

사립체 호흡연쇄효소 결핍 질환의 생화학적 진단과 형태학적 진단

김 성 환

아주대학교 의과대학 소아과학교실, 유전성 사립체 질환 연구소

서 론

사립체는 호흡 사슬에서 산화 인산화 과정을 통해서 인간의 모든 조직과 장기에 에너지를 공급하는 세포내 소체로 사립체 기능 장애는 태아에서 성인에 이르기 까지 적혈구를 제외한 인간의 모든 장기에 다양한 질병을 초래한다. 사립체 질환은 임상증상에 의거한 진단, 모든 장기에 대한 생리적 기능 평가와 형태학적 검사 결과, 대사 선별 검사 결과를 토대로 사립체 질환이 의심되는 환자에서 사립체 호흡연쇄 효소 활성화도 검사, 근육조직의 형태학적 검사와 분자 유전학적 검사로 확진이 이루어진다. 사립체 질환의 진단에 이르는 시발점으로서 임상증상은 단일 장기에 국한되어서 나타나는 경우부터 모든 장기에 다양한 형태의 질병을 초래하는 다기관 기능 장애까지 대단히 다양하기 때문에 임상적 추정 진단이 힘들고, 어떤 경우에서 확진에 필요한 비싸고 침습적인 특수 검사를 시행하여야 하는지에 대한 단서를 제공하는데 어려움이 많다.

사립체 질환의 합리적인 진단적 접근을 위해서 사립체 질환이 의심되는 환자의 임상증상을 세

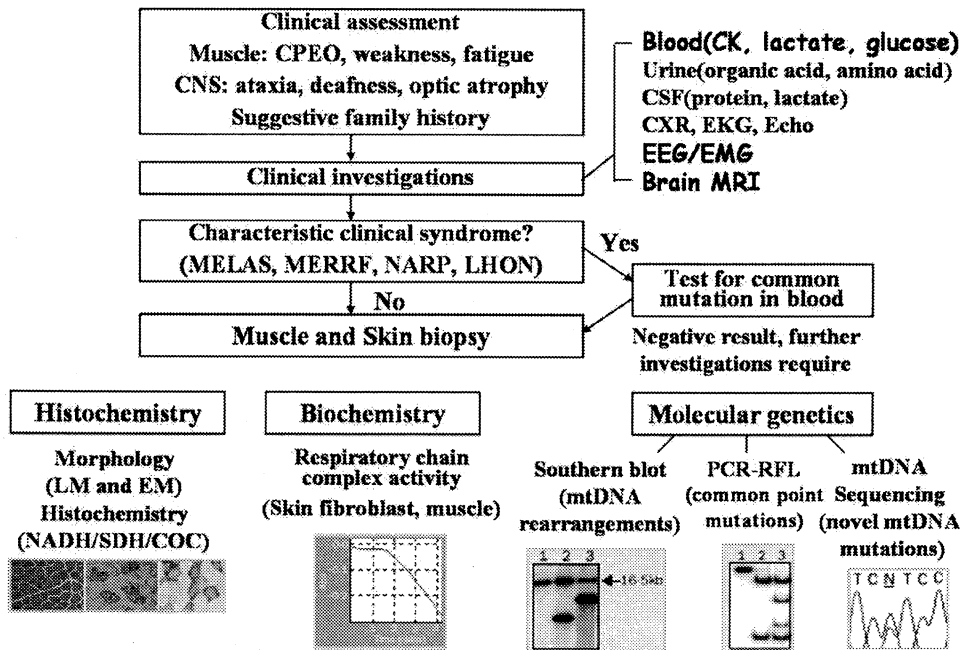
가지 유형으로 분류할 필요가 있다¹⁾. 첫 번째 범주가 mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS), Kearns-Sayre syndrome(KSS), myoclonic epilepsy with ragged red fiber(MERRF), neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa(NARP), Leber hereditary optic neuropathy(LHON), Leigh 증후군, chronic progressive external ophthalmoplegia(CPEO)와 같이 항상 특징적인 증상이 나타나는 질환들은 임상적 추정 진단에 어려움이 없기 때문에 확진을 위해서 다른 검사를 할 필요 없이 바로 mtDNA 유전자 검사를 시행한다. 두 번째 범주는 임상증상이 위와 같은 증후군으로 규정할 수 있을 만큼 특징적이지는 않지만 여러 가지 임상증상을 종합해보면 사립체 질환의 가능성을 의심할 수 있는 유형이다. 개별 임상증상으로는 사립체 질환의 가능성을 추정하기 힘들지만 근병증이나 중추신경계 증상과 같이 동반되는 경우가 이에 해당한다. 저신장, 편두통, 감각신경성 난청, 당뇨, 비대 심장근육병증, 눈근육마비와 콩팥노세관산증 같은 증상이 이에 속하는 대표적인 red

flag symptom이다²⁾. 세 번째 범주는 청소년과 젊은 성인에서 발생한 뇌혈관 질환 같이 원인을 설명할 수 없는 신경계 증상이 단독으로 나타나거나, 사립체 질환으로 의심할 수 없는 한 가지 이상의 전신 증상이 나타나는 유형이다. 당뇨와 부갑상선 기능 저하증 같은 내분비 질환, 위장관 운동질환, 콩팥노세관산증과 비대 심장근육병증 같은 증상이 대표적인 전신 증상이다.

앞서 언급한 두 가지 유형의 임상증상을 나타내는 환자들에서 사립체 질환에 대한 특수 검사를 시행하여야 할지 결정하기가 대단히 힘들다. 이런 경우는 먼저 다른 질환의 가능성이 있는지를 철저히 배제한 후에 사립체 질환의 합리적 진단적 접근을 (Fig. 1) 하여야 한다. 먼저 대사 선별 검사를 시행하고 이상이 있으면 확진을 위해서 근육과 피부 조직 생검을 하여 사립체 호흡연쇄효

소 활성도와 형태학적 검사를 시행한다. 대사 선별 검사에 이상은 없지만 여전히 사립체 질환의 가능성을 배제할 수 없는 경우는 뇌 MRI 검사, 뇌파검사, 심초음파 검사 등 사립체 질환에서 침범될 수 있는 모든 장기의 체계적인 검사를 시행하고 이상이 발견되면 확진을 위해서 근육조직과 피부 섬유아세포에서 사립체 호흡연쇄효소 활성도와 형태학적 검사를 시행한다. 그러나 사립체 질환의 체계적인 진단적 접근에도 불구하고 모든 검사의 민감도와 특이도가 높지 않기 때문에 여러 검사 결과를 통합하여 점수화하는 modified Walker criteria, Nijmegen criteria, Nonaka criteria와 Wolfson criteria 같은 포괄적인 임상 진단 기준이 임상에서 주로 사용 된다³⁾. 저자는 이 중 사립체 진단에 사용되는 대사 선별 검사, 사립체 호흡효소 활성도 검사와 형태학적 진단법

