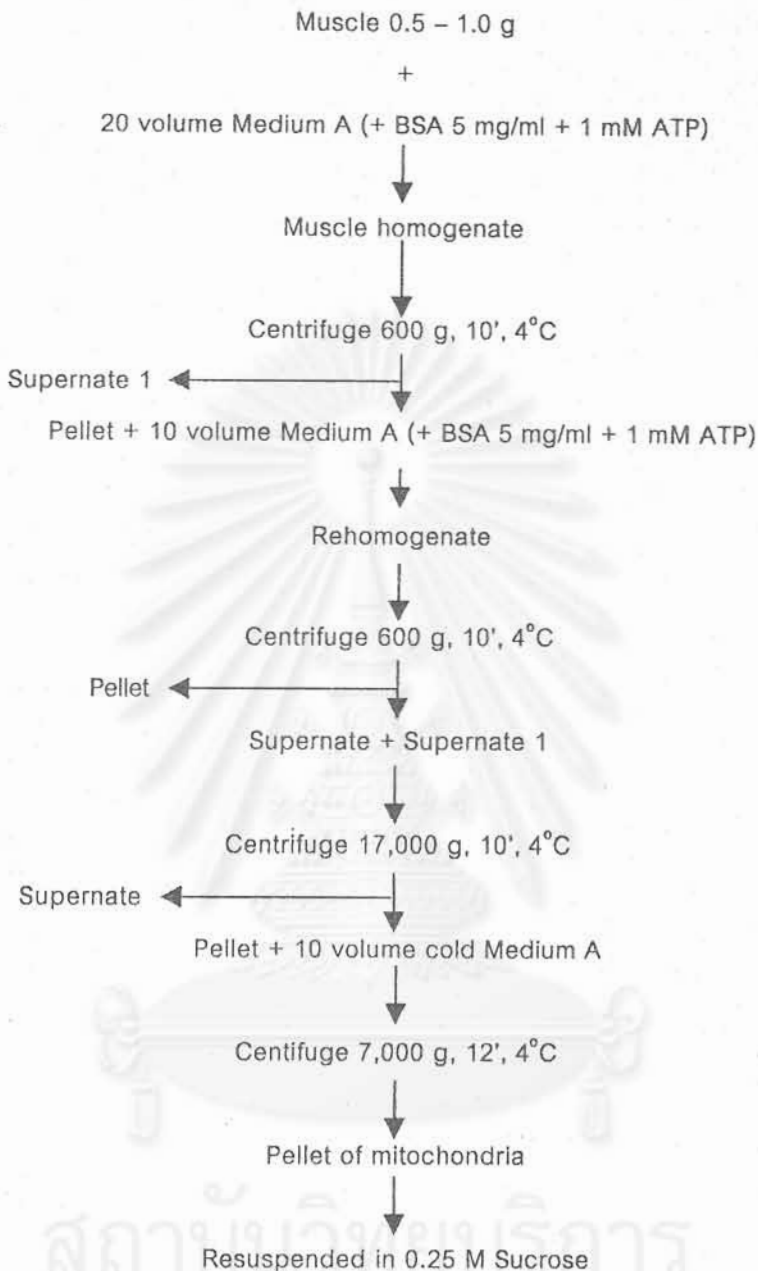
3.2 ตัวอย่างกล้ามเนื้อที่เป็นโรค

ผู้ป่วยซึ่งมารับการรักษาที่คลินิกโรคกล้ามเนื้อ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย หรือผู้ป่วยซึ่งมารับการรักษาด้วยอาการโรคกล้ามเนื้อที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และ แพทย์ได้ตัดชิ้นเนื้อ (biopsy) เพื่อตรวจทางพยาธิวิทยา และได้ส่งให้ตรวจการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ลูกโซ่หายใจ ของไมโทคอนเดรีย ชิ้นเนื้อจึงถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการ ทั้งหมดของชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยจะส่งมาจากรองศาสตราจารย์ นายแพทย์สังคม จงพิพัฒน์วณิชย์ ผู้เชี่ยวชาญโรคกล้ามเนื้อ

3.3 การแยกไมโทคอนเดรียจากกล้ามเนื้อ⁽³⁹⁾

กล้ามเนื้อ 0.5-1.0 กรัม ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดกับ isolated Medium A (ประกอบด้วย 0.1 M KCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA ; pH 7.2) ให้ได้ muscle homogenate แล้วนำไปปั่นแยกไมโทคอนเดรีย ตามขั้นตอนดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ถ้าได้ชิ้นเนื้อน้อย จะไม่ปั่นแยกเพื่อให้ได้ mitochondrial homogenate แต่นำชิ้นเนื้อบดกับ 20 volume Medium A (+ BSA 5 mg/ml + 1 mM ATP) ได้ muscle homogenate นำไปใช้วิเคราะห์ specific activity ของ respiratory chain complexes ต่าง ๆ ต่อไป และถึงแม้จะมี 1 mM ATP อยู่ด้วย จากการศึกษานี้ที่ได้เปรียบเทียบการใส่และไม่ใส่ ATP พบว่าไม่ทำให้ specific activity ของ complexes ต่าง ๆ แตกต่างกันอย่างเฉพาะ Complex V

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนใน muscle homogenate และ mitochondrial homogenate โดยใช้สีจับโปรตีนของ BioRad ตามวิธีของ Beaden⁽⁴⁰⁾

Bradford working reagent : BioRad Bradford reagent 1 volume เติมน้ำกลั่นอีก 4 volumes

	Blank (ml)	Standard (ml)	Unknown (ml)
Working reagent	1	1	1
BSA 1 mg/ml	-	0.02	-
Homogenate	-	-	0.02
dd. H ₂ O	0.02	-	-
5', Room tempt, OD 595 nm			

3.5 การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ห้วงลูกโซ่หายใจของไมโทคอนเดรีย

เอนไซม์ห้วงลูกโซ่หายใจของไมโทคอนเดรียแบ่งเป็นกลุ่ม (complex) ได้ 5 กลุ่ม เรียก Complex I-V (Cpx I-V) การวิเคราะห์ระดับเอนไซม์จะทำโดยวัด activity หรือการทำงานของเอนไซม์ และคำนวณเป็น specific activity หรือเป็น activity ต่อ mg protein ของแต่ละกลุ่มเอนไซม์

3.5.1 การวิเคราะห์ specific activity ของ Cpx I ^(39,41,42,43)

นำ mitochondrial homogenate และหรือ muscle homogenate จาก 3.3 มาวิเคราะห์ ใช้ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด 1 มล. ทั้งหลอด reagent blank และ unknown วัดค่าการดูดแสงที่ 340 nm อุณหภูมิ 37 °C หลอด reagent blank ใช้หักค่าการดูดแสงที่เกิดขึ้นจากสารเคมีต่าง ๆ ออก ส่วนประกอบของสารละลายแต่ละหลอดมีดังนี้

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)	Final Concentration
- 0.1 M Tris pH 8.0	0.5	0.5	50 mM
- 200 mM EDTA	0.005	0.005	1 nM
- 250 mM KCN	0.008	0.008	2 mM
- 5% BSA	0.05	0.05	0.25%
- 1 mg/ml Antimycin A	0.002	0.002	2 µg
- 0.8% Triton X-100	0.05	0.05	0.04%
- 5 mM DB	0.026	0.026	0.13 mM
- dd. H ₂ O	0.352	0.352	
- mitochondrial homogenate	-	5-25 µg	
Prewarm 3', 37°C			
- 20 mM NADH/Tris buffer	0.0065	0.0065	0.13 mM
- Incubate 3', 37°C; OD 340 nm			-

3.5.2 การวิเคราะห์ specific activity ของ Cpx II^(39, 44)

นำ mitochondrial homogenate และหรือ muscle homogenate จาก 3.3 มาวิเคราะห์ดังนี้

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)	Final Concentration
- 30 mM Potassium phosphate buffer, pH 7.2	0.8295	0.8295	25 mM
- 100 mM Mg Cl ₂	0.05	0.05	5 mM
- 1 mg/ml Antimycin A	0.002	0.002	2 µg
- 2 mM Rotenone	0.0025	0.0025	5 mM
- 250 mM KCN	0.008	0.008	2 mM
- 250 mM Succinate/phosphate buffer, pH 7.4	0.08	0.08	20 mM
Prewarm 3', 37°C			
- 3.4 mM DCPIP/phosphate buffer	0.015	0.015	50 µM
- 5 mM DB	0.013	0.013	65 µM
- Incubate 2', 37°C; ↓ OD 600nm			-

3.5.3 การวิเคราะห์ specific activity ของ Cpx I – III⁽⁴²⁾

Cpx I-III จะถูกวิเคราะห์ใน mitochondrial homogenate และหรือ muscle homogenate วิธีวิเคราะห์มีรายละเอียด ดังนี้

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)	Final Concentration
- 30 mM Potassium phosphate buffer pH 7.2	0.835	0.835	25 mM
- 100 mM Mg Cl ₂	0.05	0.05	5 mM
- 250 mM KCN	0.008	0.008	2 mM
- 5% BSA	0.05	0.05	0.25%
- dd H ₂ O	0.017	0.01	
- Mitochondrial homogenate	-	5-25 µg	
Prewarm 3', 37°C			
- 2.5 mM Cytochrome	0.04	0.04	0.1 mM
- 20 mM NADH	-	0.007	0.14 mM
- Incubate 3', 37°C, ↑ OD 550 mM			-

3.5.4 การวิเคราะห์ specific activity ของ Cpx III⁽⁴⁵⁾

ใช้ mitochondrial homogenate และหรือ muscle homogenate 5-25 μg โปรตีนเพื่อ วิเคราะห์ specific activity ของ Cpx III ดังรายละเอียด

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)	Final Concentration
- 100 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0	0.5	0.5	50 mM
- 10 mM EDTA	0.01	0.01	0.1 mM
- 5% BSA	0.04	0.04	0.2%
- 100 mM NaN_3	0.03	0.03	3 mM
- 2.5 mM Cytochrome	0.024	0.024	0.06 mM
- dd H_2O	0.356	0.356	-
- Mitochondrial homogenate	-	5-25 μg	
Prewarm 3', 37°C			
- 10 mM DBH_2	0.04	0.04	0.04
- Incubate 90 sec, 37°C, \uparrow OD 550 mM			-

3.5.5 การวิเคราะห์ specific activity ของ Cpx II-III^(46,47,48,49)

Mitochondrial homogenate และ หรือ muscle homogenate 10 - 25 μg โปรตีนจะถูกนำมา วิเคราะห์การทำงานของ Cpx II-III ดังนี้

