

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

จากการศึกษาในโครงการ “กล้ามเนื้ออ่อนแรงจากโพแทสเซียมต่ำในประเทศไทย” ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจาก ส.ก.ว. พบว่า Hypokalemic periodic paralysis จัดเป็นโรคหนึ่งในโรคกลุ่มนี้ เราอาจจะสามารถแบ่งโรคกลุ่มนี้ออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามความชุกของโรค [1] ดังต่อไปนี้คือ

1. Hypokalemic periodic paralysis (HypoPP)
2. Thyrotoxic periodic paralysis (TPP)
3. Renal tubular acidosis (RTA)

แต่ละโรคมีรายละเอียดของด้านคลินิกและการตรวจห้องปฏิบัติการรวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรม ดังรายงานที่ได้ตีพิมพ์ไปแล้ว [1]

และจากโครงการ “การเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase ในกล้ามเนื้อของผู้ป่วยกล้ามเนื้ออ่อนแรงจากโพแทสเซียมต่ำ” ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจาก ส.ก.ว. ผู้วิจัยและคณะ ได้ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่าง thyroxine ฮอร์โมนกับการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase บนกล้ามเนื้อลายของมนุษย์ ดังรายงานที่ได้ตีพิมพ์ไปแล้ว [2]

ในกลุ่มโรค Thyrotoxic periodic paralysis (TPP) ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกคล้ายคลึงกับโรค Familial hypokalemic periodic paralysis (Familial HypoPP) แต่ไม่มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมทางคลินิก ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง [1] และพบมากในประเทศแถบเอเชียเช่น ไทย จีน เกาหลี ฮองกง [3-5] ขณะเกิดอาการผู้ป่วยจะมีอาการ hyperthyroidism ร่วมกับมี hypokalemia ร่วมด้วยทุกครั้ง เมื่อรักษาภาวะ Hyperthyroid ดีแล้ว อาการแขนขาอ่อนแรงก็จะไม่เกิดขึ้นอีก [3-5]

มีรายงานพบว่า Thyroid hormone สามารถ up regulate expression ของ Na-K ATPase ใน skeletal muscle ของหนูได้ [6-10] ผู้วิจัยและคณะ ได้ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่าง thyroxine ฮอร์โมนกับการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase บนกล้ามเนื้อลายของมนุษย์ และพบว่า Thyroid hormone สามารถ up regulate expression ของ Na-K ATPase ใน skeletal muscle ของคนได้ [2]

Na-K ATPase pump เป็น enzyme และเป็น protein ที่อยู่บนผิวเซลล์ (cell membrane) ของ cell ต่าง ๆ ในร่างกายแทบทุกชนิด เป็น membrane protein ที่ใช้พลังงานจาก ATP และมีความสำคัญอย่างมากอย่างหนึ่งในการดำรงชีวิต [11-13] หน้าที่หลักของ pump นี้คือแลกเปลี่ยน Na^+ และ K^+ ระหว่าง intracellular และ extracellular ที่เซลล์กล้ามเนื้อ pump นี้มีหน้าที่ดูด K^+ เข้า cell และขับเอา Na^+ ออกนอก cell

ลักษณะทางกายวิภาค pump นี้ประกอบด้วย α & β subunit แต่ละอวัยวะก็จะมีลักษณะโครงสร้าง subunit และ isoform ที่แตกต่างกันออกไป. อย่างไรก็ตามข้อมูลต่าง ๆ ที่

เกี่ยวข้องกับ subunit และ isoform ยังไม่ชัดเจนนัก เช่นที่ใดจะมี α_1 & β_1 เด่น [14] แต่ที่กล้ามเนื้อ α_2 & β_1 จะเป็น subunit ที่เด่น [15-18]

มีการศึกษาพบว่าถ้าเอาหนูที่เป็น hypothyroid มา induce ให้เกิด euthyroid หรือ hyperthyroid โดยฉีดยา thyroid hormone (T3) แล้วตัดกล้ามเนื้อของหนูนั้นมาตรวจ จะพบว่ามีการ expression ของ α_2 และ β_2 subunit ของ Na-K ATPase pump ของหนูในภาวะ hyperthyroid เพิ่มขึ้นเทียบกับภาวะ euthyroid หรือ hypothyroid [6] นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาทางด้าน biochemistry พบว่าจำนวน pump ของ Na-K ATPase ในกล้ามเนื้อของมนุษย์เพิ่มขึ้นในภาวะ hyperthyroid และลดลงในภาวะ hypothyroid และสัมพันธ์กับระดับ thyroid hormone ที่เปลี่ยนไปในเลือด [19] ยิ่งไปกว่านั้นมีการศึกษาพบว่า subunit ที่มีความสำคัญในกล้ามเนื้อของมนุษย์คือ Isoform α_2 และ β_1 subunit [15] และยังพบต่อไปว่าการออกกำลังกายและการให้ insulin สามารถทำให้เกิดการ translocation ของ α_2 และ β_1 subunit จาก cytoplasm ไป plasma membrane ใน cell กล้ามเนื้อของมนุษย์ได้ [16-18]

เมื่อนำข้อมูลมารวมกันจึงมีความเป็นไปได้ว่า ภาวะ hyperthyroid อาจจะมีผลกระตุ้นทำให้จำนวนและการทำงานของ Na-K ATPase pump มากขึ้น มีผลทำให้กล้ามเนื้อซึ่งเป็น storage ของ K^+ ที่มากที่สุดดูดเอา K^+ เข้า cell จึงทำให้เกิดภาวะ hypokalemic ตามมาได้ อย่างไรก็ตามคำถามที่สำคัญคือ ทำไมผู้ป่วย hyperthyroid ทุกรายไม่เกิดภาวะ hypokalemia ? มีกลไกอะไรบ้างเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด hypokalemia และนำไปสู่การเกิดโรค TPP ตามมาจึงเป็นคำถามที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป?

มีข้อมูลต่อมาอีกว่าภาวะ hypokalemia ลด expression ของ Na-K ATPase pump [20] จึงมีความน่าสนใจว่าภาวะ hypokalemia จากสาเหตุของโรคต่างๆเช่น hyperaldosteronism จะมี expression ของ Na-K ATPase ต่างกันหรือไม่อย่างไร ?

ในประเทศไทยรวมทั้งต่างประเทศไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบ expression ของ Na-K ATPase ในผู้ป่วยที่เป็น hyperaldosteronism (Conn's syndrome)

โครงการ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase ใน Conn's syndrome patients ใน stage ต่าง ๆ เทียบกับคนปกติ

วัตถุประสงค์

1. Identify ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อ
 - Familial hypokalemic periodic paralysis
 - Primary hyperaldosteronism (Conn's syndrome)
 - TPP (thyrotoxic periodic paralysis)
 - Grave's disease (hyperthyroid)
 - Normal control subject case ซึ่งเป็นผู้ป่วยผ่าตัดทางจากทาง Orthopedics 10 คน
2. Set up the Na-K ATPase activity (3-O-MFPase Assay) in control rat and human muscles. โดยใช้วิธี 3-O-MFPase Assay (Na^+, K^+ -ATPase activity)
3. ดูการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase activity ใน คนปกติเทียบกับผู้ป่วย hyperaldosteronism (Conn's syndrome)
4. ดูการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase mRNA ใน stage ต่าง ๆ เฉพาะของผู้ป่วย Conn's syndrome ในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะ hypertaldosteronism, normoaldosteronism
5. ดูการเปลี่ยนแปลงของ protein Na-K ATPase expression ใน stage ต่าง ๆ ของผู้ป่วย Conn's syndrome ในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะ hypertaldosteronism, normoaldosteronism
6. ดูความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase mRNA กับ การเปลี่ยนแปลงของ protein Na-K ATPase expression ใน stage ต่าง ๆ ของผู้ป่วย thyrotoxic periodic paralysis

วิธีดำเนินงานวิจัย (ระเบียบวิธีการวิจัย ขอบเขตงานวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการ)

1. คัดเลือกผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรค Conn's syndrome (hyperaldosterone), hyperthyroid ตาม criteria คือตรวจพบ TFT (thyroid function test) มีค่าสูงผิดปกติ
2. คัดเลือกผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรค Grave's disease (hyperthyroid), & control
2. ตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยชิ้นเล็ก ๆ บริเวณต้นขา (Vastus lateralis) ขณะที่ผู้ป่วยมีอาการแขนขาอ่อนแรงร่วมกับ hypo K^+
(ทั้งนี้การตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเรียบร้อยแล้ว)