Figure 1. Investigations in Suspected Mitochondrial DNA Disease



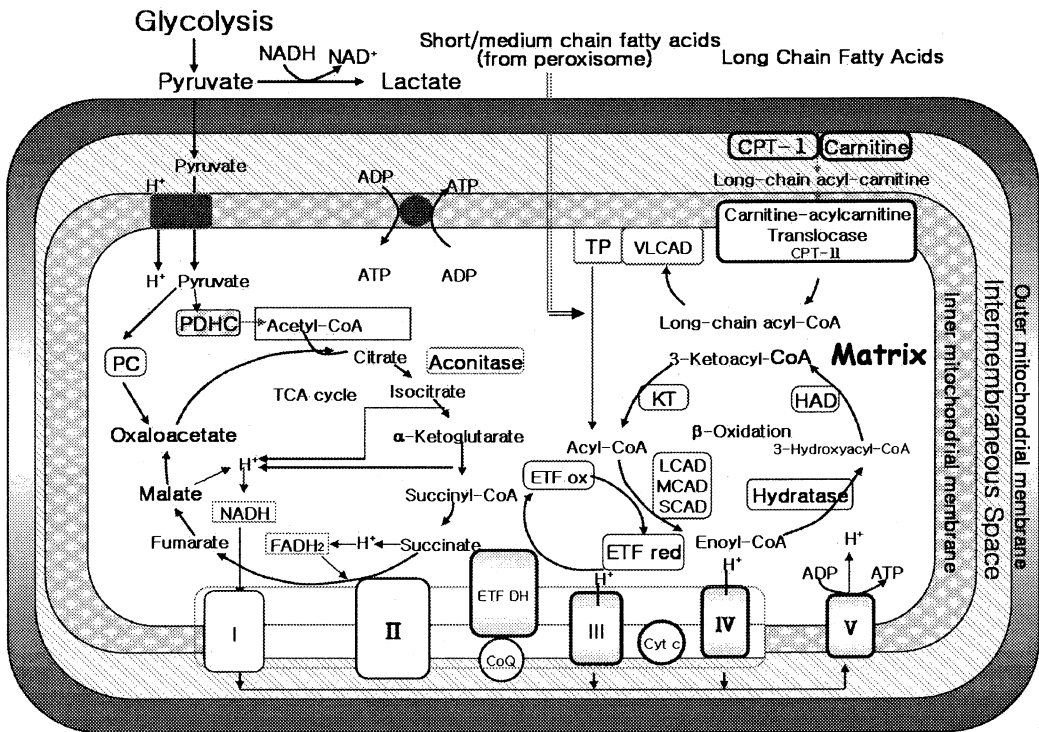
에 대해서 기술하고자 한다.

Biochemical Role and Metabolic Derangement of Mitochondria

사립체는 모든 조직에 존재하는 세포내 소체로 pyruvic acid와 지방산 같이 에너지 생성에 필요한 기질이 유입되어 여러 대사과정을 거쳐서 세포가 생존하고 고유의 기능을 수행하는데 필요한 에너지를 만들어 내는 중요한 역할을 한다⁴⁾. pyruvic acid는 pyruvate dehydrogenase (PDH)와 pyruvate carboxylase (PC)에 의해서 대사되어 삼카복실산 회로 (tricarboxylic acid cycle: 이하 TCA 회로로 기술)를 거쳐서 생성된

NADH와 FADH₂가, 지방산은 β-oxidation 과정을 거쳐 생성된 FADH₂가 사립체 호흡 사슬 (mitochondrial respiratory chain)로 들어간다. 사립체 호흡사슬은 4개의 호흡연쇄효소 복합체로 구성된 전자전달계와 5번 효소 복합체를 통한 산화 인산화 과정 (oxidative phosphorylation)으로 구성되어 있다 (Fig. 2). NADH는 1번 효소 복합체, succinate에서 생성된 FADH₂는 2번 효소 복합체, 지방산 산화로 생성된 FADH₂는 3번 효소복합체를 통해 양자를 사립체 내막과 외막 사이의 막간으로 배출하면서 전자를 전자전달계로 전달하고 산화되어서 물을 생성하고 막간으로 배출된 양자는 다시 사립체 기질로 들어오면서 5번 효소복합체를 통해

Figure 2. Schematic Representation of Mitochondrial Metabolism



에너지를 방출하면서 ATP를 생성 한다^{2,4-6)}. 한 분자의 NADH가 산화되면서 세 개의 ATP가 생성된다. 따라서 사립체 질환은 호흡사슬 기능 장애, pyruvic acid 대사 장애, TCA 회로 장애, 지방산 대사 장애 등 사립체에서 에너지 생성에 관련되는 모든 대사 질환을 포함할 수 있으나, 일반적으로 최종 공통 대사 과정인 호흡사슬 기능 장애를 초래하는 유전성 질환으로 국한하고 있다.

유전성 호흡사슬 기능 장애로 산화 인산화 과정에 문제가 생기면 다음과 같은 생화학적인 변화들이 초래될 수 있다; 1) 사립체와 세포질에 reducing equivalent가 축적되어서 NADH/NAD⁺ 비율이 증가되고, 2) 젖산 탈수소 효소 (lactate dehydrogenase)에 의해서 pyruvic acid가 젖산으로 대사되어서 혈액에 젖산 농도가 증가하고, 3) 사립체에서 ATP 생산이 감소하고, 4) 산소의 단가 환원 (monovalent reduction of oxygen) 이 증가되어서 과산화물의 생성이 증가하고, 5) 사립체에서 TCA 회로와 지방산 β-oxidation 대사과정에 장애를 초래하여 TCA 회로의 중간 대사물질인 3-methyl-glutaconic acid와 alpha- ketoglutaric acid 가 소변으로 배출 된다⁴⁻⁶⁾. 그러나 유전성 호흡사슬 기능 장애를 제외한 다른 사립체 질환들에서도 pyruvic acid와 젖산 대사에 장애를 초래하여 혈액에 젖산 농도가 증가 한다⁷⁾ (Tab. 1). 또한 TCA 회로 대사 장애도 소변으로 citric acid, fumaric acid, alpha- ketoglutaric acid 같은 유기산 배출이 증가하고, 지방산 β-oxidation 대사 장애는 혈액에 케톤체의 생성이 감소하면서 소변에 dicarboxylic acid가 증가하고, 지방산을 사립체 안으로 운반하는 물질인 carnitine 결핍에서도 유사한 생화학적 변화를 보

일 수 있다⁴⁾. 따라서 사립체 연쇄효소 결핍 질환의 유무를 선별 진단하고 앞서 기술한 다른 사립체 대사질환들과 감별 진단하기 위해서 사립체 에너지 대사에 대한 생화학적 지식에 대한 충분한 이해가 필수적이다.

사립체 질환의 대사 선별 검사 (Tab. 1)

Table 1. Metabolic Screening for Respiratory Chain Disorders

Standard screening tests (at least 4 determinations daily in fasted and 1 hour fed individuals)
1. Plasma lactate
2. L/P molar ratio : redox status in cytoplasm
3. Ketonaemia (paradoxical elevation in fed individuals)
4. β-OH butyrate/acetoacetate molar ratio : redox status in mitochondria
5. Blood glucose and free fatty acids
6. Urinary organic acids : lactate, ketone bodies, citrate cycle intermediates
Provocative tests (when standard tests are inconclusive)
1. Glucose loading test (2 g/kg, IV)
2. L/P molar ratios in the CSF
3. Redox status in plasma following exercise

1. 표준 선별 검사 : Standard screening tests

혈장에서 젖산, pyruvate, 케톤체, 사립체와 세포질의 산화환원 상태를 시사하는 케톤체 molar ratio (3-hydroxybutyrate/acetoacetate: B/A ratio)와 lactate/pyruvate molar ratio (L/P ratio), 혈당 및 소변 유기산 분석 검사가 사립체 호흡연쇄효소 결핍을 선별하기 위해서 통상적으로 시행 된다⁴⁻⁶⁾. 혈액에서 젖산 농도를 측정할 때 검사상 오류를 피하기 위해서 미리 헤파린으로 처리된 도관을 혈관에 삽입한 후 환자가 울거나 몸부림치지 않고 휴식을 취하는 상태에서 동맥혈을 채취하여야 한다. 검체는 perchloric acid를 넣고 얼음에 채워서 검사실로 보내 즉시 검사하여야 한다. 바로 검사할 수 없을 때는 검체를 영하 20°C 이하로 냉동 보관하여야만 검사상 오류를 피할 수 있다. 혈액