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)
- 0.1 M Tris pH 7.4	0.5	0.5
- 250 mM KCN	0.008	0.008
- 10 mM EDTA	0.01	0.01
- 5% BSA	0.02	0.02
- 250 mM Succinate pH 7.4	0.04	0.04
- dd H_2O	0.3905	0.3505
- Mitochondrial homogenate	-	10-25 μg
Prewarm 3', 37°C		
- 2.5 mm Cytochrome	0.02	0.02
- 65 mM PMS/ H_2O	0.0115	0.0115
- Incubate 2', 37°C, OD at 550 nm		

3.5.6 การวิเคราะห์ specific activity ของ Cpx IV^(39,44)

นำ mitochondrial homogenate 5-25 µg มาวิเคราะห์ specific activity ในปฏิกิริยาซึ่งใช้ 100 mM Potassium phosphate, pH 7.0 เป็นบัฟเฟอร์ วัด absorbancy ที่ 550 nm ดังนี้

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)
- 100 mM K-PO ₄ buffer, pH 7.0	0.2	0.2
- dd H ₂ O	0.8	0.79
- 10 % Maltoside	0.002	0.002
- 1 mM Reduced Cytochrome	-	0.001
Prewarm 2', 37°C, Autozero		
- Mitochondrial homogenate	5.25 µg	5-25 µg
- Incubate 2', 37°C, ↓ OD 550 nm at 30 sec interval (A ₁ & A ₂)		
- 0.1 M Potassium ferricyanide	-	0.01
- Incubate 37°C, Fully oxidized, OD at 550 nm(A ₂)	-	

แล้วคำนวณ first order rate $-k = 2.3 \log \frac{A_1 - A_2}{A_2 - A_\alpha} / t_2 - t_1$

- A₁ = OD 550 ที่ 10 sec
- A₂ = OD 550 ที่ 130 sec
- A_α = OD 550 ที่ fully oxidized ของ Cytochrome C
- t₁ = 10 sec, t₂ = 130 sec

ส่วน activity ของ Cpx IV = conc of reduced Cyt C x (-k)

3.5.7 การวิเคราะห์ specific activity ของ Cpx V⁽⁴³⁾

ก่อนการวิเคราะห์แต่ละครั้ง จะต้องเตรียมสารละลาย ATPase cocktail ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

ATPase cocktail	5.0	ml
- 55 mM Tris pH 8.0	4.7	ml
- Antimycin A (1 mg/ml, MeOH)	0.01	ml
- 0.1 M MgCl ₂	0.16	ml
- NADH	10.0	mg
- Pyruvate kinase	10.0	µl
- LDH	10.0	µl
- PEP (10 mg Dowex treated)	0.1	ml

นำ mitochondrial homogenate 5-25 µg มาวิเคราะห์ ดังนี้

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)
- ATPase cocktail	0.9	0.9
- mitochondrial homogenate	-	5 – 25 µg
Prewarm 3', 37°C		
- ATP (30 mg/ml)	0.02	0.02
Incubate 3' – 5', 37°C, ↓ OD at 340 nm		

3.5.8 การวิเคราะห์ specific activity ของ Citrate synthase^(47,50)

นำ mitochondrial homogenate มาวิเคราะห์ specific activity ของ Citrate synthase โดยวิธีของ Haas และคณะ⁽⁴⁷⁾

	Reagent blank (ml)	Unknown (ml)
- 0.15 M Tris pH 8.0	0.567	0.567
- 10 mM DTNB/0.1 M Tris, pH 8.0	0.01	0.01
- 2.5 mM Acetyl CoA	0.02	0.02
- 0.8% Triton X-100	0.05	0.05
- dd H ₂ O	0.303	0.303
- Mitochondrial homogenate	-	5-20 µg
Prewarm 3', 37°C		
- 10 mM Oxaloacetate/0.1 M Tris, pH 8.0	0.05	0.05
- Incubate 3', 37°C, OD at 412 nm		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผลการวิจัย

4.1 ตัวอย่างกล้ามเนื้อปกติ

ตัวอย่างกล้ามเนื้อจำนวน 100 ตัวอย่างซึ่งเก็บช่วงปี 2539-2541 นั้น ได้ถูกนำมาวิเคราะห์การทำงานของ เอนไซม์ทั้ง 5 กลุ่มของห่วงลูกโซ่หายใจในไมโทคอนเดรีย ผลที่ได้พบว่าการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ มีค่าต่ำกว่าค่าปกติที่รายงานในวารสารต่างประเทศ ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลดังนี้

ก. ตัวอย่างชิ้นเนื้อ มีขนาดเล็ก

ข. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้รับมักจะไม่มีการแช่เยลลี่กล้ามเนื้อ แต่เป็นเนื้อเยื่อพังผืด และเนื้อเยื่อไขมัน ผู้วิจัยจึงต้องเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อใหม่ ซึ่งขณะนี้ได้วิเคราะห์ตัวอย่างใหม่ทั้งหมด 75 ตัวอย่าง

4.2 ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ Citrate synthase

เอนไซม์ Citrate synthase พบในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรีย การวิเคราะห์เอนไซม์ Citrate synthase เป็นเครื่องชี้บ่งว่ามีไมโทคอนเดรียปกติหรือไม่ และเป็น marker สำหรับใช้ในการแปลผลเอนไซม์ของห่วงลูกโซ่หายใจ ตัวอย่างเช่น ถ้าในการตรวจชิ้นเนื้อตัวอย่างหนึ่ง ได้ค่าระดับของเอนไซม์ Citrate Synthase ต่ำกว่าปกติ ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างนั้นมีจำนวนไมโทคอนเดรียน้อยหรือผิดปกติ แต่เมื่อวิเคราะห์เอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจได้ค่าปกติ หรือค่อนข้างสูง ผู้วิเคราะห์จะต้องทดสอบใหม่ เพราะอาจจะมีผลผิดพลาดบางอย่างเกิดขึ้น

วิธีคำนวณ specific activity ของ Citrate Synthase

ใช้ mitochondrial homogenate 4 μ l

ปริมาณโปรตีน = $4 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mg

วัดค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดแสง dA = 0.0904/min

ค่า Extinction coefficient ของ DTNB = $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

ดังนั้น OD 1 = 1 mmol/litre/cm

$$= \frac{1 \times 10^3}{13.6} \times \frac{1}{10^3} = \mu\text{mol/ml/min}$$

∴ Specific activity

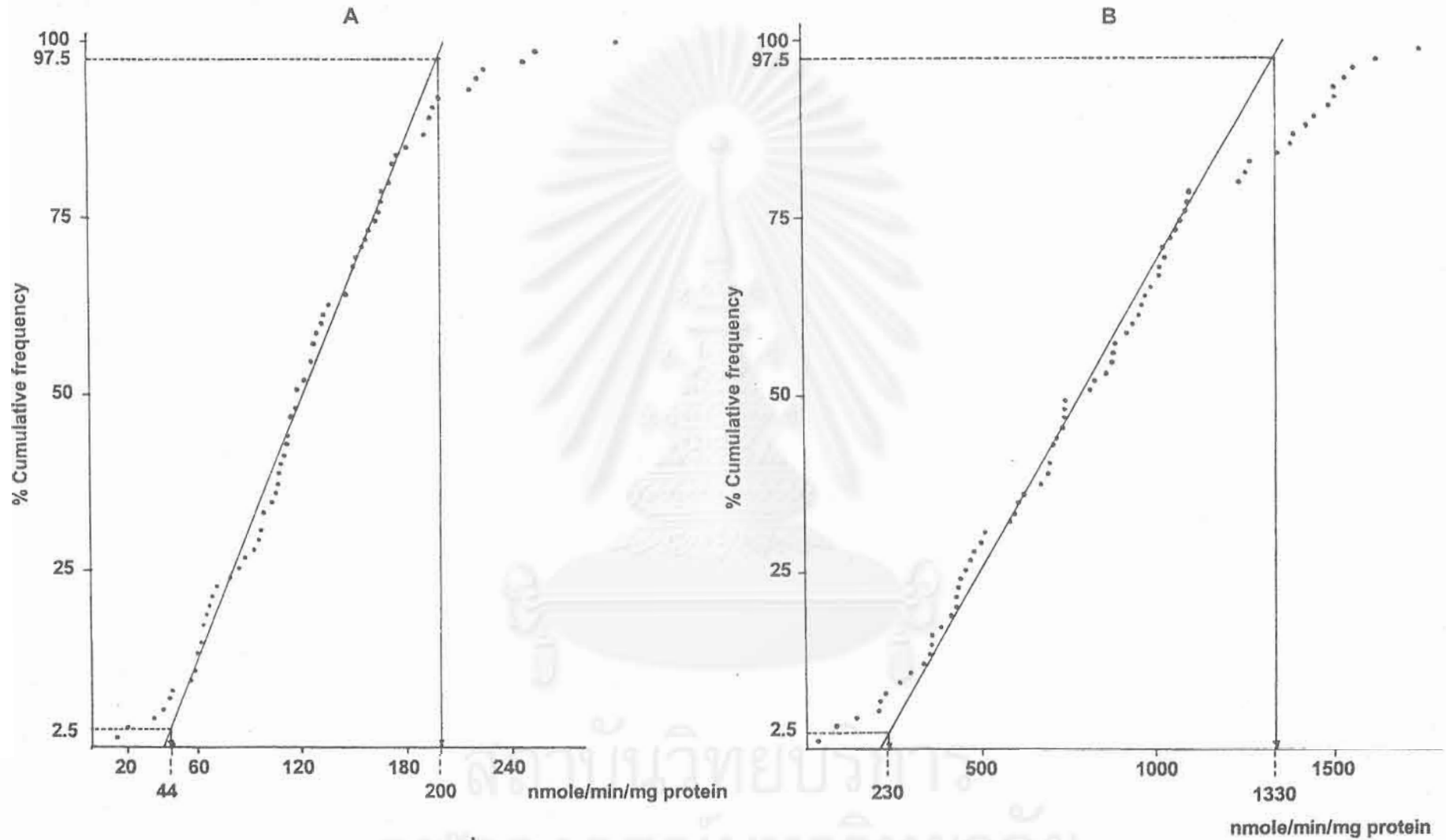
$$= \frac{\text{dA}}{1} \times \frac{1 \times 10^3}{13.6} \times \frac{1}{\text{mg protein}} \text{ nmol / min/ mg protein}$$

$$= \frac{0.0904 \times 73.5}{4 \times 10.67 \times 10^{-3}}$$

$$= 155.68 \text{ nmol/min/mg protein}$$

ผลการวิเคราะห์ Citrate Synthase ในตัวอย่างกล้ามเนื้อคนปกติ 75 ตัวอย่าง แสดงไว้ในรูปที่ 5