3. ทำการตรวจชิ้นเนื้อซ้ำเฉพาะในผู้ป่วย Conn's syndrome, TTP (thyrotoxic periodic paralysis) & Grave's disease ขณะที่ผู้ป่วยหายจากอาการไทรอยด์เป็นพิษ (hyperthyroidism) และเข้าสู่ภาวะไทรอยด์ปกติ (euthyroidism) โดยยาด้านไทรอยด์หรือการผ่าตัด thyroid ซึ่งปกติจะใช้เวลาประมาณ 3-6 เดือน
4. นำชิ้นเนื้อที่ได้มาเก็บที่ -80°C เพื่อเตรียมใช้ในการตรวจทาง immunohistochemistry
5. Characterize Na-K ATPase antibody ($\alpha 1$, $\alpha 2$ และ $\beta 1$ และ $\beta 2$) ที่ซื้อมาจากต่างประเทศ เพื่อดูว่าสามารถจะย้อมติด muscle ของคนได้หรือไม่โดยใช้ muscle จาก case ผ่าตัดทาง orthopedic ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยแล้ว โดยทดลองปรับ dilution ของ antibody และ condition ต่างๆ
6. เมื่อได้ condition แล้วนำ antibody นั้นมาเปรียบเทียบกับ
 - 6.1 case ผ่าตัดทางจากผู้ป่วยทาง Orthopedic ที่มีการทำ amputation ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยแล้ว
 - 6.2 ผู้ป่วย Hyperthyroid ที่ไม่มี muscle weakness ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเช่นกัน
 Negative control ได้แก่
 - 6.3 การย้อมโดยไม่ใส่ primary antibody (ใส่แต่ secondary antibody)
 - 6.4 การย้อม tissue อื่นๆ ที่ไม่ express Na-K ATPase
7. เมื่อ verify antibody เรียบร้อยแล้ว เราจะทำการทดสอบ expressive ของ Na - K ATPase ในภาวะต่างๆ ดังต่อไปนี้

Expression of muscle Na-K ATPase ของผู้ป่วย Grave's disease ใน stage ต่างๆ

 - 7.1 Hyperaldosterone stage (before treatment)
 - 7.2 Normoaldosterone stage (after treatment)
 - 7.3 Hyperthyroid stage (before treatment)
 - 7.4 Euthyroid stage (after treatment)

วิธีการทำ Muscle Biopsy

1. การทำ muscle biopsy จะทำที่ห้องผ่าตัดเล็ก ณ ตึกห้องฉุกเฉินโดย นพ.ชูศักดิ์ กิจคุณาเสถียร (Chusak Kijkunasathian, M.D.) ซึ่งเป็นอาจารย์ภาควิชา Orthopedic
2. กล้ามเนื้อบริเวณต้นขา (Vastus lateralis) ที่ทำ biopsy ต้องมีลักษณะดังนี้
 - 2.1 กล้ามเนื้อที่อยู่บริเวณตอนกลาง ไม่ค่อนไปทาง origin หรือ insertion
 - 2.2 เป็นกล้ามเนื้อที่ถูก involvement ปานกลาง (ไม่ใช่เบา หรือ รุนแรงจนเกินไป)
 - 2.3 ไม่ถูกเข็ม E.M.G. ปัก ภายในระยะเวลาน้อยกว่า 7 วัน ก่อนทำ biopsy
3. ฉีดยาชาด้วย 1% xylocain without adrenaline ที่บริเวณผิวหนัง และ subcutaneous tissue
4. ใช้มีดเปิดผิวหนัง และเนื้อเยื่อ จนถึงกล้ามเนื้อ แล้วเลาะกล้ามเนื้อ ให้ได้ขนาดยาว 2 cm. กว้าง 0.5 cm. และสูง 0.5 cm. จากนั้นผูกด้วยเชือกที่บริเวณหัวท้าย ตัดกล้ามเนื้อ ให้เชือกอยู่ในตัวผู้ป่วยเพื่อป้องกันเลือดออกหลังผ่าตัด
5. ห่อกล้ามเนื้อที่ได้ ด้วยผ้าก๊อซชุบด้วย NSS พอหมาด แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ ตรวจชิ้นเนื้อ ภายใน 15 นาที muscle จะถูกแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ
 - 4.1 ส่วนที่ 1 เก็บเป็น Snap Freeze
 - 4.2 ส่วนที่ 2 Fix 10% buffer Neutral formalin ทำ permanent slide
 - 4.3 ส่วนที่ 3 Fix ด้วย glutaraldehyde สำหรับตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (E.M.)
6. การเขียนใบ Request ให้ใช้แบบส่งชิ้นเนื้อของ pathology เขียนรายละเอียดต่างๆ (ประวัติ, ตรวจร่างกาย, investigation, progression และการรักษาที่ได้รับ)

วิธีการวัด Na-K ATPase activity

Set up the Na-K ATPase activity (3-O-MFPase Assay) in control rat and human muscles. โดยใช้วิธี 3-O-MFPase Assay (Na^+, K^+ -ATPase activity) โดยพัฒนาร่วมกับ ร.ศ.วรนุช ฉัตรสุทธิพงษ์, ภาควิชา Physiology, คณะวิทยาศาสตร์, ม.มหิดล

วิธีการทำ 3-O-MFPase Assay

- 1 Frozen muscle samples in at -80°C were prepared for study.
- 2 Muscle sample were cut $\sim 30\text{-}40$ mg and blot on filter paper before weight.
- 3 Add homogenate buffer 0.6-0.8 ml. (5% w/v)
(Homogenate buffer = 250mM sucrose, 2mM EDTA, 10 mM Tris (pH=7.4))
- 4 Homogenize at 0°C for 2x20s, 20000 rpm. or 3x20 s, 16000 rpm.
- 5 Aliquot homogenate sample (cryotube) and freeze and stored in liq N_2
- 6 Freeze and thaw four times and dilute 1/5 in cold homogenate buffer.

- 7 Incubate 30 μ l diluted homogenate sample in 2.5 ml assay medium at 37^oC, 5 min. (Assay medium = 5mM MgCl₂, 1.25mM EDTA, 100mM Tris, 80nM 3-O-MF pH=7.)
- 8 Add 40 μ l of 10mM 3-O-MFP to initial the reaction (final conc. = 160 μ M)
Measure the reaction for 60 s with continuous stirring spectrometer 37^oC (A)
(Excitation wavelength was 475 nm, emission wavelength was 515 nm with 4-nm slit widths)
- 9 Add 10 μ l of 2.58 M KCl to stimulate K⁺ dependent phosphate activity (final conc. =10 mM)
- 10 Measure the reaction for 60 s with continuous stirring spectrometer 37^oC (B)

Na⁺,K⁺-ATPase activity = B-A (nmole/min/g wet wt or pmole/min/mg protein)

After verify the biochemistry condition, the activity of Na–K ATPase in various conditions will be tested.

(I) The Na–K ATPase activity of

- A. Muscles from control euthyroid (Orthopedic case)
- B. Muscle from hyperthyroid patients
- C. Muscle from TPP patients (hyperthyroid + hypo K⁺)

(II) The Na–K ATPase activity of thyrotoxic periodic paralysis patients in each stage

1. TPP in hyperthyroid stage (before treatment)
2. TPP in euhyroid stage (after treatment)

Summary of Methods

Na⁺ - K⁺ - ATPase activity

K⁺ - stimulated 3-O-methylfluorescein phosphatase assay (3-O-MFPase) was used to measure skeletal muscle Na⁺ - K⁺ - ATPase activity as previously described by Norgaard et al. with some minor modifications. Muscle sample (50 mg) was homogenized in 450 μ L of homogenate buffer (30 mM histidine (pH 7.4), 2 mM EDTA and 250 mM sucrose), freeze-thawed 4 times and then diluted 1:10 in cold homogenate buffer. Then, 15 μ L aliquot of homogenate was added in assay solution containing 19.5 μ M 3-O-methylfluorescein phosphate, 4 mM MgCl₂, 1.25 mM EDTA and 80 mM Tris

(pH 7.6). After 90 seconds, 10 μ L of 2.58 M KCl (final concentration 10 mM) was added. Activity was calculated from the difference in the slope of fluorescence before and after addition of KCl. Excitation wavelength was set at 475 nm and emission wavelength 515 nm, with 5 nm-slit widths. Homogenate protein content was determined using a BCA Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Average specific 3-O-MFPase activity was determined from three experiments, and intra- and inter-assay variability was ~ 9% and 5.8% respectively.