젖산 농도는 음식물 섭취로 인한 변화를 배제하고, 간헐적인 고젖산혈증도 찾아내기 위해서 식전과 식후 1시간 paired sample을 하루에 적어도 네 번 이상 측정하여야 한다. 또한 젖산 농도에 영향을 미칠 수 있는 대사 변화를 배제하기 위해서 혈당 및 혈액 지방산 검사가 동시에 시행되어야 한다. 지속적으로 혈액 유산 농도가 2.5 mM/L 이상 증가하는 경우 사립체 호흡연쇄효소 결핍증을 강력히 의심할 수 있다. Triepels 등⁸⁾은 1번 효소 복합체가 결핍된 환자의 혈액과 뇌척수액에서 젖산의 증가를 볼 수 없었다고 보고하였다. 여러 연구자들⁹⁻¹¹⁾에 의하면 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 있는 환자들의 약 15-40%에서 혈액 젖산 농도가 정상으로 민감도가 높지 않아서 혈액 젖산 농도가 정상이라도 사립체 질환을 배제할 수 없다고 보고하였다. 또한 고젖산혈증이 사립체 호흡연쇄효소 결핍을 시사하는 대표적인 검사소견이나 특이적이지 않기 때문에 선천성 젖산혈증을 초래하는 다른 대사질환들과 감별이 필요하다 (Tab. 2). 이를 위해서 혈액 젖산 농도 검사와 더불어 L/P ratio와 케톤체 molar ratio 특히 식후에 측정한 수치가 감별

진단에 도움이 된다. 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 생기면 TCA 회로 대사 장애가 동반되기 때문에 음식물 섭취 후 pyruvate로부터 생성된 acetyl CoA가 대부분 케톤체 형성에 사용되어서 식후에 채취한 혈액에서 케톤체 (paradoxical hyperketonemia)와 B/A ratio가 증가하는 특성이 있다. 따라서 지속적으로 젖산 농도가 증가하고 L/P ratio가 20 이상, 식후 B/A ratio가 2 이상 증가하면 사립체 호흡연쇄효소 결핍 질환을 강력히 시사하고, 젖산 농도는 증가하나 L/P ratio가 정상이거나 10 이하로 감소하고 식후 케톤혈증이 없으면 PDH 결핍을, 젖산 농도가 지속적으로 증가하고 L/P ratio가 30이상 증가하나 B/A ratio가 정상이거나 1이하로 감소하는 경우는 PC 결핍이나 TCA 회로 대사 장애를 의심하여야한다⁴⁻⁶⁾. 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 있는 환자의 유기산 분석 검사에서 소변에 3-methyl-glutaconic acid 또는 alpha-ketoglutaric acid 같은 TCA 회로 중간 대사물질의 배출 증가를 흔히 볼 수 있기 때문에 소변 유기산 분석 검사는 선별 검사로서 의미는 있을 수 있으나 사립체 진단에 특이적인 검사라고 할 수는 없다. 또한 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 있는 환자의 혈액 아미노산 분석 검사에서 혈액에 alanine, proline, methionine 농도가 증가되는 소견을 볼 수 있다. 그러나 alanine 농도 증가는 고젖산혈증이 있을 수 있다는 간접적인 증거는 되지만 사립체 호흡연쇄효소 결핍의 선별 검사로서 의미는 없다. 사립체에서 ATP 생산이 떨어져서 citrulline 합성 장애가 생기기 때문에 citrulline 농도가 떨어지고 methionine 농도는 증가할 수 있으나, 이는 산화 인산화 장애를 시사하는 비특이적인 소견일 뿐 사립체 질환을 진단할 수 있는 소견은 아니다.

Table 2. Etiology of Congenital Lactic Acidosis

Class I : primary lactic acidosis ; intramitochondrial	
Pyruvate metabolism	Pyruvate dehydrogenase complex deficiency Pyruvate carboxylase deficiency
Krebs cycle	Fumarase deficiency α -ketoglutarate dehydrogenase deficiency
Electron transport chain	Complex I, II, III, IV, and V deficiency
Class II : secondary lactic acidosis	
Glycogen metabolism	Type III glycogen storage disease Glycogen synthase deficiency
Gluconeogenesis	Fructose 1,6 diphosphatase deficiency Glucose 6 phosphatase deficiency
Fatty acid oxidation	Glutaric acidemia type II Carnitine deficiency
Organic acid metabolism	Methylmalonic acidemia Propionic acidemia, Isovaleric acidemia
Class III : unknown	Krabbe disease, Alexander disease, Molybdenum cofactor deficiency, Huntington disease, Friedrich ataxia

2. 유발검사 : Provocative tests

유발 검사는 앞에 기술한 표준화된 대사 선별 검사에서 사립체 질환을 시사하는 소견이 발견되지 않는 경우에만 사용된다. 사립체 질환이 있으나 혈액에서 젖산 농도가 증가하지 않은 일부 환자의 뇌척수액에서 젖산 농도와 L/P ratio의 증가를 볼 수 있다. 이를 중추성 젖산혈증(central lactic acidosis)이라고 명명한다. 그러나 이미 혈액에 산화 환원 상태가 변화된 경우는 다른 정보를 제공하지 못하기 때문에 뇌척수액 젖산 농도 검사는 혈액 검사에서 젖산 농도가 증가되지 않은 경우로 제한하여야 한다.

1) 포도당 부하 검사 : Glucose loading test

사립체 질환이 의심되는 환자에서 밤새 금식하고 혈액을 채취하고 glucose를(용량: 체중 25 kg 이하 2 g/kg, 25 kg 이상은 1 g/kg) 정맥으로 투여하고 15, 30, 60, 90, 120 그리고 180분 후에 혈액을 채취하여서 젖산, pyruvic acid, 케톤체 및 L/P ratio를 측정하여 잠재성 고젖산혈증과 paradoxical hyperketonemia를 찾는데 그 목적이 있다. Touati 등¹²⁾은 사립체 질환이 확인된 28명의 환자 중 지속적인 젖산혈증이 없는 8명의 환자를 대상으로 포도당 부하 검사를 시행하여 이 중 5명의 환자에서 젖산 농도가 증가하는 결과를 보고하면서 사립체 질환의 진단에 유용한 선별 검사로 보고하였다. 그러나 5명의 환자에서 3명은 이미 간헐적인 젖산 농도의 증가를 보인 환자이기 때문에 검사의 유용성을 이야기하기는 불충분하다. 소아 특히 영유아에서 침습적일 수 있는 포도당 부하 검사 대신 하루에 여러 번 식전 식후에 젖산 농도를 검사하는 방법이 대부분의 병원에서 사용된다.

2) 젖산 부하 검사 : Lactate Stress Test

최근 젖산 부하 검사가 사립체 질환이 있는 환자에서 유용한 진단 도구로 사용되고 있다. 젖산 부하 검사는 사립체 호흡사슬 기능 장애가 있는 경우 유산소 운동을 할 때 조직이 혈액으로부터 산소를 뽑아 쓰는 효율이 떨어져 체액에 젖산 농도가 증가하는 원리를 이용한 검사다¹³⁾. 자전거 근육힘기록기(bicycle ergometer) 또는 원력기가 흔히 사용되는 운동 방법이다. Finsterer¹⁴⁾는 사립체 질환으로 확인된 22명의 환자에서 30-W의 운동부하로 15분 동안 자전거 타기를 시키고 운동전, 5분, 10분, 15분 그리고 운동 후 15분 휴식을 취하고 혈액을 채취하여 젖산 농도를 검사하였다. 20명의 정상 대조군에서는 모두 젖산의 증가가 없었으나 18명의 사립체 질환 환자에서 운동 후 젖산 농도가 현저히 증가하는 소견을 보여 민감도 82%, 특이도 86%로 사립체 질환의 선별검사로 유용하게 사용될 수 있다고 보고하였다. 그러나 신부전, 심부전, 당뇨, 간질환 및 당원증 환자에서는 의양성이 생길 수 있다는 점을 유의하여야 하고, 유산소 운동에 협조할 수 없는 영유아와 소아에서는 사용할 수 없다는 제한점이 있다.