Specific activity of Citrate synthase



รูปที่ 5 กราฟแสดง Specific activity ของ Citrate synthase

A = muscle homogenate

B = mitochondrial homogenate

4.3 ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจของไมโทคอนเดรีย

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ specific activity ของ Complex I (Cpx I)

ใช้ mitochondrial homogenate 9 μ l

ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้ = $9 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mg

อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดแสง dA = -0.0092/min

ค่า Extinction coefficient ของ NADH ที่ 340 nm = $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

ดังนั้น OD 1 = 1 mmol/litre/cm

$$= \frac{1 \times 10^3}{6.22} \times \frac{1}{10^3} = \mu\text{mol/ml/min}$$

\therefore Specific activity

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{dA}}{1} \times \frac{1 \times 10^3}{6.22} \times \frac{1}{\text{mg protein}} \\ &= \frac{\text{dA}}{1} \times 161 \times \frac{1}{\text{mg protein}} \text{ nmol/ml/mg protein/min} \\ &= \frac{-0.0092}{1} \times 161 \times \frac{1}{9 \times 10.67 \times 10^{-3}} \end{aligned}$$

Cpx I specific activity = -15.42 nmol/min/mg protein

ผลการศึกษาเอนไซม์ Cpx I ใน 75 ตัวอย่างชิ้นเนื้อ นำค่า Specific activity ของ Cpx I ที่วิเคราะห์ได้มา plot cumulative frequency graph และคำนวณหาค่า Specific activity ที่ 2.5 และ 97.5 percentile ค่าปกติจะเป็นค่าเฉลี่ยที่ครอบคลุม 95 percentile ดังในรูปที่ (6) ซึ่งจะได้ดังนี้

ค่าปกติใน muscle homogenate = 7 – 22 nmol/min/mg protein

mitochondrial homogenate = 23 – 69 nmol/min/mg protein

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex II (Cpx II)

ใช้ mitochondrial homogenate 9 μ l

ปริมาณโปรตีน $9 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mg

Extinction coefficient ของ DCPIP = $19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

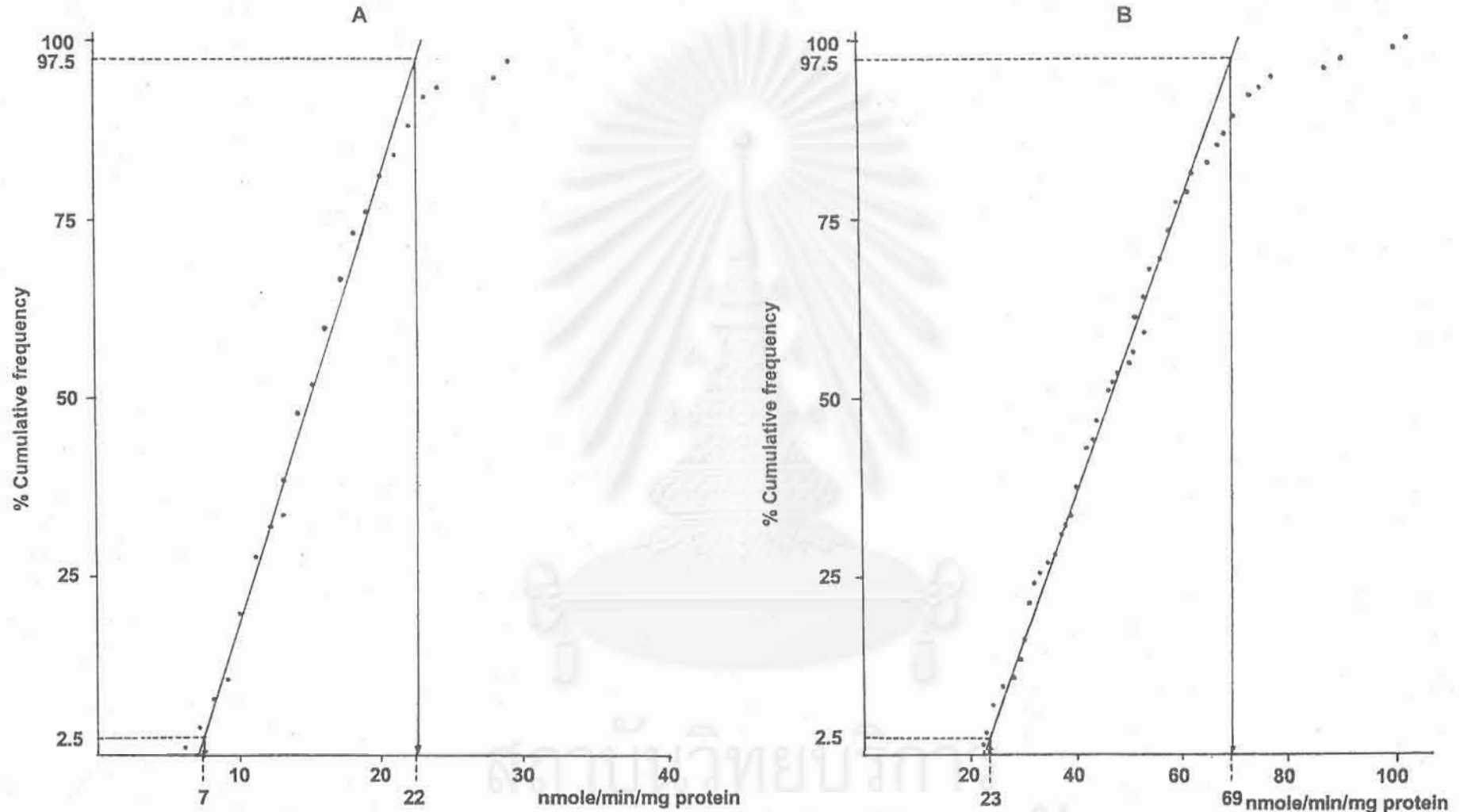
dA = -0.0485/min

Specific activity = $\frac{-0.0485 \times 52.3}{9 \times 10.67 \times 10^{-3}}$

= -26.41 nmol/min/mg protein

หมายเหตุ เครื่องหมาย - แสดงว่าขณะวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ จะมีการลดค่าการดูดแสง เมื่อสปีสเตรทถูกใช้

Specific activity of Complex I



รูปที่ 6 กราฟแสดง Specific activity ของ Complex I (Cpx I)

A = muscle homogenate

B = mitochondrial homogenate

ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex II ในคนปกติ 75 ตัวอย่างแสดงไว้ในรูปที่ 7 และค่าปกติจะเป็นดังนี้

muscle homogenate	=	11-33 nmol/min/mg protein
mitochondrial homogenate	=	44-440 nmol/min/mg protein

4.3.3 ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex III (Cpx III)

ใช้ mitochondrial homogenate	3.7 μ l
ปริมาณโปรตีน	$3.7 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mg
Extinction coefficient ของ Cytochrome	= $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
dA	= 0.1096/min
Specific activity	= $\frac{0.1096 \times 52.6}{3.7 \times 10.67 \times 10^{-3}}$
	= 146.02 nmol/min/mg protein

ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex II (Cpx II) ในคนปกติ 75 ตัวอย่าง แสดงไว้ในรูปที่ 8 และค่าปกติเป็นดังนี้

muscle homogenate	=	74-184 nmol/min/mg protein
mitochondrial homogenate	=	430-1260 nmol/min/mg protein

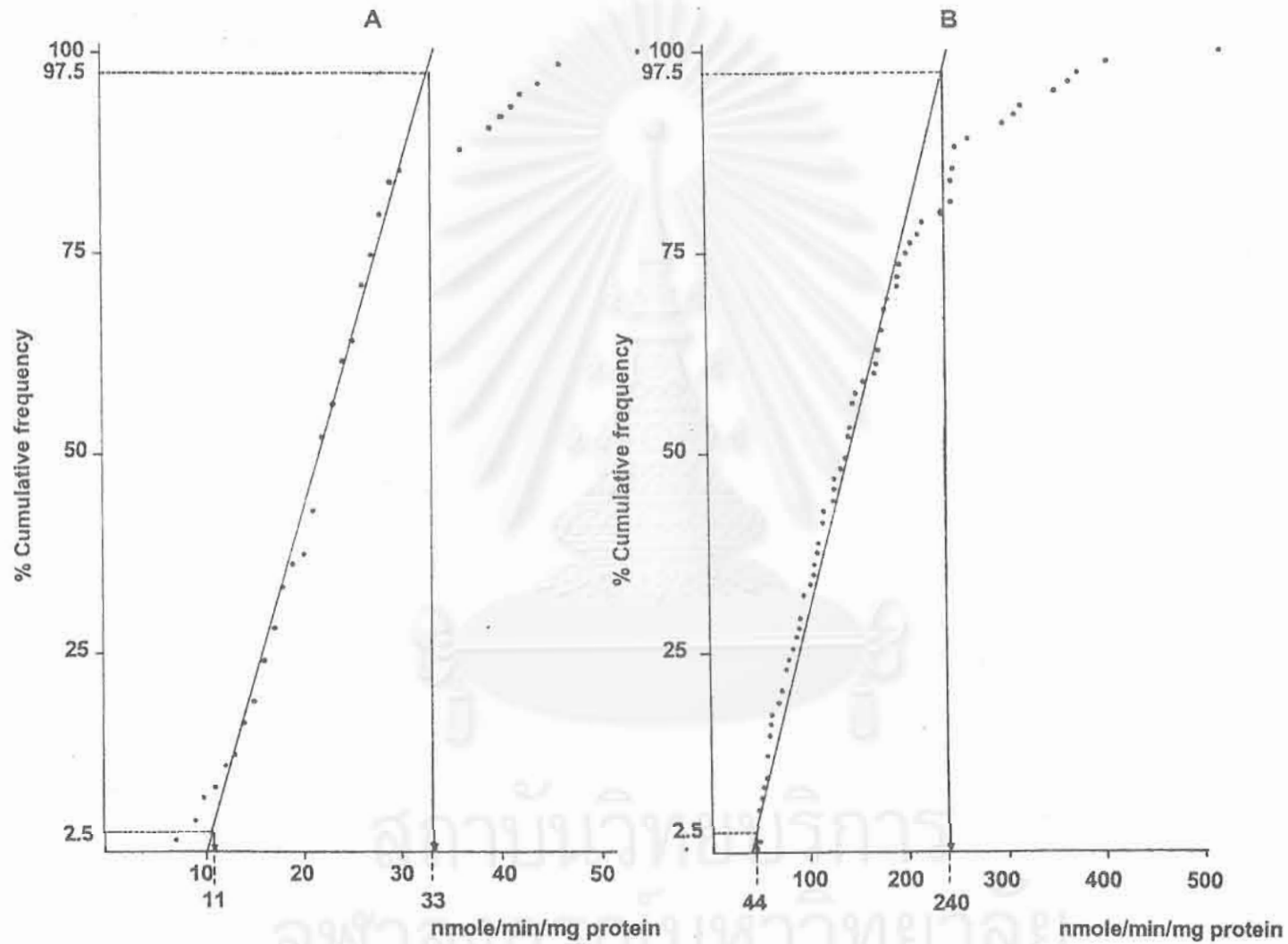
4.3.4 ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex I – III