Intra-assay coefficient of variation is calculated from the formula:

$$\frac{\text{Mean of the Standard Deviations of the duplicates} \times 100}{\text{Grand mean of the duplicates}}$$

Inter-assay coefficient of variation is calculated from the formula:

Standard Deviation of the means of the duplicates x 100

Grand Mean of the Duplicates

	INTRA		INTER	
1	mean	8.12	8.12	0.46
			7.75	
	SD.	0.71	7.27	
			8.51	
2	mean	7.75	8.09	
	SD.	0.89		
3	mean	7.27		
	SD.	0.89		
4	mean	8.51		
	SD.	0.52		
5	mean	8.09		
	SD.	0.58		

Intra-assay coefficient of variation

Mean of the Standard Deviations of the Duplicates = 0.72

Grand mean of the duplicates = 7.95

Intra-assay coefficient of variation = 9.0181 %

Inter-assay coefficient of variation

Standard Deviation of the means of the duplicates = 0.46

Grand Mean of the Duplicates = 7.95

Inter-assay coefficient of variation = 5.8491 %

This study

- ทำในหนูได้ activity ~ 260 nmole/g wet wt/min
- Control ใช้ muscle ของคนปกติ ซึ่งจะมีสารที่ใช้ preserve อยู่ด้วย ประมาณ 50 % ทำให้เวลาซึ่งต้องเอาหน.ของ preserve ไปหักลบด้วย
- Activity ของ control (human control) น้อยกว่า ของหนูประมาณ 50%
- ทำในคนได้ activity ~ 121 nmole/g wet wt/min

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase mRNA expression ใน Conn's syndrome patients ใน stage ต่าง ๆเทียบกับคนปกติ

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. นำชิ้นเนื้อที่ได้จากการเก็บที่ -80°C เพื่อเตรียมใช้ในการตรวจทาง mRNA expression
2. Total RNA จะถูก extract โดย FastRNA reagents (BIO 101, Vista, CA, USA)
3. RNA pellet was dissolved in EDTA-treated water and stored at -80°C
4. Total RNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm.
5. For each sample, 1 μg of RNA was transcribed into cDNA using the Promega AMV Reverse Transcription Kit (kit A3500; Promega, Madison, WI, USA) and was stored at -20°C for subsequent analysis.
6. Primer and probe optimization and validation of amplification efficiency were carried out.
7. The ABI 7700 real-time PCR system was used for relative quantification
8. Triplicate wells were run for each sample.
9. Measurements included a no-template control, as well as a human muscle sample endogenous control.
10. Primer sequences (α 1-3 และ β 1-3) were designed from published sequence

Gene	α 1
Forward Primer	5'- GCC AAT GTG CCG GAA GG - 3'
Reverse Primer	5'- CAT GCG TTT GGC AGT AAG TGT C- 3'
Probe	5'- TTG CTG GCC ACT GTC ACG GTC TG- 5'
Gene	α 2
Forward Primer	5'- GAA TGA GAG GCT CAT CAG CAT G - 3'

Reverse Primer	5'- CAA AGT AGG TGA AGA AGC CAC CC - 3'
Probe	5'- CCT ACG GAC AGA TCG GGA TGA TCC AG - 3'
Gene	$\alpha 3$
Forward Primer	5'- GGT GGC TAT GAC AGA GCA CAA G - 3'
Reverse Primer	5'- TGC ACA CAG TGT GTG TTG TAT TTC C- 3'
Probe	5'- CAAAGCCCAGGAGATCC - 3'
Gene	$\beta 1$
Forward Primer	5'- TCA GTG AAT TTA AGC CCA CAT ATC A -5'
Reverse Primer	5'- CTT CTG GAT CTG AGG AAT CTG TGT T-5'
Probe	5'- CGA GTG GCC CCG CCA GGA T - 3'
Gene	$\beta 2$
Forward Primer	5'- CCT GCC AAT TCA ACC GGA - 3'
Reverse Primer	5'- CTG TAA CCA TAG TGG GTG GAG TCC- 3'
Probe	5'- CAGCCCTGTGTCTTCA - 3'
Gene	$\beta 3$
Forward Primer	5'- AGT CTG TCC TGA TGG AGC ACT TT- 3'
Reverse Primer	5'- GCA TGC TTG AAG TAA TGA AAT AGG AA- 3'
Probe	5'- CTGCATGCTTGAAGTAATGA - 3'

11. เมื่อได้ condition แล้วนำ mRNA นั้นมาเปรียบเทียบกับโดยมี

positive control ได้แก่ skelaton muscle บริเวณตำแหน่งเดียวกันจาก

11.1 case ผ่าตัดทางจากผู้ป่วยทาง Orthropedic ที่มีการทำ amputation ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยแล้ว

11.2 ผู้ป่วย conn's syndrome ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเช่นกัน

Negative control ได้แก่

11.3 การทำ Real-time PCR โดยไม่ใส่ template (ใส่แต่ reagens)

12 เมื่อ verify condition เรียบร้อยแล้ว เราจะทำการทดสอบ mRNA expressive ของ Na-K ATPase ในภาวะต่างๆ ดังต่อไปนี้

(I) mRNA expression of muscle Na-K ATPase ในภาวะต่างๆ

1. muscle คนปกติที่ normoaldosterone (ได้จาก case ผ่าตัดทาง orthopedic)
2. muscle คนที่เป็นโรค conn's syndrome ก่อนรักษา
3. muscle คนที่เป็นโรค conn's syndrome หลังรักษา

Summary methods of Quantitative RT-PCR

A quantitative RT-PCR was performed as previously described. In brief, RNA was extracted from 10-50 mg of muscle using a commercial kit (Trizol, Life Technologies Inc., Ohio, USA). For each sample, 1 μ g of RNA was reverse transcribed to cDNA using a Promega avian myeloblastosis virus reverse transcription kit (Promega, Madison, WI), and the cDNA was stored at -20 °C until analyzed.

Specific primers and probes were used to amplify mRNA of Na⁺ - K⁺ - ATPase α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 and β_3 subunits. Probes were 5'- and 3'-labeled with 6-carboxyfluorescein and 6-carboxy-*N,N,N',N'*-tetramethylrhodamine respectively. GAPDH mRNA content (as internal control) was determined by using commercial primers and probes (P/N 4326317E, Applied Biosystems). Primers and probes optimization and validation were carried out. The relative efficiency of the test targets of all 6 subunit isoforms of Na⁺ - K⁺ - ATPase was calibrated. Validation of the different PCR amplicon sizes were performed by electrophoresis (2% agarose gel stained with ethidium bromide). This was used for relative quantification. Each PCR reaction contained 1 μ l of cDNA and 12.5 μ l of 2X TaqMan Universal PCR MasterMix (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase uracil *N*-glycosylase, dNTPs with dUTP, buffer components, ROX as passive reference; Applied Biosystems). Primers, probe, and water were added to give a final reaction volume of 25 μ l/well. Thermal cycling (ABI 7000 real-time PCR system) was conducted as follows: incubation at 50 °C for 2 minutes; 95 °C for 10 minutes; and 40 cycles of 95 °C for 15 seconds, followed by 60 °C for 1 second. Each experiment was conducted in triplicate. The intra- and inter-assay coefficients of variance for each gene was 8% and 9% for α_1 , 9 % and 8% for α_2 , 10% and 8% for α_3 , 9 % and 7% for β_1 , 11 % and 9% for β_2 and 10% and 11% for β_3 , respectively. The comparative C_T method (multiplex PCR, same tube) was used to calculate the relative mRNA level (Applied Biosystems). There was no statistical difference of the average C_T of GAPDH mRNA among the samples (*P* = 0.13).

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ protein Na-K ATPase expression ใน Conn's syndrome patients ใน stage ต่าง ๆเทียบกับคนปกติ

Immunoblot analysis

Immunoblotting was performed as previously described. In brief, a muscle sample (30 mg) was homogenized on ice in a buffer (25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 5 mM EGTA, 50 mM NaF, 1 mM sodium vanadate, 10% glycerol, 17.4 μ g/ml phenylmethanesulphonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin and 1 μ g/ml aprotinin). Twenty μ g (for analysis of α_1 , α_2 and α_3 subunits) or 40 μ g (for analysis of β_1 , β_2 and β_3 subunits) of protein were separated by 10 % SDS-polyacrylamide gel-electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated for 2 h with a blocking buffer (5% non-fat milk in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST)) and then incubated overnight at 4° C in primary antibodies (anti- α_1 polyclonal antibody (lot no 06520), anti- α_2 polyclonal antibody (lot no AB9094), anti- β_1 polyclonal antibody (lot no 06170), anti- β_2 polyclonal antibody (lot no 610993; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), anti- α_3 monoclonal antibody (lot no MA3-915; Affinity Bioreagents, Golden, CO), and anti- β_3 monoclonal antibody (lot no 610993; Transduction Laboratories)). Anti- α (α_1 - α_3) and anti- β (β_1 - β_3) antibodies were diluted 1:2,000 and 1:5,000 respectively. Membranes were washed in 0.05% TBST and incubated for 1 hour in horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (goat anti-mouse for monoclonal antibody or goat anti-rabbit immunoglobulins for polyclonal antibody, diluted 1: 10,000 in TBST). After 3 washes, membranes were incubated with chemiluminescent substrate (Pierce SuperSignal, West Pico, IL). The signal was detected and recorded (Pierce CL-X Posure, West Pico, IL). Resulting autoradiographs were densitometrically scanned and quantified.