3. 대사 선별 검사의 함정 : Pitfalls in Metabolic Screening Tests

선별대사 검사는 사립체 질환의 가능성에 대해서 중요한 정보를 제공할 수 있으나, 사립체 질환에 동반된 대사 장애나 침범된 장기에 따라서 환자의 혈액에서 산화 환원 상태의 변화를 검출하지 못해서 선별 검사의 유용성에 제한적인 경우도 있다. 따라서 선별대사 검사에서 위음성(false negative) 결과를 초래할 수 있는 경우와 그 이유를 알아야 사립체 질환의 오진을 피할

수 있다. 다음과 같은 경우 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 있더라도 대사 선별 검사에서 위음성 결과를 나타낼 수 있다^{5,6)}. 첫째 근위 콩팥노세관 질환이 있는 경우 젖산의 재흡수 장애로 소변에 젖산 배출은 증가하나 혈액 젖산 농도는 감소할 수 있다. 둘째 당노가 동반된 경우 pyruvic acid가 TCA 회로 안으로 유입되지 못해서 산화 환원 상태의 변화가 없을 수 있다. 셋째 사립체 호흡연쇄효소의 tissue specific isoforms의 선택적인 장애로 혈액 산화 환원 상태의 변화가 없는 경우도 있다. 뇌와 근육 같이 산화 대사에 의존도가 높은 장기를 침범하는 경우 산화 환원 상태의 변화가 심하나 Leber hereditary optic neuropathy와 비대 심장근육병증 같은 경우는 산화 환원 상태의 변화가 없을 수 있다. 넷째 모든 조직과 장기에 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 있더라도 사립체 기능장애를 초래하지 않을 정도로 잔존 효소의 활성도가 부분적으로 유지되면 산화 환원 상태의 변화가 없을 수 있다. 다섯째 호흡 사슬에서 결핍된 호흡연쇄효소 복합체의 위치에 따라서 혈액의 산화 환원 상태에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어서 효소 복합체 3번과 4번이 결핍되는 경우 심한 젖산 혈증과 산화 환원 상태의 변화가 초래되지만, 효소 복합체 1번이 결핍된 경우는 NADH의 산화 장애는 생기나 succinate와 지방산의 β -oxidation에서 생긴 FADH₂의 산화는 정상적으로 이루어지기 때문에 젖산 농도의 증가와 산화 환원 상태의 변화가 경하거나 없을 수 있으며, 효소 복합체 2번이 결핍된 경우는 산화 환원 상태의 변화가 없을 수 있다.

선별 대사 검사에서 사립체 질환을 시사하는 소견이 없더라도 위와 같은 이유로 사립체 호흡연쇄효소 결핍을 배제할 수 없기 때문에 임상증

상의 유무와 상관없이 사립체 질환에서 침범될 수 있는 모든 장기와 조직의 생리학적 기능과 형태학적 변화에 대한 포괄적인 선별 임상 검사가 필수적이다 (Tab. 3).

Table 3. Screening for Multiple Organ Involvement

Liver : hepatocellular dysfunction
Kidney : renal tubulopathy, proteinuria, renal failure
Heart : hypertrophic cardiomyopathy (echocardiogram, EKG)
Muscle : myopathy (CK, ALT/AST, EMG, muscle biopsy)
Brain : EEG, Brain MRI, MRS
Peripheral nerve : NCV and peripheral nerve biopsy
Eye : PEO, ptosis, optic atrophy, retinal degeneration (ERG, fundoscopic examination, VEP)
Ear : sensorineural deafness (BAEP, hearing test)
Pancreas : exocrine pancreatic dysfunction (ultrasonogram)
Gut : functional motility disorders, villous atrophy
Endocrine : hypoglycemia, hypocalcemia, hypoparathyroidism, growth hormone deficiency
Bone marrow : anemia, neutropenia, thrombocytopenia

사립체 호흡연쇄효소 결핍 질환의 진단

앞에서 언급한 기본적인 대사 선별 검사에서 사립체 질환의 가능성을 시사하는 이상 소견이 발견되거나, 이상 소견은 발견되지 않지만 여전히 임상적으로 유전성 사립체 호흡연쇄효소 결핍의 가능성을 배제할 수 없는 경우 확진을 위해서 근육에서 특수 조직화학 염색 검사, 사립체 호흡연쇄 효소 활성도 검사와 분자유전학적 검사가 통상적으로 사용된다. 그러나 소아 환자에서는 성인과 달리 mtDNA의 유전자 돌연변이에 의한 사립체 질환이 적고 대부분 핵 DNA의 유전자 돌연변이에 의해서 사립체 질환이 초래되는데 아직 다섯 개의 호흡연쇄효소를 구성하는 단백질을 coding하는 핵 DNA에 대해서 자세히 모르기 때문에 분자유전학적 검사의 진단적 유용성에 큰 제한이 있다. 또한 근육조직의 효소 조직화학 검사와 형태학적 검사도 민감도와 특

이도가 성인에 비해 낮아서 사립체 질환의 진단에 널리 사용되고 있지 않다. 현재 소아에서는 호흡연쇄 효소 활성도 검사가 유전성 사립체 호흡연쇄효소 결핍을 진단하는데 사용되는 주된 검사이다.

1. 생화학적 검사

1) 호흡연쇄효소 활성도 검사 : Respiratory Chain Enzyme Assay

사립체 호흡연쇄효소의 효소 활성도를 측정하기 위해 polarography와 분광광도법(spectrophotometry)이 주로 임상에서 사용된다. Polarographic assay는 사립체에 malate, pyruvate, glutamate, succinate 및 palmitate 같은 여러 가지 산화 기질을 첨가하고 산소 소모량을 측정함으로써 호흡연쇄 효소 복합체의 효소 활성도를 평가할 수 있다^{5,6)}. 1번 효소 복합체 결핍이 있는 경우 NADH를 생성하는 기질에는 사립체 호흡 기능의 장애가 생기나 FADH₂를 생성하는 기질에 대해서는 정상적인 산화 인산화 반응을 보이고, 2번 효소 복합체 결핍이 있을 때는 위와 반대의 반응을 보인다. 효소 복합체 3번과 4번이 결핍되면 NADH와 FADH₂ 모두에 대해서 호흡 기능 장애를 보인다. 또한 PDHC 결핍, TCA 회로 효소 결핍, 산화 인산화 과정에 관여하는 조효소, cytochrome c와 ubiquinone 같은 전자 전달체도 측정할 수 있다는 장점이 있다¹⁵⁾. 근육조직, 말초혈액 림파구와 배양한 피부 섬유아세포 같은 신선한 조직이나 세포에서 추출한 사립체를 이용하는 간편한 검사다. 그러나 검사에 적절한 양의 사립체를 얻기 위해서 많은 양의 검체가 필요하고 동결된 조직에서는 검사를 할 수 없다는 단점이 있다¹⁵⁾. 근

육에서 검사를 시행할 때는 검사에 필요한 양의 사립체를 추출하기 위해서 적어도 250mg 이상 많은 양의 근육조직이 필요하다.

분광광도법은 사립체를 분리할 필요 없이 분쇄한 사립체 조직에 산화 기질과 전자 공여체와 수용체를 첨가하고 생기는 화학 반응을 분광광도계를 이용하는 방법이다. 분광광도법은 전자 전달계에 있는 다섯 개의 효소 복합체의 효소 활성도를 단독으로 측정할 수도 있고, 1번과 3번 및 2번과 3번 효소 복합체를 병합하여 효소 활성도를 측정하기도 한다. 분광광도법은 동결된 조직에서도 검사할 수 있고, 사립체를 분리할 필요 없이 잘게 분쇄한 조직으로도 검사할 수 있어서 적은 양의 검체로도 검사할 수 있다는 장점이 있어서, 임상에서 주로 사용되는 방법이다. 근육을 검체로 사용할 때는 100-200mg 정도로 적은 양으로 검사가 가능하다. 분광광도법에 사용되는 검체는 오류를 피하기 위해서 검체를 채취한 후 즉시 액화 질소로 -80°C 이하로 동결시켜서 보관하여야 한다.