ใช้ mitochondrial homogenate	4 μ l
ปริมาณโปรตีน	$4 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mg
Extinction coefficient ของ Cytochrome	= $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
dA	= 0.0445/min
Specific activity	= $\frac{0.0445 \times 52.6}{4 \times 10.67 \times 10^{-3}}$
	= 54.8 nmol/min/mg protein

ผลการวิเคราะห์จาก 75 ตัวอย่างของคนปกติ (รูปที่ 9) เป็นดังนี้

muscle homogenate	=	22 – 77	nmol/min/mg protein
mitochondrial homogenate	=	180 – 870	nmol/min/mg protein

Specific activity of Complex II

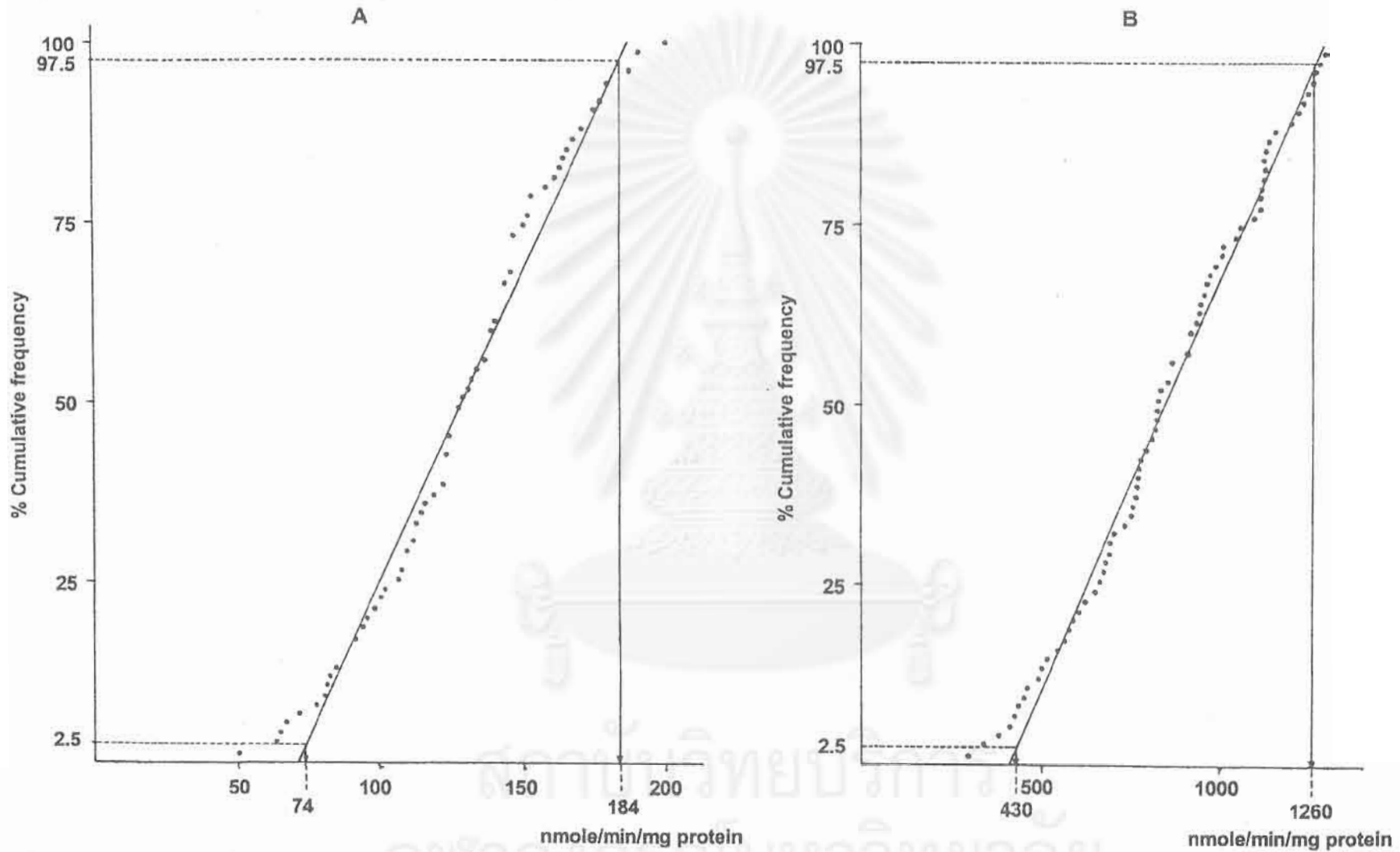


รูปที่ 7 กราฟแสดง Specific activity ของ Complex II (Cpx II)

A = muscle homogenate

B = mitochondrial homogenate

Specific activity of Complex III

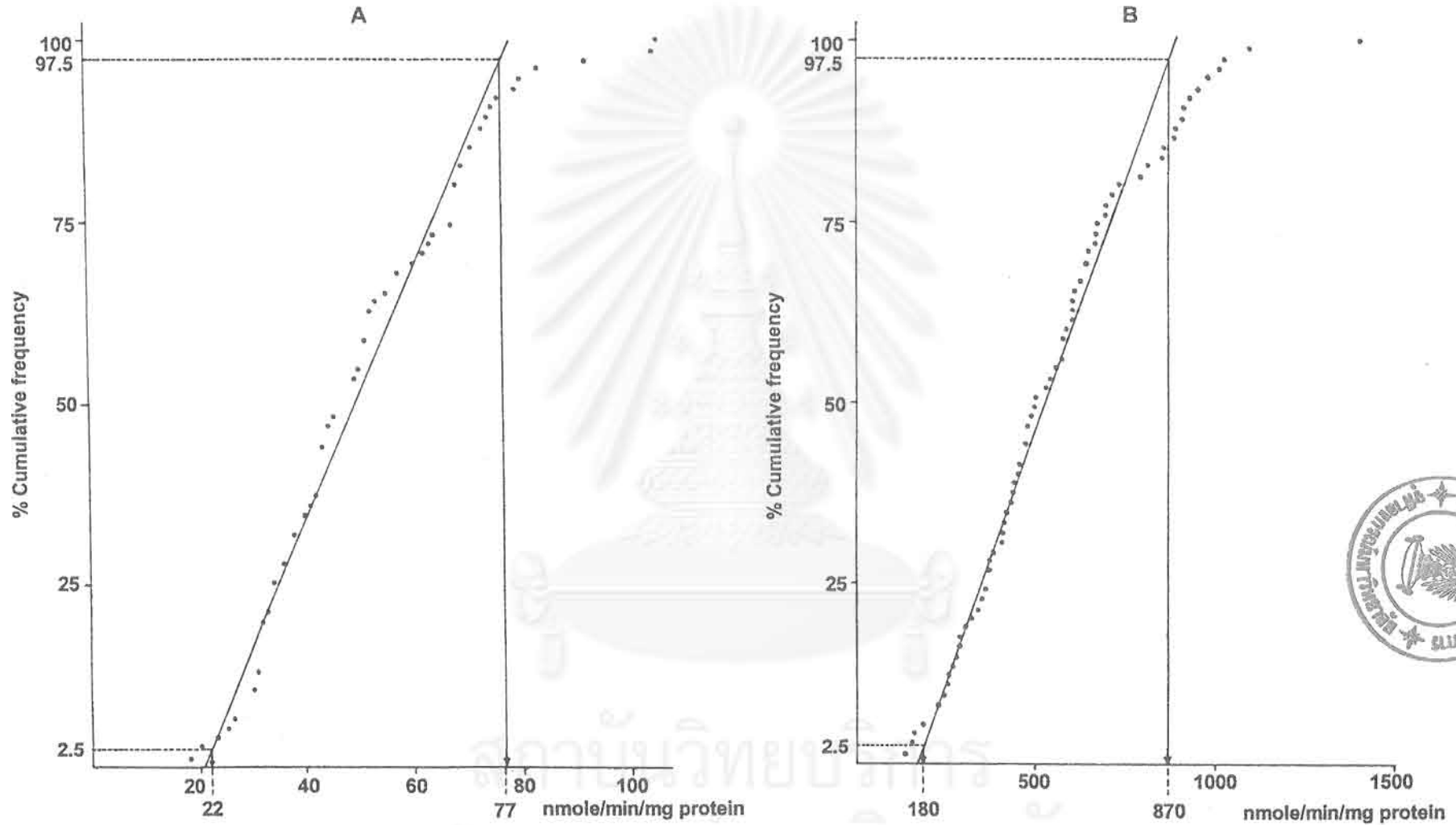


รูปที่ 8 กราฟแสดง Specific activity ของ Complex III (Cpx III)

A = muscle homogenate

B = mitochondrial homogenate

Specific activity of Complex I-III



รูปที่ 9 กราฟแสดง Specific activity ของ Complex I-III (Cpx I-III)

- A = muscle homogenate
- B = mitochondrial homogenate

4.3.5 ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex II- III

ใช้ mitochondrial homogenate 9 μ l
 ปริมาณโปรตีน $9 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mg
 Extinction coefficient ของ Cytochrome = $19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
 dA = 0.0693/min
 Specific activity = $\frac{0.0693 \times 52.6}{4 \times 10.67 \times 10^{-3}}$
 = 37.9 nmol/min/mg protein

ผลการวิเคราะห์ในคนปกติ 75 ตัวอย่าง แสดงในรูปที่ 10 สรุปได้ดังนี้

muscle homogenate = 13 – 55 nmol/min/mg protein
 mitochondrial homogenate = 107 – 587 nmol/min/mg protein

4.3.6 ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex IV

ใช้ mitochondrial homogenate 6 μ l
 ปริมาณโปรตีน $6 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mg
 $A_1 = A_{10 \text{ sec}} = 0.206, t_1 = 10 \text{ sec}$
 $A_2 = A_{130 \text{ sec}} = 0.147, t_2 = 130 \text{ sec}$
 $A_\alpha = 0.125, t = \text{infinity}$
 $-k = 2.3 \log \frac{A_1 - A_\alpha}{A_2 - A_\alpha} / t_2 - t_1 / \text{mg protein}$
 $= 2.3 \log \frac{0.206 - 0.125}{0.147 - 0.125} / 130 - 10 / 6 \times 10.67 \times 10^{-3}$