ผลงานวิจัยที่ได้รับ

ขณะนี้ได้รับรวบรวมชิ้นเนื้อผู้ป่วยเป็นโรคตาม criteria ได้ทั้งสิ้น 24 คน

- Familial hypokalemic periodic paralysis ได้ทั้งสิ้น 4 คน
 - Primary hyperaldosteronism ได้ทั้งสิ้น 6 คน
 - TPP (thyrotoxic periodic paralysis) ได้ทั้งสิ้น 6 คน
 - Grave's disease (hyperthyroid) ตาม criteria ได้ทั้งสิ้น 8 คน
 - Normal control subject case ซึ่งเป็นผู้ป่วยผ่าตัดทางจากทาง Orthopedics 10 คน
- 1 ได้ Set up the Na-K ATPase activity (3-O-MFPase Assay) in control rat and human muscles. โดยใช้วิธี 3-O-MFPase Assay (Na^+ , K^+ -ATPase activity) เป็นที่เรียบร้อย
 - 2 ดูการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase activity ใน คนปกติเทียบกับผู้ป่วย Hyperaldosteronism (Conn's syndrome)
 - 3 ดูการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase mRNA ใน stage ต่าง ๆ เฉพาะของผู้ป่วย Conn's syndrome ในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะ hypertaldosteronism, normoaldosteronism
 - 4 ดูการเปลี่ยนแปลงของ protein Na-K ATPase expression ใน stage ต่าง ๆ เฉพาะของผู้ป่วย Conn's syndrome ในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะ hypertaldosteronism, normoaldosteronism
 - 5 ตรวจพบความสัมพันธ์ระหว่าง aldosterone และ Na-K ATPase ในกล้ามเนื้อลายของมนุษย์ โดยการทดลองนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าในกล้ามเนื้อลายมนุษย์ aldosterone ฮอร์โมนควบคุมการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน Na-K ATPase อย่างน้อยที่สุดหรือส่วนหนึ่งในระดับ mRNA และ α_2 และ β_1 subunit เป็นตัวการสำคัญในการควบคุมนี้

Results

Clinical features and laboratory data of 6 Conn's syndrome patients at the first time of diagnosis are shown in **Table 1**. As expected, blood pressures and HCO_3^- levels of Conn's syndrome patients were higher than those of normal controls. Hypokalemia was also observed. These parameters were corrected prior to biopsy. As shown in Table 1, there are no significant differences in blood pressure, serum potassium level, acid-base, and sodium and potassium balance among pre-adrenalectomy patients, post-adrenalectomy patients and control subjects. In contrast, in Conn's syndrome patients, the average pre-surgery plasma aldosterone level (235.0 ± 51.1 pg/mL) was ~ 3.5 times higher than that of post-surgery (64.5 ± 25.1 pg/mL) and of a normal control group (66.5 ± 13.0 pg/mL) ($P < 0.01$). There was no significant difference in plasma aldosterone level between post-surgery patients and control subjects (Table 1 and Figure 1A).

The average skeletal muscle $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase activity of pre-surgery Conn's syndrome patients (128.7 ± 12.3 nmol·mg protein $^{-1}$ ·h $^{-1}$) was about 1.6 and 1.5 times higher than that of post-surgery (79.4 ± 13.3 nmol·mg protein $^{-1}$ ·h $^{-1}$) and control subjects (88.7 ± 5.1 nmol·mg protein $^{-1}$ ·h $^{-1}$) respectively ($P < 0.05$) (Figure 1B). There was no difference in $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase activity between post-surgery patients and control subjects. A positive correlation existed between the plasma aldosterone level and $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase activity of Conn's syndrome patients and control subjects ($r = 0.71$, $P < 0.01$), (Figure 2A), which implied that the increased muscle $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase activity in Conn's syndrome may have been upregulated by aldosterone.

In the skeletal muscle of Conn's syndrome patients, mRNA expressions of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase α_2 and β_1 subunits were higher in pre-surgery (hyperaldosterone) than in post-surgery (normoaldosterone) biopsy samples by about 2.4 (2.45 ± 0.31 vs 1.04 ± 0.17 , $P < 0.05$, for α_2) and 1.9 (1.92 ± 0.22 vs 1.02 ± 0.14 , $P < 0.05$, for β_1) times respectively (Figure 3). In contrast, there were no differences in α_2 and β_1 subunit expressions between post-surgery and control subjects. There were no changes in α_1 , α_3 , β_2 , or β_3 subunit mRNA levels among the 3 groups.

Elevation of α_2 and β_1 subunit mRNA expression levels resulted in a corresponding increase in $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase α_2 and α_1 subunit proteins about 2.2 (2.17 ± 0.33 vs 0.98 ± 0.09 , $P < 0.05$, for α_2) and 1.8 (1.70 ± 0.17 vs 0.90 ± 0.17 , $P < 0.05$, for β_1) times respectively, in pre-surgery compared to post-surgery (Figure 4). As expected, there was no change in protein levels of α_1 , α_3 , β_2 , or β_3 subunits among the three groups (Figure 4).

In addition, the expression levels of Na⁺ - K⁺ - ATPase α_2 and β_1 subunit mRNA were positively correlated with plasma aldosterone levels ($r = 0.75$, $P < 0.01$ for α_2 and $r = 0.78$, $P < 0.01$ for β_1) (Figure 2B & 2C).

Discussion

Hypertension, hypokalemia, and muscle weakness are classical presentations of Conn's syndrome. Hypokalemia can cause muscle weakness. In general, hypokalemia can result from potassium depletion induced by abnormal loss of potassium or by cellular potassium redistribution. The etiology of hypokalemia varies and is based on clinical setting and laboratory data.

Aldosterone is a critical hormone in renal handling of potassium by stimulating Na⁺ - K⁺ - ATPase synthesis and activity in the collecting tubules. Moreover, the role of extrarenal mineralocorticoid in regulating potassium excretion via the gastrointestinal (GI) tract and potassium redistribution in many cell types has been reported. Human skeletal muscle comprises nearly 60% of the lean body mass and contains the largest store of the body's potassium as well as a major portion of Na⁺ - K⁺ - ATPase. Thus, aldosterone might also play an important role in modulating cellular redistribution of potassium via Na⁺ - K⁺ - ATPase activity.

Although it has been generally assumed that the regulation of Na⁺ - K⁺ - ATPase by aldosterone observed in rodent skeletal muscle or cell culture is likely to be similar to that in human skeletal muscle, this has not been shown directly in human skeletal tissue, especially in pathological conditions. This study demonstrated for the first time in human skeletal muscle that Na⁺ - K⁺ - ATPase activity is modulated by high plasma aldosterone levels. An increase in Na⁺ - K⁺ - ATPase activity in hyperaldosterone (Conn's syndrome) patients was likely due to an increase in levels of α_2 and β_1 (but not α_1 , α_3 , β_2 , or β_3) subunit mRNA and protein and these parameters returned to normal levels after surgical removal of the adenoma. It is unlikely that an increase in activity and gene expression of Na⁺ - K⁺ - ATPase was due to an increase in the blood pressure, low plasma potassium level, or acid-base disturbance since both pre- and post-adrenalectomy groups had these parameters comparable to that of the control group. In addition, it is unlikely that the changes observed were due to the use of

antihypertensive agents as both nifedipine and hydralazine have been shown to have no effect on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ subunits in the cardiac muscles of rats and nifedipine has no effect on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in isolate smooth muscle membranes from rat aorta. However, we cannot totally exclude the possibility that these drugs might have some effects on skeletal muscle $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity. Unfortunately, we could not obtain the appropriate controls (muscle biopsies from hypertensive patients before and after using the same hypertensive drugs and doses), due to ethical issues, in order to clarify this confounding factor.

The correlation of the plasma aldosterone level with both mRNA and protein abundance of the α_2 and β_1 subunits implies that increased plasma aldosterone leads to upregulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ protein expression, at least in part, at the transcriptional level. These results are in contrast with those of Dorup *et al.* who reported that administration of aldosterone into a rat for 7 days produces hypokalemia and a graded reduction in K^+ content in skeletal muscle, which closely correlates to a downregulation of the [^3H] ouabain-binding sites, and concluded that mineralocorticoids induce a downregulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ which is secondary to the concomitant K^+ deficiency. It is well known that hypokalemia has a major effect on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. *In vivo* study showed that hypokalemia causes downregulation in the number of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ pumps in rat muscle. The relative abundance of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ α_2 isoforms in hind limb muscles following 1-4 weeks on a low- K^+ diet showed a progressive decrease and disappeared after 3 weeks. Therefore, the study by Dorup *et al.* showing downregulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ after aldosterone infusion may not be due to the direct effect of aldosterone, but rather due to hypokalemia. To clarify this issue, all patients in our study were corrected for hypokalemia before muscle biopsy. This rules out the effect of hypokalemia on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity.