호흡연쇄효소의 효소 활성도 검사에 근육, 피부 섬유아세포, 말초 림파구 또는 골수, 간, 심장 근육 등 여러 가지 조직과 세포들이 검체로 사용된다. 검사의 민감도를 높이기 위해서 주된 임상증상이 나타나는 장기의 조직에서 검체를 얻는 것이 일반적인 원칙이지만, 질병의 주된 증상이 나타나는 장기가 뇌, 망막, 평활근육 또는 내분비샘과 같이 조직을 얻기 힘든 경우는 골격 근육과 피부와 같은 말초 조직이 흔히 사용된다. 검사에 사용되는 검체의 종류에 따라 호흡연쇄 효소 결핍을 찾아내는 민감도가 차이가 난다. Triepels 등¹⁶⁾을 포함한 여러 연구자들은 호흡연쇄 효소 결핍을 진단하는데 피부 섬유아세포가 근육조직보다 민감도가 낮아 사립체 질환의 선

별 검사로 피부 섬유아세포가 근육조직보다 덜 유용하다고 보고하였다. 그러나 Loeffen 등⁹⁾은 사립체 1번 호흡연쇄효소 복합체 결핍이 확인된 20명 환자의 근육조직과 피부 섬유아세포에서 1번 복합체의 효소 활성도를 비교할 때, 18명의 환자는 근육조직이 피부 섬유아세포에 비해 효소 활성도가 비슷하거나 현저히 낮았지만, 2명의 환자는 피부 섬유아세포의 효소 활성도가 근육조직에 비해 현저히 낮았다고 보고하면서 진단의 오류를 피하기 위해서는 적어도 두개 이상 다른 조직에서 효소 활성도 검사를 시행하여야 한다고 주장하였다. 근육조직을 검체로 사용할 때 조직의 신선도가 호흡연쇄효소 활성도에 영향을 미칠 수 있다. 냉동된 근육조직보다 신선한 근육조직이 호흡연쇄효소 활성도 검사의 민감도가 높아서 신선한 근육조직을 이용한 검사가 선호된다. 사립체 호흡연쇄효소 효소 활성도를 검사를 시행하여서 근육조직에서 효소 결핍이 확인된 환자에서 67.5%는 단독 결핍이었고 32.5%는 여러 효소 결핍이 동반되었다. 이중 1번 효소 결핍이 23%로 가장 흔하고, 4번과 3번 효소 결핍이 각각 10%, 1번과 4번 효소 결핍이 8%였고, 2번 효소 결핍이 1%로 가장 적었다⁹⁾. 그러나 Smeitink¹⁷⁾와 Thornburn과 Smeitink¹⁸⁾는 신선한 근육조직을 검체로 사용하여 효소 활성도를 검사하더라도 전체 환자의 30-40%에서 호흡연쇄효소의 결핍을 진단할 수 없다고 보고하면서 효소 검사의 진단적 제한점을 주장하였다. 따라서 가장 민감도가 높은 신선한 근육조직에서 사립체 호흡연쇄효소 검사 결과가 정상이라도 여전히 사립체 질환을 배제할 수 없다는 호흡연쇄효소 활성도 검사의 진단적 제한점으로 남아 있다.

일반적으로 피부 섬유아세포가 근육조직 보다

진단적 민감도가 낮지만 검체를 냉동 보관하였다 녹여서 수시로 다시 검사할 수 있고, 여러 가지 사립체 기능 검사도 할 수 있고, 호흡연쇄효소 복합체의 결핍을 초래하는 유전자 검사를 용이하게 할 수 있는 장점이 있기 때문에 사립체 질환에서 주된 임상 증상이 나타나는 장기에 관계없이 모든 환자에서 진단 및 연구를 위해서 피부조직 검사가 시행되어야 한다.

2) 호흡연쇄효소 활성도 검사의 함정 : Pitfalls in Respiratory Chain Enzyme Assay

(1) 임상적으로 질병이 표현되지 않은 조직 또는 장기에서 호흡연쇄효소 활성도를 측정하면 검사 결과가 정상으로 나타나기 때문에 검사 결과를 임상에 적용할 때 이를 유의하여야 한다.

(2) mtDNA 돌연변이에 의한 사립체 질환이 있는 환자에서 세포는 mutant mtDNA와 wild-type mtDNA를 모두 함유하고 있다. 조직을 구성하는 세포들의 mutant mtDNA/wild-type mtDNA의 비율 또는 wild-type mtDNA의 잔존양에 따라서 어떤 조직에서 기능 장애 여부가 결정되기 때문에 생화학적 장애가 있을 수도 있고, 없을 수도 있다. 그러나 조직마다 생화학적 장애를 초래할 수 있는 mutant mtDNA의 양 (threshold of mutant mtDNA) 즉 heteroplasmy 정도가 달라서 어떤 조직에서는 효소 활성도가 정상일 수 있고 어떤 조직에서는 효소 결핍이 초래될 수 있다¹⁵⁾. 예를 들어서 어떤 조직에서 100% mutant mtDNA만 함유하는 세포들이 60%를 차지하고 wild-type mtDNA만 함유한 세포들이 40%를 차지하는 경우 이 조직은 사립체의 생화학적 기능을 수행할 수 없다. 그러나 어떤 조직의 모든 세포들이 mutant mtDNA 60%, wild-type mtDNA이

40%를 차지하는 경우는 생화학적 기능 장애를 초래하지 않을 수도 있어서 의미 있는 효소 결핍이 없을 수 있다. 위와 같은 이유로 mtDNA 유전자 돌연변이로 인한 사립체 질환이 있는 환자의 장거나 조직에서 사립체 호흡연쇄효소 활성도를 검사 할 때 임상 증상이 없는 장거나 조직에서는 효소 활성도가 정상이지만, 임상적으로 사립체 질환에 이환된 조직일지라도 효소 활성도가 정상일 수 있기 때문에 효소 활성도 검사가 정상이라도 사립체 질환의 가능성을 완전히 배제할 수 없다. 이에 사립체 질환에서 호흡연쇄효소 활성도 검사의 진단적 제한점이 있다. 이런 경우는 같은 조직에서 다시 검체를 얻어서 검사를 반복 시행하거나, 다른 조직을 검사하거나 철저한 분자유전학적 검사를 시행하여서 진단상의 오류를 해결하여야 한다⁶.

(3) 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 있는 환자에서 mtDNA의 heteroplasmy 정도에 따라서 생화학적 기능 장애가 결정되기 때문에 배양된 동결 세포로 사립체 호흡연쇄효소를 검사할 때 다음을 유의하여야 한다¹⁹. 검사에 사용할 세포를 배양할 때 호흡 사슬 기능이 정상인 세포에 비해서 호흡사슬 기능이 비정상적인 mutant mtDNA를 많이 함유한 세포는 정상적으로 자라지 못하고 천천히 자라거나 죽을 수도 있다. 따라서 세대 배양할 때 배양 상태에 따라서 mutant mtDNA와 wild-type DNA를 함유한 세포의 비율이 변할 수 있기 때문에 호흡연쇄효소의 효소 활성도가 차이가 날 수 있고, 심한 경우는 효소 활성도가 정상으로 돌아올 수도 있다^{5,6,15}. Pyruvate와 uridine이 호흡연쇄효소가 결핍된 세포의 생존 및 증식에 중요하다. 호흡연쇄효소가 결핍된 세포에 NADH가 축적되면 중간 대사의 장애가 생기기 때문에 세포 생존에 영향을

미친다. Pyruvate는 세포안의 NADH를 산화시켜서 호흡연쇄효소가 결핍된 세포의 생존을 도와준다. 핵산 합성에 필요한 uridine을 합성하는 dihydrorotate dehydrogenase는 사립체 내막의 바깥에 위치하기 때문에 사립체는 uridine을 합성할 수 없다. 따라서 uridine을 배양액에 공급하여야 한다. 사립체 질환이 있는 환자의 피부 섬유아세포를 배양할 때 항상 pyruvate (2mmol/L) 와 uridine (200 μ mol/L) 을 첨가하여서 호흡연쇄효소가 결핍된 세포가 생존 및 증식할 수 있는 최적 상태를 제공하여야한다¹⁵.

(4) 정상 대조군에서 사립체 호흡연쇄효소의 효소 활성도가 정상적인 분포를 보이지 않고 산재되어 있기 때문에 정상 대조군의 평균치와 표준 편차를 구해서 정상치의 범주를 정하는 것이 통계학적으로 의미가 적다²⁰. 따라서 정상치와 비정상치를 구분하는 분명한 cut-off value가 없기 때문에 환자의 효소 활성도가 정상 대조군의 효소 활성도 분포 범위 안에 겹칠 수 있고, 환자에서 부분적인 기능장애가 있는 사립체가 축적될 경우 잔존 효소 활성도를 어느 정도 보일 수 있기 때문에 호흡연쇄효소 결핍을 진단하는데 오류를 범할 수 있다. 또한 환자의 효소 활성도를 정상 대조군의 효소 활성도로 환산해서 평가할 경우 효소 활성도의 절대치가 정상치의 하한선에 있는 환자는 예외 없이 효소 결핍으로 진단할 수 있는 오류를 범할 수 있다¹⁵. 현재 사립체 질환의 진단에 적용되고 있는 포괄적인 임상진단 기준에 포함된 효소 활성도에 대한 조항도 역시 특별한 기준이 없고 다분히 인위적이다. 또한 검사실 마다 사용되는 검사방법과 정상 범주를 결정하기 위해서 사용되는 정상 대조군의 성격에 따라 결과가 다르기 때문에 정상치와 비정상치를 구분하는 분명한 기준에 대한 연구가

있어야 한다.

(5) 계면활성제로 처리하거나 얼렸다 녹인 배양 세포는 NADH를 방출하는 기질의 산화 정도가 다양하고, rotenone-resistant NADH cytochrome c reductase activity가 배양된 세포나 말초 림파구에서는 높다. 따라서 1번 효소 복합체를 정확하게 측정할 수 있는 신뢰할 수 있는 방법이 아직 없다는 것이 사립체 호흡연쇄 효소 검사에서 해결되어야 할 숙제다⁶⁾.

(6) 분광광도법은 대부분 동결된 검체를 사용한다. 그러나 검체를 부적절하게 동결시키면 3번 효소 복합체를 포함하여 quinone에 의존하는 대부분의 사립체 호흡연쇄효소의 활성도가 소실된다⁵⁾. 영하 80°C 이하로 급속 냉동시키지 않은 동결된 조직을 검체로 사립체 호흡연쇄효소 활성도를 측정할 결과는 의미가 없다는 사실을 인지하여야 한다¹⁵⁾. 실제 동결된 조직으로 검사할 때는 3번 효소 복합체의 빈도가 높으나 신선한 조직으로 검사하면 3번 효소 복합체 결핍이 대단히 적다는 사실이 간접적인 증거다.

(7) 휴지기에 있는 세포에서 NAD⁺/NADH pool이 감소하여서 사립체 기능 특히 1번 효소 복합체 기질 산화 장애를 초래할 수 있기 때문에 배양된 세포에서 polarography로 효소 활성도를 측정할 때는 검사 전에 배양액을 바꿔야 하고 검사 중 NAD⁺를 투여해서 피리미딘 뉴클레오타이드를 보충하여야 한다¹⁵⁾.

(8) 사립체 호흡연쇄효소 활성도 검사에서 효소 결핍이 있더라도 효소 결핍이 반드시 유전성 사립체효소 결핍을 의미하지 않는다는 사실을 인지하여야 한다. 예를 들어 지방산 대사질환은 이차적으로 사립체 호흡연쇄효소 기능에 영향을 미칠 수 있기 때문에 이차적으로 사립체 기능 장애를 초래할 수 있는 질환의 존재 여부에 대

해서 고려하여야 한다.

3) 사립체의 생화학적 기능 검사 : Functional Studies of Intact Mitochondria

호흡연쇄 효소 활성도 검사와 더불어 사립체에 서 일어나는 여러 가지 생화학적 기능에 대한 검사가 사립체 질환의 진단에 유용하게 사용된다. 사립체의 기능 검사는 주로 배양된 피부 섬유아세포를 이용한다. 배양된 피부 섬유아세포에서 젖산 농도와 L/P ratio 측정, ATP 생산 능력 검사와 배양시 stress 검사가 주로 사용되고²¹⁾, 최근 여러 연구자들이 보고한 포괄적 진단 기준도 위와 같은 사립체의 기능 평가 검사가 포함되어 있다³⁾. Pitkanen 등²¹⁾은 사립체 호흡연쇄 효소 활성도 검사에서 효소 결핍이 확인된 12명의 환자에서 배양된 피부 섬유아세포에서 모두 젖산 농도와 L/P ratio가 증가 되었고, 25%에서 ATP 생산 능력이 의미 있게 감소하였고, 40%에서 stress test에 양성 결과를 보였다. 피부 섬유아세포 배양시 stress 검사는 주로 menadione (25 μ mol/L)을 투여하거나 포도당 대신 유당을 넣은 배지에서 배양하는 방법을 사용한다. 사립체 호흡연쇄효소가 결핍된 세포는 포도당이 없고 유당만 함유된 배지에 유당으로부터 ATP를 생산할 수 없기 때문에, menadione은 자유기 (free radical)의 생산을 증가시키기 때문에 세포가 생존할 수 없는 원리를 이용한 검사다. 이와 더불어 polarography와 기질에 ¹⁴C 표식자를 붙여서 검사하는 방사성화학 분석 검사 (radiochemical analysis)를 이용하여서 inorganic phosphate, phosphocreatine (PCr), AMP와 ATP, 젖산 농도를 측정하여 간접적으로 사립체의 기능을 평가할 수 있다. Smeitink¹⁷⁾와 Thornburn과 Smeitink¹⁸⁾는 신선한 근육조직에

서 방사성화학 검사로 ATP와 PCr 측정할 때 사립체 질환이 의심되나 호흡연쇄효소의 효소 활성도가 정상인 30-40%의 환자에서 모두 ATP와 PCr이 증가되는 소견을 발견하고 방사성화학 검사는 사립체 질환의 진단에 중요한 역할을 한다고 주장하였다. 또한 호흡연쇄효소 결핍이 확인된 신선한 근육조직 검체를 polarography로 검사할 때 60%에서 검사 결과가 정상이어서 polarography보다 방사성화학 검사가 더 우수한 검사라고 주장하였다.

2. 사립체 질환의 형태학적 검사 :
Morphologic Studies of Mitochondrial Disorders

전통적으로 골격근육의 생검에서 얻어진 근육세포의 형태학적 변화를 광학현미경이나 전자현미경으로 관찰하는 형태학적 진단법이 사립체 호흡연쇄효소 검사와 더불어 사립체 질환의 진단에 주로 사용되어왔다. 사립체 질환이 의심되는 환자에서 불균일 적색 근육섬유 (ragged red fiber: RRF)와 전자현미경 검사에서 비정상적인 사립체를 의미하는 형태학적 변화가 나타나면 사립체 질환을 용이하게 진단할 수 있다. 그러나 분자유전학적 진단법이 도입된 이후 사립체 질환의 진단에 형태학적 진단법 특히 검사비가 비싸고 비특이적인 전자현미경을 이용한 형태학적 진단법의 역할에 대해서 의문이 제기되었다²²⁾. 그러나 사립체 질환이 의심되는 환자들에서 mtDNA 유전자 분석 검사를 시행할 때 전체 환자의 10% 이하에서 유전자 변이가 발견되기 때문에 분자유전학적 검사법이 형태학적 진단법을 대체하는 검사는 될 수가 없다²³⁾. 현재도 근육조직을 전자 현미경이나 효소 조직화학 염색을 하

고 광학 현미경으로 관찰하는 형태학적 진단법이 여전히 사립체 질환의 진단에 통상적으로 사용되고 있다.

1) 근육의 특수 효소 조직화학 검사 : Special Enzyme Histochemistry of Muscle

근육조직의 사립체 호흡연쇄효소에 특이하게 반응하는 효소 조직화학 염색법은 근육세포 안에 존재하는 사립체의 형태학적 변화를 알 수 있는 중요한 진단 방법이다. 사립체 질환의 진단을 위해서 근육조직에서 기본 병리조직 검사와 더불어 gomori trichrome 염색, succinate dehydrogenase (SDH) 염색, cytochrome c oxidase (COX) 염색과 nicotinamide adenine dinucleotide reductase (NADH) 염색 같은 특수 효소 조직화학 염색이 통상적으로 시행 된다. SDH 염색은 2번 효소 복합체, COX 염색은 4번 효소 복합체의 활성도를 간접적으로 알 수 있으나, 1번과 3번 효소 복합체의 활성도를 간접적으로 평가할 수 있는 효소 조직화학 염색법은 아직 없다. 효소 조직화학 염색을 시행하여 사립체 호흡연쇄효소 결핍이 있는 환자의 근육조직을 광학 현미경으로 관찰하면 RRF와 불균일 청색 근육섬유 (ragged blue fiber:RBF), COX 염색이 안 되는 근육섬유 (COX deficient fiber)와 근육세포막 아래 사립체가 모여 있는 소견과 같은 사립체 질환을 시사하는 특징적인 형태학적 변화를 관찰할 수 있다. 그러나 임상소견과 호흡연쇄효소 활성도 검사로 사립체 질환이 진단된 환자의 45%에서 근육조직 검사에서 사립체 질환을 시사하는 특징적인 형태학적 변화를 발견할 수 없어서 효소 조직화학 염색 검사는 사립체 질환의 진단을 보조할 수는 있어도 이상 소견이 없다고 사립체 질환의 가능성을 배제할 수는 없

다^{24,25}). 특히 효소 복합체 1번과 3번이 결핍된 대부분의 환자들에서 효소 조직화학 염색 검사에서 이상 소견을 발견할 수 없다.

근육에 사립체 질환이 생기면 사립체가 증식하여서 근육세포의 세포막 아래와 근육섬유 안에 비정상적인 사립체가 모여 있을 수 있다. 근육섬유 안에 있는 비정상적인 사립체들이 gomori trichrome 염색을 할 때 적색으로 염색되는 근육섬유를 RRF라 하며 사립체 질환에서 볼 수 있는 대표적인 특징적 소견으로 인식되고 있다. 사립체 질환의 이용되는 포괄적 임상진단 기준에 전체 근육섬유에서 RRF가 차지하는 비율에 따라서 2% 이상이면 주된 진단기준, 30-50세 환자에서 1-2%는 부수적인 진단기준으로 분류한다. RRF는 근육세포 안에 있는 전체 mtDNA 중 비정상적인 mtDNA가 85% 이상이 되어야 나타날 수 있다²⁶). RRF는 MERRF, MELAS, KSS, CPEO 같이 사립체 단백 형성 장애를 초래하는 사립체 질환에서 흔하게 나타나지만, 핵 DNA에서 만들어지는 1번 효소 복합체를 구성하는 단백질이 결핍된 환자에서는 발견되지 않는다. 성인에서는 사립체 질환이 있는 환자의 59%에서 RRF가 발견되지만²⁷), 소아에서는 전체 환자의 2.5%로 드물게 발견되기 때문에 성인에 비해서 사립체 질환의 진단적 가치가 낮다²⁴). 또한 나이가 들면 신경계 증상이 없는 성인에서도 RRF가 근육섬유의 0.5% 정도에서 발견될 수 있고, acid maltase 결핍증, 염증성 근병증, 근이영양증과 같은 여러 근육질환에서도 발견될 수 있기 때문에 RRF는 사립체 질환에서만 발견되는 특이한 소견은 아니다. 따라서 사립체 질환을 시사하는 다른 임상 증상과 검사 소견이 있는 경우만 의미를 부여할 수 있다. 근육세포 안에 있는 비정상적인 사립체들이 SDH 염색을 할 때 청색

으로 염색되는 근육섬유를 RBF라 하며 사립체 질환에서 볼 수 있는 또 다른 특징적 소견으로 인식되고 있다.

Cytochrome c oxidase는 사립체 DNA와 핵 DNA에서 형성된 단백질로 구성된 효소 복합체로 COX 염색은 사립체 질환 진단에 중요한 정보를 제공한다. 근육세포 안에 있는 mutant DNA와 wild-type DNA의 비율 즉 heteroplasmy 정도에 따라서 COX 염색이 안 되는 근육섬유가 정상 근육섬유 사이에 모자이크 형태로 석여있을 수도 있고, 대부분의 근육섬유가 전반적으로 COX 염색이 안 될 수도 있다. 모자이크 형태를 보이는 경우는 heteroplasmic mtDNA의 돌연변이에 의한 질환을 의심할 수 있고, 전반적으로 COX 염색이 안 되는 경우는 핵 DNA 돌연변이 또는 homoplasmic mtDNA 돌연변이에 의해 초래되는 사립체 질환을 의심할 수 있다. 사립체 질환이 있는 소아 환자에서 비정상적인 COX 염색 소견이 발견되는 빈도는 보고자들에 따라서 달라 6.8-84%까지 대단히 다양하다²⁷). 이는 아마도 대상 환자들에서 사립체 질환을 초래하는 유전자 돌연변이의 근원 (핵 DNA 또는 mtDNA) 과 mutant mtDNA의 heteroplasmy 정도에 따라 다르기 때문으로 설명될 수 있다²⁶). 또한 소아 환자에서 RRF는 발견되지 않더라도 COX 염색에 이상이 발견되는 경우도 많다. 따라서 소아 환자는 RRF보다 COX 염색 이상 소견이 사립체 질환의 진단에 더 중요하다.

Gomori trichrome, SDH와 COX 염색 결과를 종합하면 사립체 질환의 유전학적 정보를 얻는데 중요한 정보를 제공한다. RRF와 RBF가 발견되나 COX deficient fiber가 없으면 MERRF, KSS, CPEO 같은 사립체 단백 합성 장애를 초

래하는 mtDNA의 결손이나 tRNA 돌연변이를 시사하고, RRF가 보이면서 모자이크 형태의 COX deficient fiber가 보이면 MELAS 같은 사립체 구조적 유전자의 돌연변이를 시사하고, 전반적인 COX deficient fiber를 보이면 핵 DNA 유전자 돌연변이나 homoplasmic mtDNA 유전자 돌연변이를 시사한다.

2) 사립체 미세구조 형태학적 검사 :

Ultrastructural Evaluation of Mitochondria

사립체 질환이 있는 환자의 근육세포를 전자현미경으로 보면 여러 가지 형태의 사립체 이상 소견이 발견된다. 사립체의 수가 늘어나거나, 크기가 커지거나, 사립체 안에 결정 포함물(paracrystalline inclusion) 같은 이상 물질을 함유하거나, 사립체의 능선(cristae)의 형태가 변형되는 소견이 사립체 질환 환자의 근육세포에서 가장 흔하게 발견되는 형태학적 변화이다. 적어도 3개 이상의 근육세포에서 3개 이상 사립체가 균락을 이루면 사립체 수가 증가하였다고 판단하고, 길이가 1 μ m 이상 길어지거나 폭이 0.4 μ m 이상 넓어지면 사립체의 크기가 크다고 판단하고, 아령 같은 모양이외에 다양한 형태를 보이면 모양이 변형되었다고 판단한다. Rollins 등²⁴⁾은 사립체 질환에서 볼 수 있는 전형적인 임상 증상이 적어도 두개 이상의 장기에서 세 가지 증상을 보이고 생화학적 검사에서 사립체 질환의 소견을 보이는 113명의 소아 환자에서 근육조직 검사를 시행하여 전자현미경으로 관찰하였다. 사립체 증식 48%, 크기 증가 7%, paracrystalline inclusions 3%, concentric laminated bodies 2%를 포함하여 전체 환자의 70%에서 형태학적 변화를 보고하였다. 이중 10%는 비특이적인 소견이며 60%만 사립체 질환

에서 흔히 볼 수 형태학적 소견이었다. Kyriacou 등²⁷⁾과 다른 연구자들도 비슷한 결과를 보고하였다. 그러나 사립체 증식 또는 크기가 커지는 형태학적 변화도 근이영양증, 근염, 신경원성 근위축 등 여러 근육질환과 심지어는 정상 근육에서도 나타날 수 있어서 사립체 질환에만 나타나는 특이 소견은 아니다. 따라서 항상 임상 소견과 다른 검사소견을 참조하여서 진단적 의미를 부여하여야 한다. 사립체 질환이 있는 소아 환자는 전자현미경을 이용한 근육세포 미세구조 관찰이 효소 조직화학 염색법 보다 형태학적 변화를 발견할 확률이 더 높고, 효소 조직화학 염색 검사에서 이상이 없는 경우도 전자현미경으로 형태학적 변화를 관찰 할 수 있다. 따라서 소아 환자에서 전자현미경을 이용한 미세구조 관찰은 진단이 확실하지 않을 경우 사립체 질환의 가능성을 제기할 수 있는 정보를 제공할 수 있기 때문에 조직화학 염색법과 더불어 여전히 중요한 검사법으로 사용되고 있다^{28,29)}.