$\therefore 1^{\text{st}}$ order rate constant $-k = 0.169 \text{ sec}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$

ถ้าต้องการเปลี่ยนจากค่า 1^{st} order rate constant (k) เป็น specific activity สามารถคำนวณได้ดังนี้

ใช้ substrate ในการวิเคราะห์ 0.01 μ mol/ml reaction mix

Specific activity = k [S]/min/mg protein

ถ้าค่า k = $0.169 \text{ sec}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$

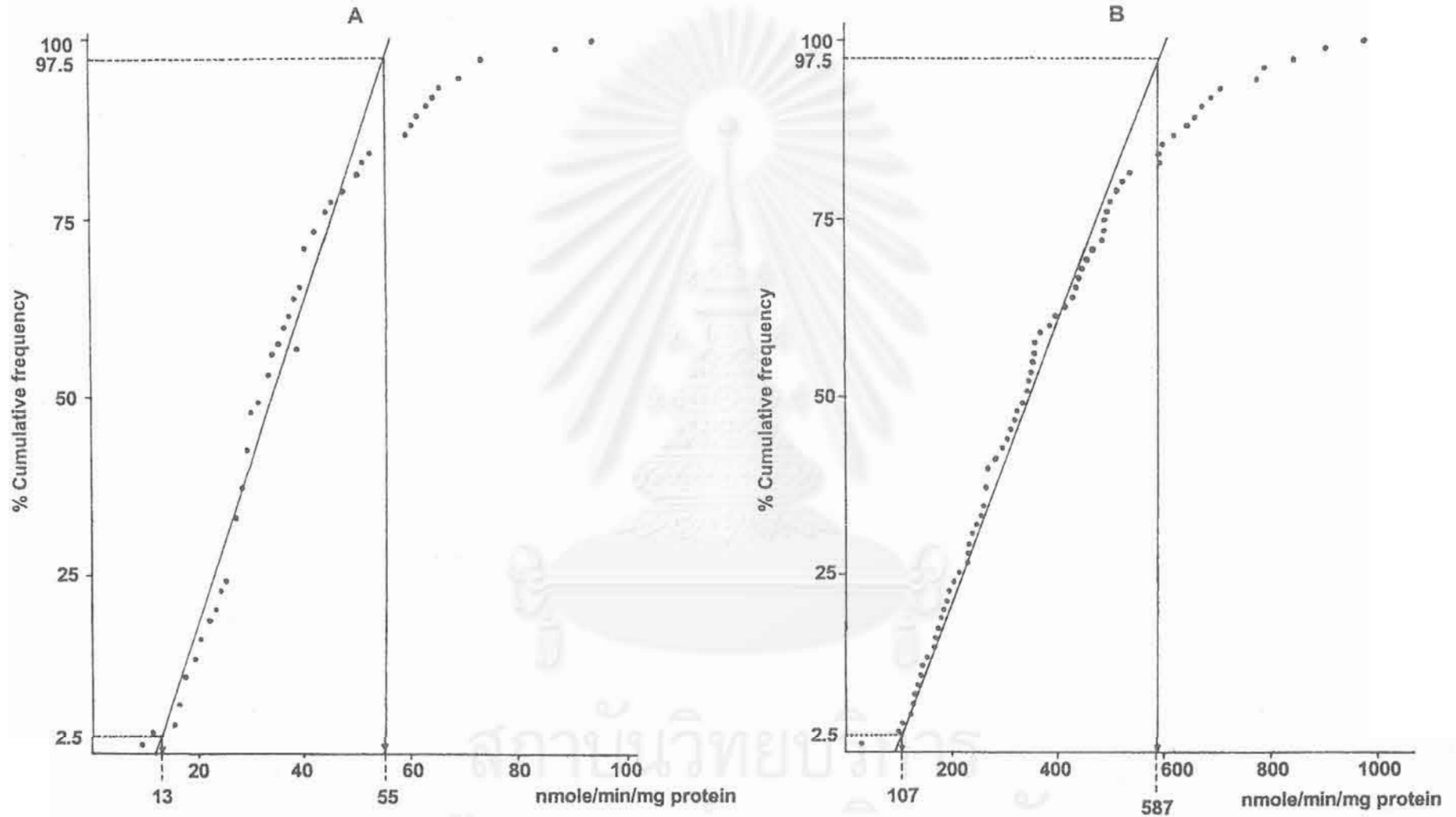
\therefore Specific activity = $0.169 \times 0.01 \times 1000 \times 60$

= 101.4 nmol/min/mg protein

ผลการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ Complex IV ในคนปกติ 75 คน แสดงในรูปที่ 11 และสรุปได้ดังนี้

	1^{st} order rate constant (k; $\text{sec}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$)	Specific activity (nmol/min/mg protein)
muscle homogenate	0.058 – 0.272	35 – 163
mitochondrial homogenate	0.28 – 1.0	168 – 600

Specific activity of Complex II-III

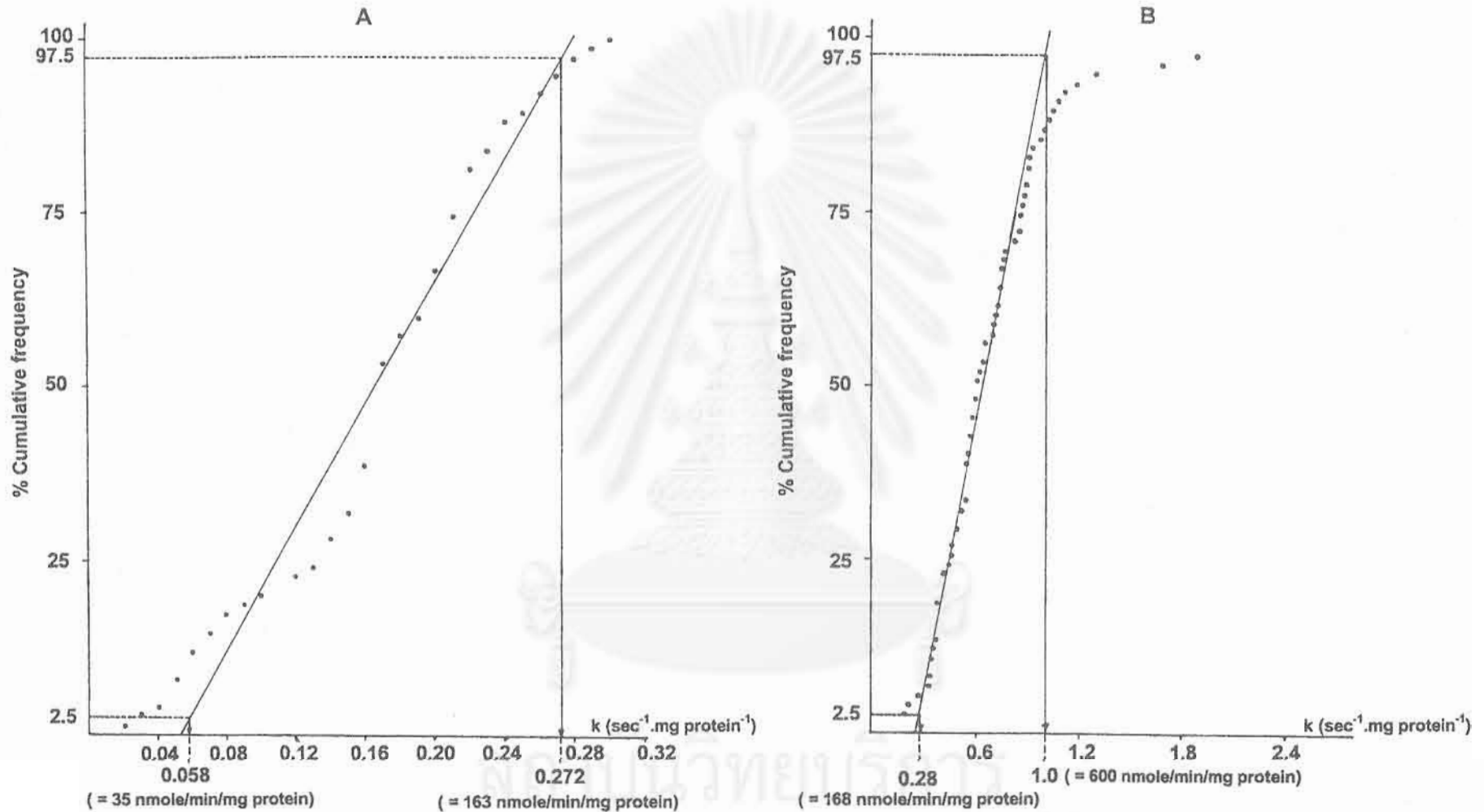


รูปที่ 10 กราฟแสดง Specific activity ของ Complex II-III (Cpx II-III)

A = muscle homogenate

B = mitochondrial homogenate

Specific activity of Complex IV



รูปที่ 11 กราฟแสดงค่า k ($\text{sec}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$) ของ Complex IV (Cpx IV)

$k = 1^{\text{st}}$ order reaction rate constant

A = muscle homogenate

B = mitochondrial homogenate

4.3.7 ผลการวิเคราะห์ Specific activity ของ Complex V

ใช้ mitochondrial homogenate 9 μ lปริมาณโปรตีน $9 \times 10.67 \times 10^{-3}$ mgExtinction coefficient ของ NADH = $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}.\text{ml}^{-1}$ แต่ในการวิเคราะห์ใช้ปริมาตรของ NADH 0.92 ml

$$dA = -0.0793/\text{min}$$

$$\begin{aligned} \text{Specific activity} &= \frac{-0.0793 \times 148}{9 \times 10.67 \times 10^{-3}} \\ &= -122.22 \text{ nmol/min/mg protein} \end{aligned}$$