Previous studies in the mouse mammary tumor viral promoter have shown that aldosterone regulates gene expression via its binding to, and activation of, a specific intracellular mineralocorticoid hormone receptor (MR). In the absence of ligand, MR is located primarily in the cytoplasm and associated with chaperone protein. Upon hormone binding, the MR dissociates from chaperone proteins, undergoes nuclear translocation and interacts with numerous molecular partners in a coordinated and sequential manner to ensure appropriate transcriptional regulation. In kidney cell culture, aldosterone affects $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ α and β subunits at the transcriptional, translational and transport levels. In addition, spironolactone, an aldosterone antagonist, decreases

basal α and β subunits of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ mRNA levels, and hence decreases the relative rate of protein biosynthesis. It also blocks cell response to aldosterone in cultured kidney cells. Ikeda *et al.* have demonstrated that aldosterone directly stimulates $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ α_1 and β_1 subunit mRNA synthesis and protein accumulation in adult and neonatal rat ventricular cardiocytes grown in defined serum-free media. Several lines of evidence have suggested that MR mediates the action of aldosterone and that it is expressed primarily in epithelial cells such as distal convoluted tubules and collecting tubules. In addition, MR expression has been detected in non-epithelial tissues including cardiomyocyte and vascular smooth muscle cells. Until now, it was still unclear whether skeletal muscle cells expressed MR. From this point of view, the increase in $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ expression observed in this study might possibly be due to the direct effect of aldosterone on MR resulting in increased biosynthesis of α_2 and β_1 subunits of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in skeletal muscle cells. Alternatively, this observation might be a secondary response to changes in sodium and/or potassium status in the intracellular compartment mediated by aldosterone.

In Conn's syndrome patients, total body potassium is likely to be significantly decreased. Unfortunately, due to limitations of study in human, it could not be measured in our study. We are aware that potassium replacement before adrenalectomy may not have completely corrected total body potassium levels, despite the observed normal serum potassium levels. Moreover, the sodium retention associated with hyperaldosteronism, which may not be ameliorated by anti-hypertensive agents, could increase the intracellular sodium level. Thus, the decreased intracellular potassium and increased intracellular sodium could account in part for the stimulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in skeletal muscle cells observed in our study. Subsequently, after adrenalectomy which corrected the high level of aldosterone, the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in the skeletal muscle cells was reduced to normal levels. Our observation has a clinical implication for hyperaldosterone patients, especially those who cannot undergo surgery, that have increased activity of skeletal muscle $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. They should receive drugs that block the action of aldosterone and/or $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ to prevent them from developing hypokalemia which partly might be due to potassium uptake into the muscle cells. Equally important, to maintain the equilibrium of total body potassium, adequate potassium intake in spite of normokalemia should be recommended.

In summary, our study has provided the first evidence that increased plasma aldosterone leads to increased $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in human skeletal muscles,

possibly due to upregulation of mRNA and protein levels of the α_2 and β_1 (and not α_1 , α_3 , β_2 , and β_3) subunits. Further studies on the detailed mechanisms by which aldosterone activates human skeletal muscle $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity under normal physiological and pathological conditions are necessary in order to clarify the clinical implications of this hormone.

Acknowledgements

Our grateful appreciation is extended to all patients who participated in this study. We gratefully acknowledge Prof. Michael J. McKenna, Centre for Ageing, Rehabilitation, Exercise and Sport, Victoria University for his invaluable advice on techniques of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ measurement in human skeletal muscle cells. We also thank Prof. Prapon Wilairat, Department of Biochemistry, Mahidol University and Mrs. Kristen K. Evans, Department of Physiology, College of Medicine, University of Arizona for their valuable comments and corrections of this manuscript. This work was supported by The Thailand Research Fund and Mahidol University Grant.

บทวิจารณ์เพิ่มเติม

ปัจจุบันคณะผู้วิจัยยังได้เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรค TPP ซึ่งมี hypokalemia periodic paralysis ยังอยู่ในระหว่างการศึกษา แต่เนื่องจากเงินทุนและเวลาไม่เพียงพอที่จะใช้ในการศึกษา คณะผู้วิจัยจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้รับการสนับสนุนในการขอทุนวิจัยในครั้งต่อไป เพื่อคณะผู้วิจัยจะได้มีโอกาสศึกษาโรคต่างๆดังกล่าวได้ละเอียดลึกซึ้งขึ้น และนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานการแพทย์ เป็นชื่อเสียงของประเทศ และนำไปสู่การคิดค้นยา หรือวิทยาการใหม่ในการรักษาหรือป้องกันโรคซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วยในที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. **Phakdeekitcharoen B**, Ruangraksa C, Radinahamed P. Hypokalemia and paralysis in the Thai population. *Nephrol Dial Transplant* 19:2013-8, 2004
2. **Phakdeekitcharoen B**, Phudhichareonrat S, Pookarnjanamorakot C, Kijkunasathian C, Tubtong N, Kittikanokrat W, Radinahamed P. Thyroid hormone increases mRNA and protein expression of Na⁺ - K⁺ - ATPase α_2 - and β_1 - subunits in human skeletal muscles. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 353-358
3. McFadzean AJS, Yeung R. Periodic paralysis complicating thyrotoxicosis in Chinese. *Br Med J* 1:451-455, 1967
4. Ko Ko GTC, Chow CC, Yeung VTF, Chan HHL, Li JKY, Cockram CS. Thyrotoxic periodic paralysis in a Chinese population. *Q J Med* 89:463-468, 1996
5. Dias da Silva MR, Cerutti JM, Tengan CH, Furuzawa GK, Vieira TC, Gabbai AA, Maciel RM. Mutations linked to familial hypokalaemic periodic paralysis in the calcium channel alpha1 subunit gene (Cav1.1) are not associated with thyrotoxic hypokalaemic periodic paralysis. *Clin Endocrinol* 56:367-375, 2002
6. Azuma KK, Hensley BC, Tang MJ, McDonough AA. Thyroid hormone specifically regulates skeletal muscle Na-K-ATPase α_2 - and β_2 -isoforms. *Am J Physiol* 265: 880-887, 1993
7. Asano Y, Liberman UA, Edelman IS. Thyroid thermogenesis. Relationships between Na⁺-dependent respiration and Na⁺ + K⁺ - adenosine triphosphatase activity in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 57:368-379, 1976
8. Biron RA, Burger A, Chinet A, Clausen T, Dubois-Ferriere R. Thyroid hormones and the energetics of active sodium-potassium transport in mammalian skeletal muscle. *J Physiol Lond* 297: 47-60, 1979
9. Kjeldsen K, Everts ME, Clausen T. The effects of thyroid hormones on ³H-ouabain binding site concentration, Na,K-contents and ⁸⁶Rb-efflux in rat skeletal muscle. *Pfluegers Arch* 406: 529-535, 1986
10. Lin MH, Akera T. Increased (Na⁺ - K⁺)-ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatments. *J Biol Chem* 253: 723-726, 1978
11. Sweadner KJ, Goldin SM. Active transport of sodium and potassium ions. *N Eng J Med* 302:777-83, 1980
12. Vasilets LA, Schwarz W. The Na/K pump: structure and function of the alpha-subunit. *Cellular physiology and Biochemistry* 4: 81-95, 1994

13. Schmalzing G, Gloor S. Na/K-pump beta subunit: structure and function. *Cellular physiology and Biochemistry* 4: 96-114, 1994
14. Mc Donough AA, Schmitt C. Comparison of subunits of cardiac, brain, and kidney Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol* 248 (cell physio 17): C247-C251, 1985
15. Hundal HS, Maxwell DL, Ahmed A, Darakhshan F, Mitsumoto Y, Klip A: Subcellular distribution and immunocytochemical localization of An, K-ATPase subunit isoforms in human skeletal muscle. *Mol Mem Biol* 11: 255-262, 1994
16. Juel C, Nielsen JJ, Bangsbo J. Exercise-induced translocation of Na-K pump subunits to the plasma membrane in human skeletal muscle *Am J Physiol* 278: 1107-1110, 2000
17. Hundal HS, Marette A, Mitsumoto Y, Ramla T, Blostein R, Klip A. Insulin induces translocation of the α_2 and β_2 subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 267: 5040-5043, 1992
18. Lavoie L, Roy D, Ramlal T, Dombrowski L, Martin-Vasallo P, Marette A, Carpentier J, Klip A. Insulin-induced translocation of Na⁺-K⁺-ATPase subunits to the plasma membrane is muscle fiber type specific *Am J Physiol* 270 (cell physio 39): C1421-C1429, 1996
19. Kjeldsen K, Gottsche CO, Norgaard A, Thomassen A, Clausen T. Effect of thyroid function on number of Na-K pumps in human skeletal muscle. *Lancet* 2: 8-10, 1984.
20. Azuma KK, Hensley BC, Putnam DS, McDonough AA. Hypokalemia decreases Na⁺ - K⁺ - ATPase α_2 - but not α_1 -isoform abundance in heart, muscle, and brain. *Am J Physiol* 260(cell physio 29): C958-C964, 1991

Figure legends

Figure 1 (A): Plasma aldosterone level in Conn's syndrome patients and control subjects. Data are mean \pm SD (bar); n = 6 for Conn's syndrome patients, n = 10 for control subjects. Pre, pre-surgery; Post, post-surgery; Con, control. * $P < 0.05$ compared with post-surgery group, # $P < 0.05$ compared with control group.

(B): $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase activity in the skeletal muscle of individual Conn's syndrome patients and control subjects. All symbols joined by lines indicate individual responses, while near-by symbols indicate group average as mean \pm SD. Each symbol represents each patient, \triangle = control subject

Figure 2: Correlation between skeletal muscle $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase activity (A), α_2 isoform mRNA (B) and β_1 isoform mRNA level (C) with plasma aldosterone level in pre-surgery (N = 6), post-surgery patients (N = 6), and control subjects (N = 10), Correlation was determined by linear regression (r value).

- = pre-surgery Conn's syndrome patient
- = post-surgery Conn's syndrome patient
- ▲ = control subject

Figure 3: Relative mRNA level of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 , and β_3 isoforms in skeletal muscles of pre- and post-surgery patients and control subjects. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase isoform mRNA level is expressed relative to that of GAPDH, and the control level was set as 1 for comparison purposes. The value is shown as mean \pm SE (bars). Pre, pre-surgery N = 6; Post, post-surgery N = 6; Con, control N = 10. * $P < 0.05$ compared with post-surgery patients, # $P < 0.05$ compared with controls.

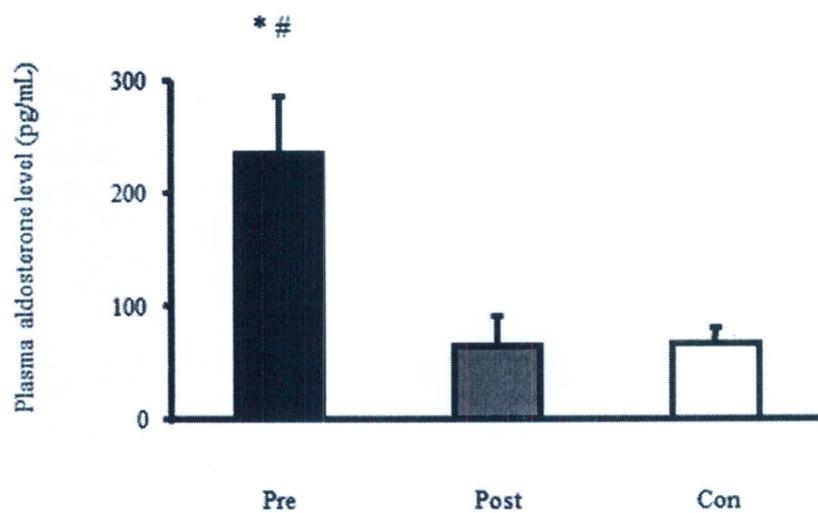
Figure 4: Immunoblot of skeletal muscle $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPase α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 , and β_3 isoforms of pre- and post-surgery patients and control subjects. Protein level is expressed relative to that of \square actin as mean \pm SE (bar). Arrow indicates molecular weight of the protein. The number indicates individual patient. Pre, pre-surgery N = 6; Post, post-surgery N = 6; Con, control N = 10. * $P < 0.05$ compared with post-surgery group, # $P < 0.05$ compared with control group.

Table 1: Clinical features of the first presentation and comparison among pre- and post-adrenalectomies of 6 Conn's syndrome patients and 10 controls

Patients' characteristic	Conn's syndrome			P-value	Control	P-value	
	First presentation	Pre-surgery	Post-surgery	Pre. versus Post.		Pre. versus Con.	Post. versus Con.
Age (year)		41.8 ± 7.8			40.9 ± 7.0	0.93	
Weight (Kg)		60.8 ± 5.2			59.8 ± 6.7	0.74	
Body mass index (Kg/m ²)		23.4 ± 0.5			23.2 ± 0.7	0.39	
Systolic blood pressure (mmHg)	184.1 ± 10.7	131.3 ± 5.5	131.2 ± 6.1	0.92	128.0 ± 4.5	0.24	0.3
Diastolic blood pressure (mmHg)	108.8 ± 6.6	78.7 ± 2.9	78.2 ± 3.9	0.72	75.0 ± 4.5	0.07	0.16
Serum sodium (mEq/L)	138.5 ± 3.0	139.5 ± 2.8	138.8 ± 1.7	0.46	139.0 ± 2.7	0.74	0.88
Serum potassium (mEq/L)	2.8 ± 0.29	3.95 ± 0.18	4.02 ± 0.13	0.34	4.04 ± 0.32	0.48	0.88
Serum chloride (mEq/L)	100.0 ± 2.3	105.8 ± 2.6	105.7 ± 3.6	0.86	106.8 ± 2.2	0.47	0.5
Serum bicarbonate (mEq/L)	32.2 ± 3.5	25.3 ± 1.4	24.0 ± 2.8	0.14	24.1 ± 2.5	0.22	0.94
Total potassium intake (mEq/day)		75.5 ± 12.7	69.3 ± 9.8	0.2	69.8 ± 10.5	0.38	0.93
Total sodium intake (mEq/day)		94.3 ± 9.8	98.2 ± 10.6	0.28	99.0 ± 11.1	0.4	0.88
24-hr urine potassium (mEq/day)	65.2 ± 17.8	62.8 ± 12.2	55.7 ± 11.6	0.14	57.2 ± 11.9	0.39	0.8
24-hr urine sodium (mEq/day)	138.7 ± 19.3	83.2 ± 13.2	86.7 ± 13.6	0.4	89.0 ± 14.1	0.42	0.75
Plasma aldosterone level (N 10 – 160 pg/mL)		235.0 ± 51.1	64.5 ± 25.1	< 0.01	66.5 ± 13.0	< 0.01	0.86
Plasma renin activity (N 0.2 – 2.8 ng/mL/h)		0.17 ± 0.06					
Antihypertensive agents	Nifedipine (mg/day)	18.3 ± 7.6 (range 10 – 30)					
	Hydralazine (mg/day)	33.3 ± 30.3 (range 0 – 75)					

Notes. Pre. = pre-surgery, Post. = post-surgery, Con. = control, N = normal

A



B

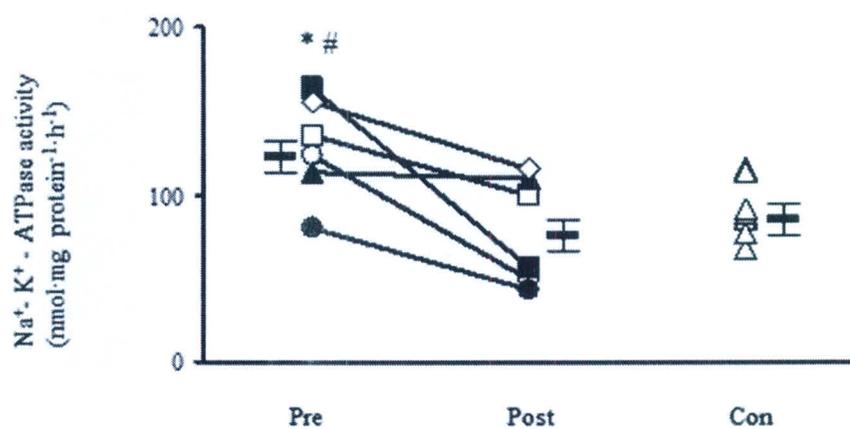
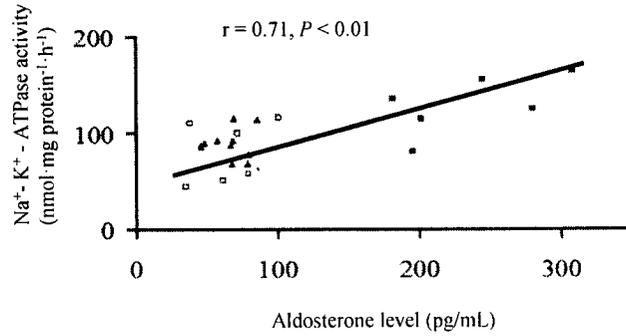
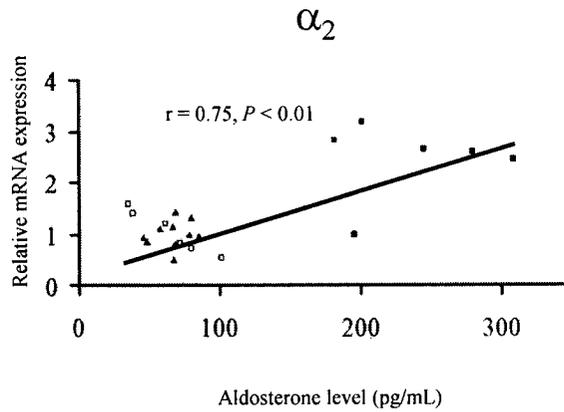


Figure 1: (A) Plasma aldosterone level in Conn's syndrome patients and control subjects (B) Na⁺ - K⁺ - ATPase activity in skeletal muscle of individual Conn's syndrome patients and control subjects; pre-surgery (Pre), post-surgery (Post) and control subjects (Con)

A



B



C

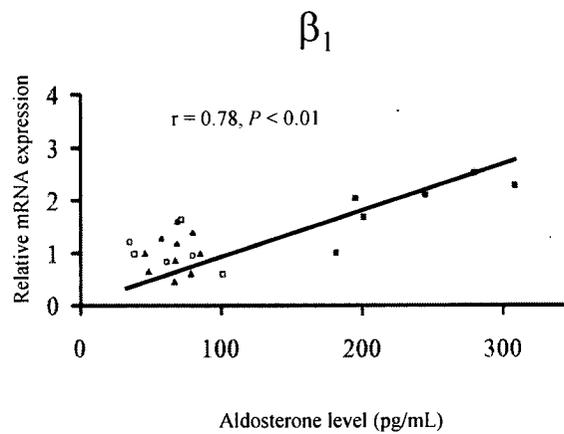


Figure 2: Correlation between Na⁺-K⁺-ATPase activity (A), α_2 isoform mRNA (B) and β_1 isoform mRNA level (C) with plasma aldosterone level in pre-surgery (N = 6), post-surgery patients (N = 6) and control subjects (N = 10)

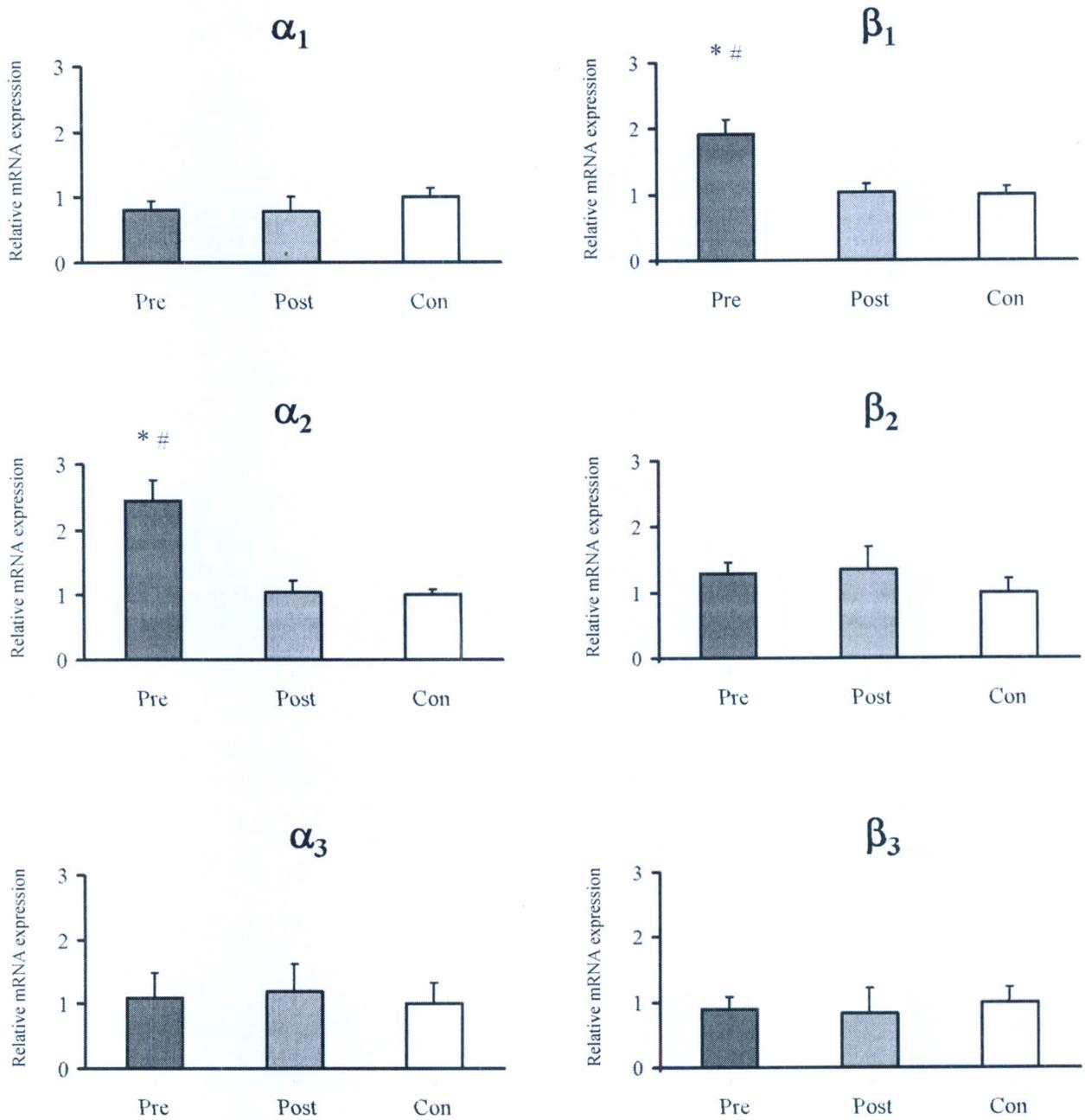
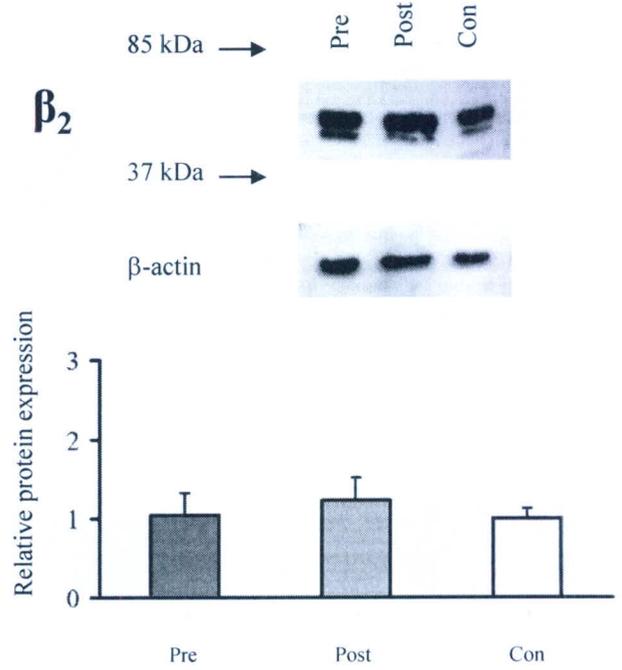
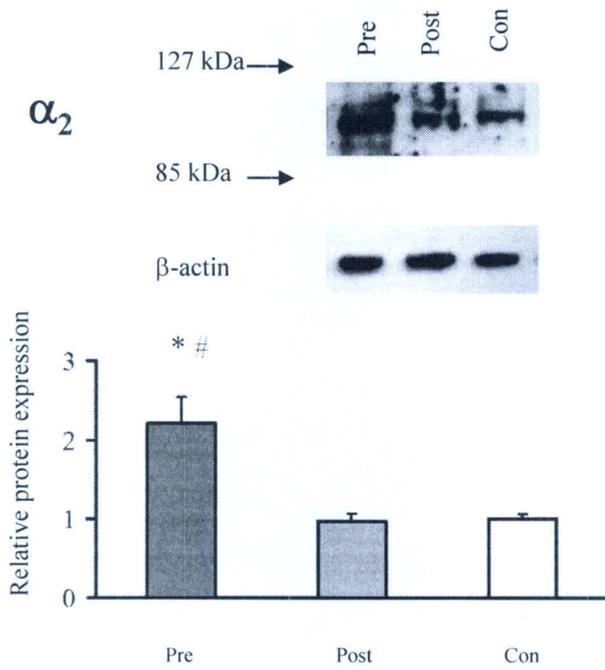
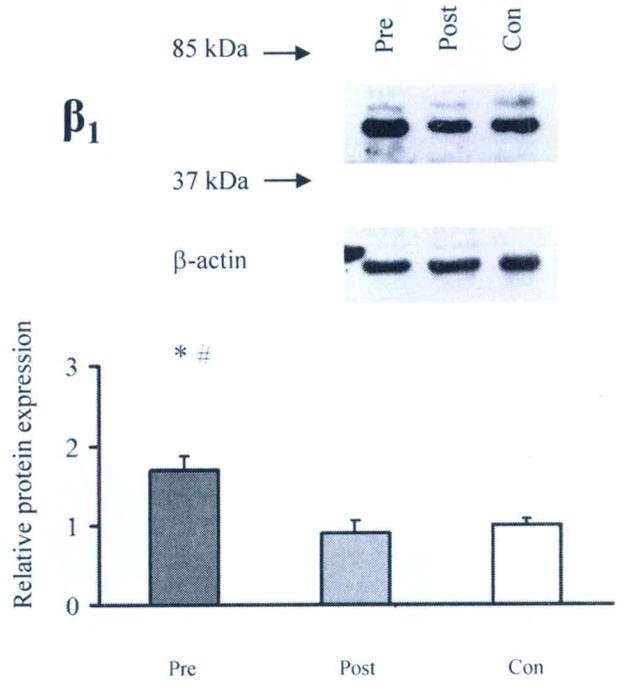
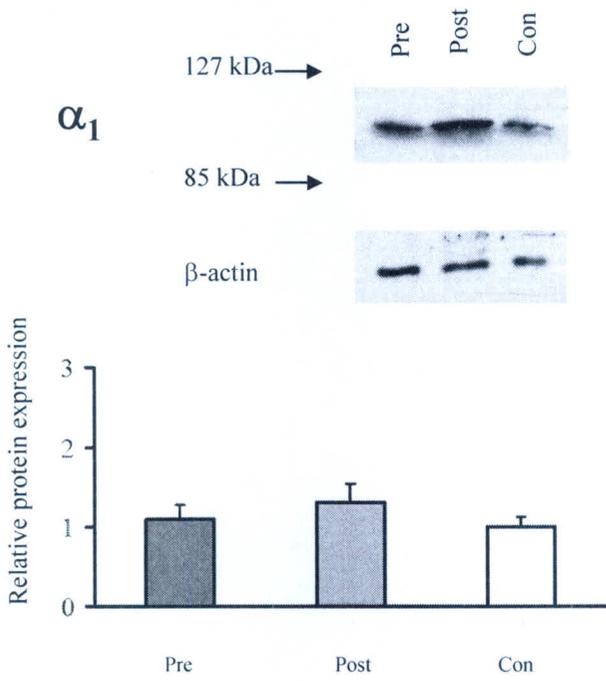


Figure 3: Relative mRNA level of the Na⁺- K⁺ - ATPase α₁, α₂, α₃, β₁, β₂, and β₃ isoforms in skeletal muscles of pre-surgery, post-surgery patients and control subjects



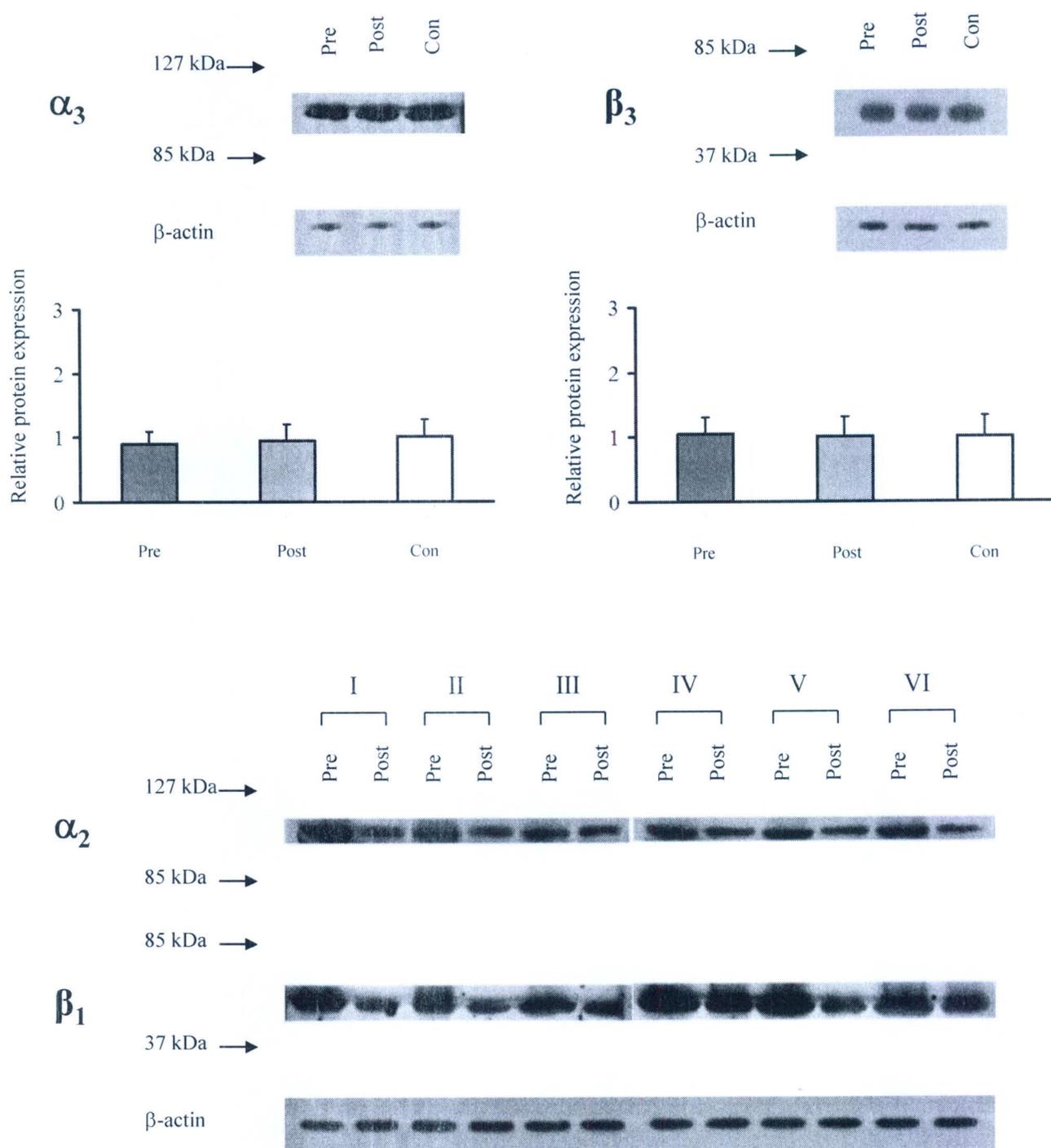


Figure 4: Immunoblot of skeletal muscle Na⁺- K⁺ -ATPase α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 , and β_3 isoforms of pre-surgery, post-surgery patients and control subjects

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Phakdeekitcharoen B, Kittikanokrat W, Kijkunasathian C, Chatsudthipong V. Aldosterone increases Na⁺ -K⁺ -ATPase activity in skeletal muscle of patients with Conn's syndrome. Clin Endocrinol (Oxf) 2011; 74:152-9.
2. Phakdeekitcharoen B, Kreepala C, Liratpong S. Urine indices to determine the cause of hypokalemia during treatment.
(in press)

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ

1. โครงการนี้จะก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานการแพทย์ของโรคกลุ่มกล้ามเนื้อผิดปกติ ซึ่งเป็นกลุ่มโรคที่มีความชุกสูงในประเทศไทย การศึกษาโรคในกลุ่มดังกล่าวจะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ ซึ่งจะเป็นชิ้นส่วนของภาพเล็กๆที่จะประกอบเป็นภาพใหญ่ที่จะนำไปสู่ความเข้าใจใน muscle physiology ในระดับ molecular level ซึ่งจะนำไปสู่การคิดค้นยาหรือวิธีการต่าง ๆ ที่จะนำไปสู่การรักษาหรือป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มโรคดังกล่าวหรือโรคอื่น ๆ ที่สัมพันธ์กันที่มีพื้นฐานทางด้าน muscle physiology เดียวกัน
2. ตอบสนองนโยบายมหาวิทยาลัยเพื่อให้เกิดผลงานวิจัยในระดับสากลเพื่อองค์ความรู้ใหม่ ๆ และการประยุกต์ใช้ ทำให้ประเทศไทยสามารถที่จะแข่งขันทางด้านวิจัยกับต่างประเทศได้ภายใต้ข้อจำกัดต่าง ๆ ทางด้านกำลังคน ทุนวิจัยและเทคโนโลยี การศึกษาโรคดังกล่าวในบ้านเราจะทำให้เกิดความได้เปรียบทั้งทางการศึกษาทางคลินิกและการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน
3. นำเอาความรู้ที่ได้ไปใช้ในการวินิจฉัยดูแลรักษาผู้ป่วยโรคนี้ การศึกษาโรคดังกล่าวมีความสำคัญเพราะเป็นปัญหาของผู้ป่วยในประเทศไทยโดยตรง ซึ่งยังไม่เคยมีใครศึกษาโรคนี้ในแง่มุมนี้มาก่อน การศึกษาดังกล่าวจะนำมาสู่ประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและดูแลผู้ป่วยโรคกลุ่มนี้ในที่สุด

4. นำความรู้ต่างๆ ที่ได้มาพัฒนาเพื่อการเรียนการสอนแก่แพทย์รุ่นหลัง ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ทางด้านการแพทย์เพื่อถ่ายทอดแก่แพทย์รุ่นหลังและเป็นประโยชน์ต่อการดูแลผู้ป่วยโรคกลุ่มนี้ในที่สุด
5. พัฒนาเทคนิคการตรวจเพื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทาง clinic ในที่สุด สามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจดังกล่าวมาวินิจฉัยแยกโรคในกรณีที่มีปัญหาจากการวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงจากโปรแตสเชื่อมทำได้