결 론

사립체 질환의 진단에 생화학적 검사와 형태학적 검사 이외에도 증상에 의거한 임상진단과 분자 유전학적 검사가 사용된다. 그러나 아직 까지 사립체 질환을 정확하게 진단할 수 있는 민감도와 특이도가 모두 높은 진단법이 없다. 소아 환자의 10-20%정도는 mtDNA 돌연변이로 인해 사립체 질환이 발생하지만 대부분은 핵 DNA의 돌연변이로 인해 사립체 질환이 발생하고, 호흡연쇄효소 결핍을 초래하는 핵 DNA의 돌연변이들에 대해서는 현재 별로 알려진 바가 없다. 따라서 분자 유전학적 검사는 가장 특이도가 높은 검사지만 민감도가 낮아서 소아 사립체 질환의

진단에 유용성이 제한적이다. 임상적 추정 진단도 사립체 질환의 임상증상이 대단히 다양하고 복잡하기 때문에 진단적 제한점이 크다. 현재 대사선별 검사를 통해서 사립체 질환의 가능성이 큰 환자들을 선별하고 사립체 호흡연쇄효소 활성도 검사와 형태학적 진단을 시행하는 것이 가장 통상적인 흐름이다. 그러나 위의 검사도 역시 앞에서 언급한 바와 같이 민감도가 그리 높지 않고 임상적인 소견을 고려하지 않고 단독으로 사립체 질환을 진단하기에는 특이도가 높지 않다. 이를 보완하기 위해서는 사립체 호흡연쇄효소 활성도 특히 1번 효소 복합체의 활성도를 측정하는 좀더 민감도가 높은 검사 방법, 전체 mtDNA를 한 번에 손쉽게 염기서열분석하고, 아직 규명되지 않은 많은 핵 DNA의 돌연변이를 손쉽게 찾아낼 수 있는 방법을 개발하여야 한다. 이러한 획기적인 진단법이 개발되기 전에는 여러 가지 사립체의 기능학적 검사를 포함한 여러 검사 소견들을 종합하여서 좀 더 체계적인 진단에 이를 수 있는 modified Walker criteria, Nijmegen criteria, Nonaka criteria와 Wolfson criteria 같은 포괄적 진단적 접근법을 사립체 질환의 진단에 적극적으로 사용하여야 한다³⁾.

References

- 1) Chinnery PF, Neil Howell, Andrews RM, Turnbull DM. Clinical mitochondrial genetics. *J MMed Genet* 1999;36:425-436.
- 2) DiMauro S, Bonilla E, De Vivo DC. Does the patient have a mitochondrial encephalopathy? *J Child Neurol* 1999;14(1 suppl):23S-35S.
- 3) Naviaux RK. Developing a systemic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease. *Mitochondrion* 2004;4:351-361.
- 4) Parra D, Gonzalez A, Mugueta C, Martinez A, Monreal. Laboratory approach in mitochondrial diseases. *J Physiol Biochem* 2001;57:267-284.
- 5) Munnich A, Rotig A, Chretien D, Saudubray JM, Cormier V, Rustin P. Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency. *Eur J Pediatr* 1996;155:262-274.
- 6) Munnich A, Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001;106:4-17.
- 7) Kang PB, Hunter JV, Kaye EM. Lactic acid elevation in extramitochondrial neurodegenerative diseases. *J Child Neurol* 2001;16:657-665.
- 8) Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JLCM, Buskens CAF, Smeets RJP, Rubio Gozalbo ME, et al. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* 1999;45:787-790.
- 9) Loeffen JLCM, Smeitink JAM, Trijbels JMF, Janssen AJM, Triepels RH, Sengers RCA et al. Isolated complex I deficiency in children: Clinical,

- biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat* 2000;15:123-134.
- 10) Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HHM, Denett X, Thornburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: An underdiagnosed energy generation disorder. *Neurol* 1999;52:1255-1264.
 - 11) Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, Belmont JW, Smith EO, Neish SR et al. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial Disease. *Pediatrics* 2004;114:925-931.
 - 12) Touati G, Rigal O, Lombes A, Frachon P, Giraud M, de Baulny HO. In vivo functional investigations of lactic acid in patients with respiratory chain disorders. *Arch Dis Child* 1997;76:16-21.
 - 13) Jesen TD, Kazemi-Esfarjani P, Skomorowska E, Vissing J. A forearm exercise screening test for mitochondrial myopathy. *Neurology* 2002;58:1533-1538.
 - 14) Finsterer J. Lactate stress testing by bedside lactate determination. *Metab Br Dis* 2003;18:265-272.
 - 15) Chretien D, Rustin P. Mitochondrial oxidative phosphorylation; Pitfalls and tips in measuring and interpreting enzyme activities. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:189-198.
 - 16) Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet* 2001;106:37-45.
 - 17) Smeitink JAM. Mitochondrial disorders: Clinical presentation and diagnostic dilemmas. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:199-207.
 - 18) Thornburn DR, Smeitink J. Diagnosis of mitochondrial disorders: Clinical and biochemical approach. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:312-316.
 - 19) Bourgeron T, Chretien D, Rotig A, Munnich A, Rustin P. Fate and expression of the deleted mitochondrial DNA differ between heteroplasmic skin fibroblast and Epstein-Barr virus-transformed lymphocyte cultures. *J Biol Chem* 1993;268:19369-19376.
 - 20) Rustin P, Chretien D, Bourgeron T. An improved representation of enzyme activities for assessment of the mitochondrial respiratory chain. *Lancet* 1991;338:60-69.
 - 21) Pitkanen S, Feigenbaum A, Laframboise R, Robinson BH. NADH-coenzyme Q reductase (complex I) deficiency: heterogeneity in phenotype and biochemical findings. *J Inher Metab Dis* 1996;19:675-686.
 - 22) DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985;17:521-538.
 - 23) Liang M-H, Wong LJC. Yield of mtDNA mutation analysis in 2,000 patients. *Am*

- J Med Genet 1998;77:395-400.
- 24) Rollins S, Prayson RA, McMahon JT, Cohen BH. Diagnostic yield of muscle biopsy in patients with clinical evidence of mitochondrial cytopathy. Am J Clin Pathol 2001;116:326-330.
- 25) Patterson K. Mitochondrial muscle pathology. Ped Dev Pathol 2004;7:629-632.
- 26) Vogel H. Mitochondrial myopathies and the role of the pathologist in the molecular era. J Neuropathol and Exp Neurol. 2001;60:217-227.
- 27) Kyriacou K, Hadjisavvas A, Zenios A, Papacharalambous R, Kyriakides Th. Morphological methods in the diagnosis of mitochondrial encephalomyopathies: The role of electron microscopy. Ultrastructual Pathology 2005;29:169-174.
- 28) Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, Mcfarland R, Turnbull DM. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. Neuromuscular Disorders 2004;14:237-245.
- 29) Miles L, Wong BL, Dinopoulous A, Morehart PJ, HofmannIA, Bove KE. Investigation of children for mitochondriopathy confirms need for strict patient selection, improved morphological criteria, and better laboratory methods. Hum Pathol 2006;37:173-184.