ผลการวิเคราะห์ในคนปกติ 75 ตัวอย่าง (รูปที่ 12) สรุปได้ดังนี้

muscle homogenate = 29 – 109 nmol/min/mg protein

mitochondrial homogenate = 84 – 228 nmol/min/mg protein

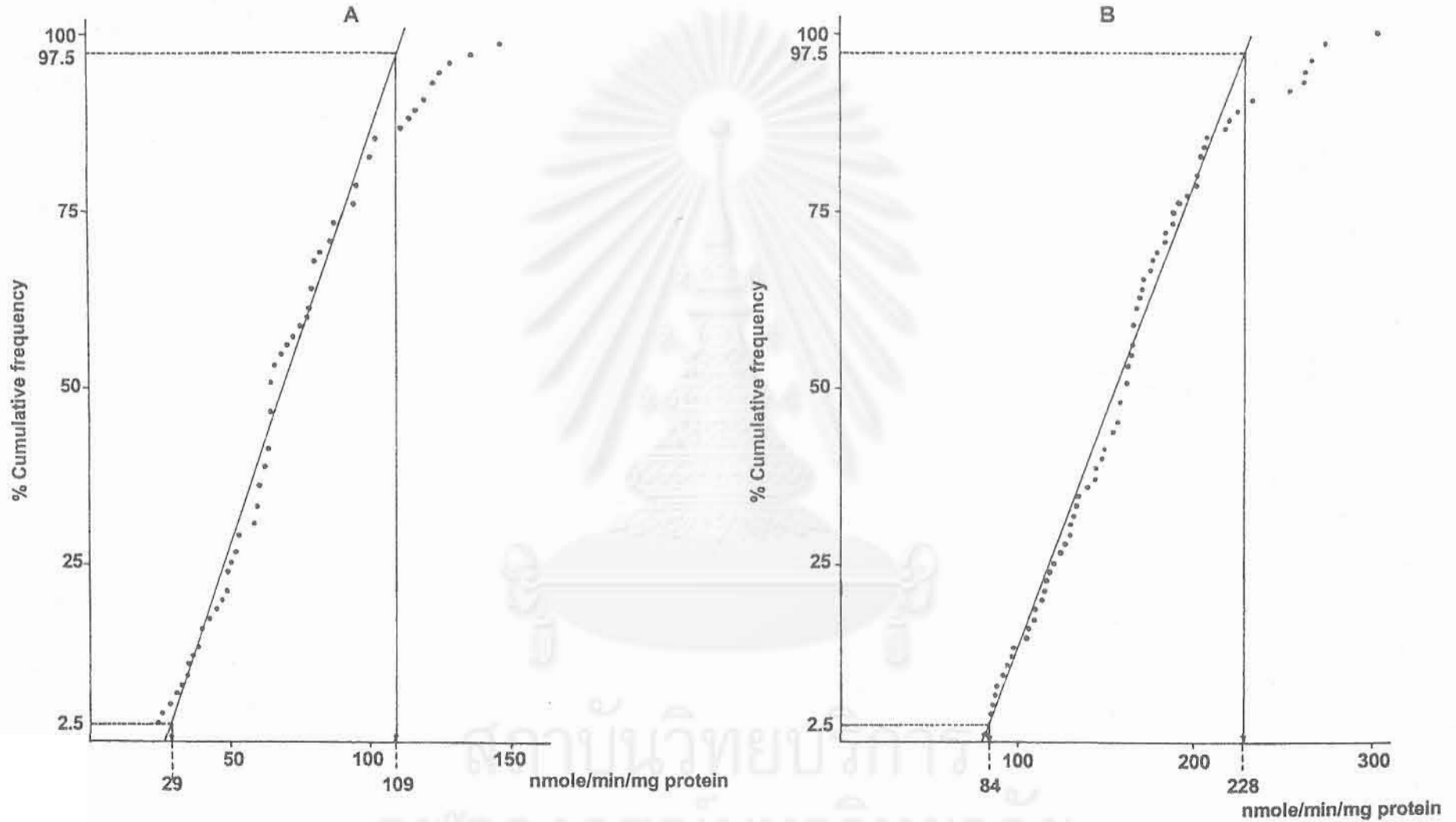
ผลการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ Citrate synthase และเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจได้แก่ Complex I ถึง V และ Complex I-III กับ Complex II-III ในคนปกติที่ไม่มีอาการทางกล้ามเนื้อ 75 ตัวอย่างได้สรุปไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าปกติของ Specific activity ของ Citrate synthase และเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ ในตัวอย่างกล้ามเนื้อคนปกติ 75 ตัวอย่าง

Enzymes and Respiratory Chain complexes	Muscle homogenate (nmol/min/mg protein)	Mitochondrial homogenate (nmol/min/mg protein)
- Citrate synthase	44 – 200	230 – 1330
- Cpx I	7 – 22	23 – 69
- Cpx II	11 – 33	44 – 440
- Cpx III	74 – 184	430 – 1260
- Cpx I-III	22 – 77	180 – 870
- Cpx II-III	13 – 55	107 – 587
- Cpx IV	35 – 163	168 – 600
- Cpx V	29 – 109	84 – 228

*ค่าปกติใน 1^{st} order reaction rate constant หรือk muscle homogenate $0.058 - 0.272 \text{ sec}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ k mitochondrial homogenate $0.28 - 1.0 \text{ sec}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$

Specific activity of Complex V



รูปที่ 12 กราฟแสดง Specific activity ของ Complex V (Cpx V)

A = muscle homogenate

B = mitochondrial homogenate

I 20141695

4.4 ผลการศึกษาความผิดปกติของระดับเอนไซม์ในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อ

ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ Citrate synthase และกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจทุกตัวได้แก่ Complex I ถึง V และ Complex I-III กับ Complex II-III ทั้งนี้โดยนำชิ้นเนื้อซึ่งตัดจากผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาด้วยอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง และความผิดปกติของกล้ามเนื้อ ชิ้นเนื้อเหล่านี้แพทย์ตัดออก (biopsy) มาเพื่อจะศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และด้วยวิธีย้อมทาง ฮิมมูโนฮิสโตเคมี เมื่อมีชิ้นเนื้อเหลือจึงนำมาวิเคราะห์เอนไซม์ ส่วนการวินิจฉัยโรคนั้นจะได้จากการวินิจฉัยทางคลินิกโดยแพทย์เจ้าของคนไข้

จำนวนตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผิดปกติมี 56 ตัวอย่าง และได้สรุปผลการตรวจเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจว่าต่ำหรือปกติโดยเปรียบเทียบกับค่าปกติ (ตารางที่ 3) แล้วแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สรุปผลการวิเคราะห์เอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยความผิดปกติของกล้ามเนื้อ 56 ราย

Diagnosis	Cases	Respiratory complexes with low specific activity
- MELAS	3	Cpx II, III, I-III & II-III
- Muscle weakness	17	Cpx I-III & III slight change to low & II-III
- CPEO	3	Normal to low of Cpx I-III & III
- Mitochondrial Defect	7	Cpx I-III & II-III slight change to low
- Congenital myopathy	1	Cpx I-III, II-III & V
- Leigh	8	Cpx I, II and I-III
- DMD	8	Cpx III & I-III slight change to low
- Myopathy	1	Cpx III & I-III slight change
- Polymyositis	1	Cpx I-III slight change
- MG (Myasthenia Gravis)	1	Cpx III
- FSH	1	Cpx I-III slight change
- Charcot	1	Cpx V
- SMA	1	Cpx IV & slight change of I-III
- Myoneuropathy	1	Cpx I-III slight change
- Carnitine deficiency	1	Cpx I-III
- Nemaline	2	Normal
- Leber optic atrophy	1	Normal
- KSS (Kearns-Sayre Syndrome)	1	Normal
- Neuropathy	1	Normal
- Sclerodema	1	Normal
- LHON ?	1	Normal

วิจารณ์ผลการวิจัย

การวัดปริมาณเอนไซม์ที่ได้รับการยอมรับเป็นสากล จะเป็นการวัดจลนศาสตร์หรือการทำงานของเอนไซม์ หรืออีกนัยหนึ่งคือวัดอัตราเร็วในการทำงานของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเอนไซม์นั้น ๆ ซึ่งได้แก่การวิเคราะห์หา specific activity ของเอนไซม์นั่นเอง ดังนั้น Specific activity จึงมีหน่วยเป็น $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$)

การวิเคราะห์ specific activity ของกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจแต่ละกลุ่มเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อช่วยวินิจฉัยโรค ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย ในคนความผิดปกติของไมโทคอนเดรียส่งผลให้เกิดความผิดปกติและพยาธิสภาพในหลายอวัยวะ⁽¹⁶⁾ แต่ที่พบบ่อยได้แก่ความผิดปกติของกล้ามเนื้อ ทั้งนี้ความผิดปกติของกล้ามเนื้อไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของไมโทคอนเดรียเท่านั้น นอกจากนี้ความผิดปกติของไมโทคอนเดรียก็เกิดขึ้นได้กับกลุ่มเอนไซม์หลาย ๆ กลุ่ม แต่ที่สำคัญคือกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจได้แก่ Complex I ถึง IV และกลุ่มเอนไซม์ควบคุมซึ่งนำไปสู่การสังเคราะห์สารพลังงานสูงในรูป ATP ซึ่งเรียกรวม ๆ ว่า OXPHOS หรือ Oxidative phosphorylation complexes ได้แก่ Complex I-III; II-III และ V⁽⁴⁶⁾ มีความจำเป็นที่จะต้องวินิจฉัยให้ได้ว่าความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย เกิดเนื่องจากความผิดปกติของกลุ่มเอนไซม์ใด เพื่อจะสามารถให้การรักษาเพื่อบรรเทาอาการ หรือลดความรุนแรงและเพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีของผู้ป่วยอีกทั้งใช้พยากรณ์โรค แม้จะไม่สามารถรักษาที่ต้นเหตุเนื่องจากความผิดปกติปฐมภูมิอยู่ที่ระดับยีน

ได้มีการพัฒนาวิธีเพื่อวิเคราะห์ Specific activity ของกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจตั้งแต่อีก่อน 1970 แต่วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น หรือวิธีทางกายภาพวัดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าในแต่ละกลุ่มเอนไซม์ วิธีทางเคมีวิเคราะห์ให้ผลที่คล้ายกัน นั่นคือค่า ปกติของ Specific activity ของแต่ละกลุ่มเอนไซม์มีช่วงกว้างมาก จึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เป็นระยะ แม้กระนั้นค่าปกติที่ยอมรับและรายงานในวารสารต่าง ๆ ก็ยังมีช่วงกว้าง ดังแสดงในตารางที่ 5 สาเหตุที่ค่าปกติของกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจมีช่วงกว้างนั้น อาจเกิดจาก อายุของเจ้าของกล้ามเนื้อ และลักษณะการทำงาน ความต้องการพลังงานของกล้ามเนื้อแต่ละมัดไม่เท่ากัน⁽⁹⁾ นอกจากนี้ค่าระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจในกล้ามเนื้อมีช่วงกว้าง อาจเกิดจากตัวแปรในการตัดชิ้นเนื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ค่าปกติ Specific activity ของกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจในไมโทคอนเดรีย

Enzyme Complexes	Muscle homogenate (nmol/min/mg protein)	Mitochondrial homogenate (nmol/min/mg protein)	References
Complex I	7-26	45-104	Wallace et al, 1988 ⁽⁴¹⁾ Zheng et al, 1990 ⁽⁴²⁾ Rustin et al, 1994 ⁽⁴³⁾
Complex II	15-56	61-161	Fatefi, 1978 ⁽⁴⁴⁾ Birch-Machin et al, 1994 ⁽³⁹⁾
Complex III	58-131	313-1493	Krahenbuhl et al, 1994 ⁽⁴⁵⁾
Complex I-III	9-42	112-323	Zheng et al, 1989 ⁽⁴⁶⁾
Complex II-III	14-37	147-402	Chretien et al, 1994 ⁽⁵¹⁾
Complex IV	65-204	345-1347	Hatefi, 1978 ⁽⁴⁴⁾ Birch-Machin et al, 1994 ⁽³⁹⁾
Complex V	45-137	207-564	Rustin et al, 1994 ⁽⁴³⁾
Citrate Synthase	56-151	283-652	Huas et al, 1995 ⁽⁴⁷⁾

ในช่วงต้นของงานวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ขอชิ้นเนื้อจากภาควิชาออร์โทปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผ่านศัลยแพทย์ออร์โทปิดิกส์ท่านแรก ซึ่งกรุณาตัดชิ้นเนื้อให้ ใช้เวลานานปีเศษในการเก็บชิ้นเนื้อ 100 ตัวอย่าง และผลการวิเคราะห์ให้ค่าระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจต่ำกว่าที่มีรายงานในวารสารต่างประเทศค่อนข้างมาก ผู้วิจัยพยายามปรับเปลี่ยนวิธี แต่ไม่เป็นผล จึงตั้งสมมติฐานว่า การที่เอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจต่ำอาจเนื่องจาก คนไทยปกติมีระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจของไมโทคอนเดรียในกล้ามเนื้อต่ำกว่าคนเชื้อชาติอื่นที่มีอายุใกล้เคียงกัน หรืออาจเกิดจากชิ้นกล้ามเนื้อที่แพทย์ตัดให้นั้นส่วนใหญ่เป็นพังคืด เป็นเนื้อเยื่อไขมัน ไมโซเซลล์ กล้ามเนื้อ จึงทำให้จำนวนไมโทคอนเดรียมีน้อย เป็นผลให้ระดับเอนไซม์ต่ำ เพื่อจะให้แน่ใจว่าชิ้นตัวอย่างกล้ามเนื้อ มีจำนวนไมโทคอนเดรียปกติ จำต้องทำการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ Citrate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบใน matrix และถือเป็น marker หรือตัวชี้วัดจำนวนไมโทคอนเดรียว่ามีจำนวนปกติ ถ้าระดับ Citrate synthase ปกติ^(47,50) ซึ่งหมายความว่า ในการวิเคราะห์หาระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ หรือเซลล์ใด ๆ จะต้องทำการวิเคราะห์หาระดับ Citrate synthase ร่วมด้วย นอกเหนือจากการวิเคราะห์แต่ละกลุ่มเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีน และเมื่อได้ผลการวิเคราะห์แล้ว การแปลผลระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ จะต้องพิจารณาเริ่มจากค่า Citrate synthase ถ้าปกติ แต่มีกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจบางกลุ่ม เช่น Cpx I และ IV ต่ำ อย่างนี้จึงจะเชื่อถือได้ว่า ผลการวิเคราะห์ถูกต้องเชื่อถือได้ แต่ถ้าอีกชิ้นเนื้อหนึ่งได้ค่า Citrate synthase ต่ำ แต่ระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ Cpx I & IV กลับสูงกว่าปกติ เช่นนี้ย่อมแปลผลไม่ได้ เนื่องจากค่า Citrate synthase ต่ำ ดังนั้นชิ้นเนื้อที่มีจำนวนไมโทคอนเดรียน้อย ซึ่งพบได้ในโรคกล้ามเนื้อระยะรุนแรง ดังนั้นระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจทุกกลุ่มควรจะลดลง หรือต่ำกว่าปกติ

ในการวิเคราะห์หากลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจจากตัวอย่างชิ้นกล้ามเนื้อ 75 ตัวอย่างซึ่งคณะผู้วิจัยทำการเก็บใหม่ จึงต้องวิเคราะห์ Citrate synthase ให้ได้ค่าอยู่ในช่วงปกติตามที่มีรายงานในวารสาร ซึ่งแม้กระนั้นก็พบว่าระดับ

เอนไซม์ของไมโตคอนเดรียทุกตัวมีช่วงกว้างมาก และการหาค่าเฉลี่ยจาก 75 ตัวอย่าง จะเกิดปัญหาในเรื่องของค่า standard deviation (SD) ที่มีช่วงกว้างใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ย ผู้วิจัยจึงคำนวณค่าปกติของระดับเอนไซม์ลูกโซ่หายใจโดยการเขียนกราฟ Cumulative frequencies ของทั้ง 75 ค่าต่อเอนไซม์ในแกน Y กับค่า Specific activity ของเอนไซม์ในแกน X นั้น ๆ ซึ่งจะทำให้ได้กราฟเส้นตรง และใช้ช่วง 2.5-97.5 percentile (ครอบคลุม 95%) ของ Specific activity เป็นค่าของช่วงปกติของแต่ละกลุ่มเอนไซม์⁽⁴⁶⁾ และได้ค่าปกติของกลุ่มเอนไซม์ลูกโซ่หายใจในชั้นกล้ามเนื้อปกติของคนไทยดังปรากฏในตารางที่ 3 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าปกติที่รวบรวมได้จากรายงานต่างประเทศดังที่แสดงในตารางที่ 5

เมื่อสามารถกำหนดค่าปกติของเอนไซม์ลูกโซ่หายใจของไมโตคอนเดรียในคนไทยแล้ว ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นกล้ามเนื้อที่ตัดจากผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อต่าง ๆ จำนวน 56 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างเอนไซม์ที่ต่ำกว่าปกติกับโรคที่วินิจฉัย ยังไม่อาจสรุปได้ว่าถูกต้องสอดคล้องหรือคลาดเคลื่อนมากนักน้อยเพียงใด เช่น โรค MELAS ควรจะมีการลดต่ำของ Cpx I เป็นส่วนใหญ่ รายงานในตำราและวารสารให้ข้อมูลไว้เช่นนั้น ส่วนน้อยจะมีการลดต่ำลงของทั้ง Cpx I และ IV แต่ในการวิจัยครั้งนี้ ผลในตารางที่ 4 มีผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยจากอาการแสดงออกและที่แพทย์ตรวจพบว่าเป็น MELAS 3 ราย ผลการวิเคราะห์ระดับเอนไซม์พบว่าต่ำทั้ง Cpx II, III I-III และ II-III การที่ผลวิเคราะห์เอนไซม์เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจากเหตุผลหลายประการดังนี้

- ผู้ป่วยไม่ได้เป็น MELAS ในประการนี้เป็นการยากที่จะสรุป เนื่องจากวิธีวินิจฉัยทางคลินิกที่ดูจากอาการแสดง และอาการที่ตรวจพบ และอาจจะประกอบเข้ากับประวัติความเจ็บป่วย หรือผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการบางอย่าง แพทย์จะให้คำวินิจฉัยเช่นนั้น

- ผู้ป่วยเป็น MELAS แต่ผลการวิเคราะห์เอนไซม์คลาดเคลื่อน เนื่องจากค่าปกติที่ใช้เปรียบเทียบไม่ถูกต้อง ประเด็นนี้คิดว่าตัดไปได้ เนื่องจากค่าปกติที่คณะผู้วิจัยตั้งเกณฑ์ไว้สอดคล้องกับที่มีรายงานในวารสารต่างประเทศ และเป็นค่าที่ได้จากคนปกติถึง 75 ราย และแต่ละรายทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ จึงน่าจะอยู่ในเกณฑ์ที่รับได้

- ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น MELAS นั้นถูกต้องแล้ว แต่การที่ระดับเอนไซม์ต่ำหลายกลุ่ม อาจเนื่องจากว่าผู้ป่วยมารับการรักษาเมื่อมีอาการรุนแรง ไมโตคอนเดรียเสียหายมากแล้ว จึงทำให้ระดับเอนไซม์ห้วงลูกโซ่หายใจผิดปกติลดต่ำหลาย ๆ กลุ่ม

ดังนั้น การวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อที่เกิดจากความผิดปกติของไมโตคอนเดรียจะต้องอาศัยทั้งประวัติ อาการแสดง อาการที่ตรวจพบ ผลการตรวจทางพยาธิของชิ้นกล้ามเนื้อ รวมทั้งการย้อมชิ้นเนื้อวิธีพิเศษ และการตรวจระดับเอนไซม์ร่วมกับการตรวจความผิดปกติระดับดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย ซึ่งการตรวจความผิดปกติของดีเอ็นเอขณะนี้ตรวจได้แต่ดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย แต่เป็นที่ทราบกันว่ายีนที่ควบคุมหน่วยย่อยของแต่ละกลุ่มเอนไซม์ มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ควบคุมด้วย mtDNA ส่วนใหญ่ถูกควบคุมด้วย nDNA ซึ่งส่วนใหญ่ยังไม่ได้มีการทำ mapping ตำแหน่งของยีนเหล่านี้

จึงเห็นได้ว่าการวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้อซึ่งเกิดจากความผิดปกติในการทำงานของไมโตคอนเดรียค่อนข้างซับซ้อน ต้องอาศัยทั้งอาการทางคลินิกและการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งพยาธิวิทยาและการตรวจหาระดับเอนไซม์ห้วงลูกโซ่ หายใจทั้ง Cpx I ถึง IV และกลุ่ม OXPHOS ได้แก่ Cpx I-III, II-III และ V ประกอบการพิจารณา



สรุปผลการวิจัย

คณะผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างชิ้นกล้ามเนื้อจากผู้มารับการตรวจรักษาฆ่าตัดโรคกระดูกที่ภาควิชาออร์โทปีดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยไม่มีอาการผิดปกติทางกล้ามเนื้อจำนวนทั้งสิ้น 175 ตัวอย่าง วิเคราะห์กลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจของไมโทคอนเดรียคือ Cpx I ถึง IV และกลุ่มเอนไซม์ควบคุมห่วงลูกโซ่หายใจกับการสังเคราะห์สารพลังงานสูงในรูป ATP หรือกลุ่มเอนไซม์ OXPHOS ได้แก่ Cpx I-III, II-III และ V แล้วคัดออกไป 100 ตัวอย่างที่มีระดับของ Citrate Synthase ไม่เข้ากับระดับของกลุ่มเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจ เหลือที่ใช้ในการคำนวณหาค่าปกติของระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจเพียง 75 ตัวอย่าง นำผลที่วิเคราะห์มาเขียนกราฟระหว่าง Specific activity และ Cumulative frequency จะได้เป็นเส้นตรง Specific activity ในช่วง 2.5 ถึง 97.5 percentile ใช้เป็นช่วงของค่าปกติของแต่ละกลุ่มเอนไซม์ ซึ่งผลที่วิเคราะห์ได้ค่าปกติของระดับเอนไซม์ห่วงลูกโซ่หายใจแต่ละกลุ่มในคนไทยใกล้เคียงกับค่าปกติที่มีรายงานในวารสารต่าง ๆ

นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ตัวอย่างชิ้นกล้ามเนื้อของผู้ป่วยที่มีอาการผิดปกติของกล้ามเนื้อจำนวน 56 ตัวอย่าง โดยใช้ชิ้นเนื้อที่เหลือจากการศึกษาทางพยาธิวิทยาวิเคราะห์ ผลการศึกษามีทั้งที่สอดคล้องกับการวินิจฉัยทางคลินิกและที่ไม่เหมือนกับรายงานในวารสาร ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากความแตกต่างในเชื้อชาติ หรือระดับความรุนแรงของโรคในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ศึกษา ทั้งนี้ผู้ป่วยที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่มีอาการรุนแรง จึงมักพบความผิดปกติของระดับเอนไซม์ได้หลายกลุ่มในผู้ป่วยคนเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Cohn RM, Roth KS. Muscle: Normal and abnormal biochemistry and function. In : Cann CC, editor. **Biochemistry and diseases, Bridging basic science and clinical practice.** Baltimore : Williams & Wilkins, 1996 : 513-28.
2. Duggan DJ, Gorospe JR, Fonin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. **New Eng J Med** 1997 Feb 27 ; 336(9) : 618-24.
3. Byrne E. Biochemical effects in mitochondrial cytopathies: a new classification. **Aust Paediatr J** 1988 ; 24 Suppl 1 : 58-61.
4. Byrne E. Mitochondrial myopathies and myoencephalopathies. **Current Opinion in Rheumatol** 1990 ; 2 : 889-95.
5. Morgan-Hughes JA, Darvezina P, Kahn SN, Landon DN, Sheratt RM, Land JR, et al. A mitochondriak myopathy characterized by a deficiency in reducible cytochrome b. **Brain** 1997 ; 100 : 617-40.
6. Ogasahara S, Engel AG, Freus D, Mach D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989 ; 86 : 2379-82.
7. Di Mauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa Mand Di Vivo DC. Mitochondrial myopathies. **Ann Neurol** 1985 ; 17 : 521-38.
8. Petty RKH, Harding AE, Morgan-Hughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. **Brain** 1986 ; 109 : 915-38.
9. Trounce I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. **Lancet** 1989 March 25 ; 1 : 637-9.
10. Ernster L, Gkkos D, Luft R. Enzymatic activities of human skeletal muscle mitochondrial: A tool in clinical metabolic research. **Nature** 1959 ; 184 : 1851-4.
11. Morgan-Hughes JA. Mitochondrial diseases. In Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. **Myology, Basic & clinical (vol.2).** New York : McGraw-Hill, 1994 : 1610-60.
12. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature** 1981 ; 290 : 457-65.
13. Chomyn A, Mariottini P, Cleeter MW, Ragan CI, Matsuno-Yagi A, Hatefi Y, et al. Six unidentified reading frame of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory chain NADH dehydrogenase. **Nature** 1985 ; 314 : 592-7.
14. Chomyn A, Cleeter MW, Ragan CI, Riley M, Doolittle RF, Attardi G. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. **Science** 1986 Oct 31 ; 234 (4776) : 614-8.

15. Attardi G. Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome: a lesson in economy. *Trend Biochem Sci* 1981 ; 6 : 86-9,100-103.
16. Flier JS, Underhill LH. Mitochondrial DNA and disease. *New Eng J Med* 1995 ; 330(10) : 638-44.
17. Lee CP, Martens ME. Mitochondrial respiration and energy metabolism in muscle. In Engel AG, Franzini-Armstrong C, editors. *Myology, Basic & clinical (vol.1)*. New York : McGraw-Hill, 1994 : 624-47.
18. Hatefi J. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 1985 ; 54 : 1015-69.
19. Weiss H, Friedrich T. Redox-linked protein translocation by NADH-Ubiquinone reductase (Complex I). *J Bioeng Biomembr* 1991 Oct ; 23(5) : 743-54.
20. Ohnishi T. Structure of the succinate ubiquinone oxidoreductase (Complex II). In Lee CP, editor. *Current topics in bioenergetics (vol.15)*. New York : Academic Press, 1987 : 37-65.
21. Singer TP, Ramsay RR, Paech C. The flavoproteins of the respiratory chain. In Lee CP, Schatz G, editors. *Mitochondria and microsomes, Reading, mass*. New York : Addison-Wesley, 1981 : 155-90.
22. Yu CA, Yu L. Identification of ubiquinone binding proteins in ubiquinol-cytochrome c reductase by arylazide ubiquinone derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 1980 Sep 16 ; 96(1) : 286-92.
23. Nelson BD. The composition, structure, topology and function of Complex III (Ubiquinone-cytochrome C reductase). In Lee CP, Dallher G, Schatz G, editors. *Mitochondria and microsomes, Reading, Mass*. New York : Addison-Wesley, 1981 : 217-47.
24. Weiss H. Structure of the mitochondrial ubiquinone-cytochrome C reductase (Complex III). In Lee CP, editor. *Current topics in bioenergetics (vol.15)*. New York : Academic Press, 1987 : 67-90.
25. von Jagow G, Sebald W. b-Type cytochromes. *Annu Rev Biochem* 1980 ; 49 : 281-314.
26. Reiske JS, Hanson RE, Zangg WS. Studies on the electron transfer system, LIX, Distribution of iron and the component giving an electron paramagnetic resonance signal at $g=1.90$ in subfractions of complex III. *J Biol Chem* 1964 ; 239 : 3023.
27. Mitchell P. Protonmotive redox mechanism of the b-c₁ complex on the respiratory chain, Protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 1975 ; 56 :1.
28. Chance B, Powers L. Structure of cytochrome oxidase redox centers in native and modified forms, An EXAFS study. In Lee CP, editor. *Current topics in bioenergetics (vol.14)*. New York : Academic Press, 1985 : 1-19.
29. Chan SI, Li PM. Cytochrome oxidase, Understanding nature's design of proton pump. *Biochemistry* 1990 Jan ; 29(1) : 1-12.
30. Dickerson RE, Timkovich R. Cytochrome c. In Boyer PD, editor. *The enzyme (vol. 11)*. New York : Academic Press, 1975 : 397-547.

31. Beyer RE, Ernster L. The antioxidant role of coenzyme Q. In : Lenaz G, Barnabei O, Rabbi A, Battino M, editors. *Highlights in ubiquinone research*. London : Taylor & Francis, 1990 : 191-213.
32. Stigall DL, Galante YM, Hatefi Y. Preparation and properties of an ATP-P_i exchange complex (complex V) from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 1978 Feb 10 ; 253(3) : 956-64.
33. Futai M, Kanazawa H, Takeda K, Kagawa Y. Reconstitution of ATPase from the isolated subunits of coupling factor F₁'s of Escherichia coli and thermophilic bacterium PS3. *Biochem Biophys Res Commun* 1980 Sep ; 96(1) : 227-34.
34. Futai M, Noumi T, Maeda M. ATP synthase (H⁺-ATPase), Results by combined biochemical and molecular biological approach. *Annu Rev Biochem* 1989 ; 58 : 111-36.
35. Penefsky HS, Cross RL. Structure and mechanism of F₁F₀-Type ATP synthases and ATPases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1991 ; 64 : 173-214.
36. Lardy H, Reed P, Lin CHC. Antibiotic inhibitors of mitochondrial ATP synthesis. *Fed Proc* 1975 Jul ; 34(8) : 1707-10.
37. Heytler PG. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Methods in enzymology* 1979; 55 : 462-82.
38. Di Mauro S, Zeviani M, Bonilla E, Besolin N, Nakagawa M, Misanda AF, et al. Cytochrome C oxidase deficiency. *Biochem Soc Trans* 1985 ; 13 : 651-3.
39. Birch-Machin MA, Briggs HL, Saborido AA, Bindoff LA, Turnbull DM. An evaluation of the measurement of the activities of complex I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. *Biochem Med Met Bilo* 1994 ; 51 : 35-42.
40. Beaden JC Jr. Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein dye-binding assay. *Biochem Biophys Acta* 1978 ; 533 : 525-9.
41. Wallace DC, Zheng X, Lott MT, Shoffner JM, Hodge Ja, Kelly RI, et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF) : genetic, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 1988 Nov 18 ; 55 : 601-10.
42. Zheng X, Shoffner JM, Voljavec AS, Wallace DC. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. *Biochem Biophys Acta* 1990 ; 1019 : 1-10.
43. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudukray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994 ; 228 : 35-51.
44. Hatefi Y. Resolution of complex II and isolation of succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1). *Meth Enzymol* 1978 ; LIII : 27-34.
45. Krahenbuhl S, Talos C, Wiesmann U, Hoppel CL. Development and evaluation of a spectrophotometric assay for complex III in isolated mitochondria, tissues and fibroblasts from rat and humans. *Clin Chim Acta* 1994 ; 230 : 177-87.

46. Zheng X, Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Krawiecki NS, Winn K, et al. Evidence in a lethal infantile mitochondrial disease for a nuclear mutation affecting respiratory complexes I and IV. *Neurol* 1989 ; 39 : 1203-9.
47. Haas RH, Nasirian F, Nakano K, Ward D, Pay M, Hill R, et al. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995 ; 37 : 714-22.
48. Takemori S, King TE. Reconstitution of respiratory chain enzyme system XIII sequential fragmentation of succinate oxidase : preparation and properties of succinate-cytochrome C reductase and the cytochrome B-C₁ particle. *J Biol Chem* 1964 ; 239(10) : 3546-58.
49. Ackrell BAC, Kearney EB, Singer TP. Mammalian succinate dehydrogenase. *Meth Enzymol* 1978 ; 53 : 466-8.
50. Shepherd D, Garland PB. Citrate synthase from rat liver. *Meth Enzymol* 1969 ; 13 : 11-16.
51. Chretien D, Rustin P, Bourgeron T, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clin Chim Acta* 1994 ; 228 : 53-70.



สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย