อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาระดับ โปรตีนคาร์บอนิล ในซีรั่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง

Determination of Protein Carbonyl in Chronic Heart Failure Patients

โดย อ. ฐิฒิภรณ์ เมฆรุ่งเรืองวงศ์ และคณะ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒ - ส.ค. ๒๕๕๖
วันลงทะเบียน.....
เลขทะเบียน...1.63A3A91.....
เลขเรียกหนังสือ...2 HC
W81
ร๖๓๕๙ร
๒๕๕๖

มกราคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์ ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมือ ครุภัณฑ์ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรสำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ฐิติภรณ์ เมฆรุ่งเรืองวงศ์

22 มค. 2556

บทคัดย่อ

หัวใจล้มเหลวเรื้อรังคือภาวะที่หัวใจสูญเสียความสามารถในการสูบฉีดเลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆได้อย่างเพียงพอและพบว่ามีอุบัติการณ์ที่เพิ่มมากขึ้นสาเหตุของหัวใจล้มเหลวเรื้อรังมาจากหลายปัจจัยซึ่งภาวะOxidative stress เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายและค้นพบว่าหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเป็นสาเหตุที่ทำให้ oxidative modified protein เพิ่มขึ้น เช่น โปรตีนคาร์บอนิล ซึ่งอาจใช้เป็นสารบ่งชี้สำหรับการพยากรณ์โรคหรือติดตามการรักษา การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของโปรตีนคาร์บอนิลในซีรั่มของผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตามNew York Heart Association (NYHA) Functional Classification กับซีรั่มของผู้มีสุขภาพดีโดยวัดระดับความเข้มข้นของโปรตีนคาร์บอนิลในซีรั่มของผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับความรุนแรงละ 20 รายและซีรั่มของผู้มีสุขภาพดีจำนวน 20 รายด้วยวิธี Spectrophotometric 2,4-Dinitrophenylhydrazine(DNPH) assayผลการศึกษาพบว่า ระดับความเข้มข้นของโปรตีนคาร์บอนิลในกลุ่มผู้ป่วยมีค่าสูงกว่ากลุ่มผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่p value <0.001แต่กลับไม่พบความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของโปรตีนคาร์บอนิลในซีรั่มของกลุ่มผู้ป่วยแต่ละระดับความรุนแรง โดยพบว่าระดับความเข้มข้นของโปรตีนคาร์บอนิลที่วัดได้ในผู้มีสุขภาพดีผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับความรุนแรง I, II, III และIV มีค่ามัธยฐาน 0.8610 (99% CI, 0.723-1.015) nmol/mg, 1.875 (99% CI, 1.557-2.565) nmol/mg, 1.529 (99% CI, 1.364-2.321) nmol/mg, 1.584 (99% CI, 1.419-2.385) nmol/mg และ 1.650 (99% CI, 1.368-2.119) nmol/mg ตามลำดับ จากผลการวิจัยข้างต้น อาจใช้ระดับความเข้มข้นของโปรตีนคาร์บอนิลในการคัดกรองกลุ่มผู้มีสุขภาพดีออกจากกลุ่มผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะใช้เป็นสารบ่งชี้สำหรับการพยากรณ์โรคหรือติดตามการรักษาหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

คำสำคัญ: ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง , ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ,โปรตีนคาร์บอนิล

ABSTRACT

Chronic heart failure (CHF) is a condition that the heart lost ability to supply sufficient blood to the organs. Each year, the incidences of chronic heart failure have been increasing. The causes of chronic heart failure consist of many factors. Oxidative stress is one of the important causative factors and has been intensively studied. The CHF was known to cause the elevation of oxidative modified type of protein, such as protein carbonyl, which could be applied as a biomarker for determining the prognosis or monitoring the treatment. In this study, we aimed to determine the differences of serum protein carbonyl content level in 4 subclasses of CHF patients, who were classified according to the New York Heart Association (NYHA) functional classification, compared with healthy subjects. Twenty serum samples were collected from in each functional class's patients and 20 from healthy subjects by Spectrophotometric 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay. The results showed that protein carbonyl content level in CHF patients was significantly higher than that of healthy subjects (p value<0.001). However, there were no significant different between each functional class. Protein carbonyl content in healthy subjects, functional class I, I, III and IV chronic heart failure patients which shows in median (99%CI) is 0.8610 (0.723-1.015) nmol/mg, 1.875 (1.557-2.565) nmol/mg, 1.529 (1.364-2.321) nmol/mg, 1.584 (1.419-2.385) nmol/mg and 1.650 (1.368-2.119) nmol/mg, respectively. In conclusion, the serum protein carbonyl content level could be possibly used as a screening marker to distinguish the healthy and CHF, but not have sufficient potential to be a prognostic marker or follow up marker in CHF.

Key word: Chronic heart failure, Oxidative stress , Protein carbonyl

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ 1

บทคัดย่อ 2

ABSTRACT 3

สารบัญเรื่อง (Table of Contents) 4

สารบัญตาราง (List of Tables) 5

สารบัญภาพ (List of Illustrations) 6

บทที่ 1: บทนำ 7

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 7
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 8
3. ขอบเขตของโครงการวิจัย 9
4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 9

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรม 10

1. ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง 10
2. ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน 17
3. Protein carbonyl 22

บทที่ 3: วิธีดำเนินงานวิจัย 23

1. การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง 23
2. การเก็บตัวอย่างซีรั่ม 24
3. การควบคุมคุณภาพก่อนวิเคราะห์ 24
4. การตรวจวัดความเข้มข้นของ Protein carbonyl 25
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 27

บทที่ 4: ผลการวิจัย 28

1. การควบคุมคุณภาพก่อนการวิเคราะห์ 28
2. การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Protein carbonyl (PC) ในผู้มีสุขภาพดีเปรียบเทียบกับผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง 30

บทที่ 5: อภิปรายผลการวิจัย 33

เอกสารอ้างอิง 35

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตาราง 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มสุขภาพดี และ ผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้องรัง functional class I, II, III และ IV 31 30

ตาราง 2 การเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl content (nmol/mg) ในซีรั่มผู้มีสุขภาพดี และ ผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้องรัง functional class I, II, III และ IV 31

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

ภาพ 1	แสดงกลไกการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์	19
ภาพ 2	กราฟมาตรฐานของโปรตีนอัลบูมิน ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	26
ภาพ 3	กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างระดับ protein carbonyl content (nmol/mg) และสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน (Humatrol P)	28
ภาพ 4	กราฟแสดงการวิเคราะห์ความแม่นยำภายในการทำวิเคราะห์ (within run precision) ของการวิเคราะห์ protein carbonyl content (nmol/mg) ในสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน (Humatrol P)	29
ภาพ 5	กราฟแสดงการวิเคราะห์ความแม่นยำระหว่างวันของการตรวจวิเคราะห์ (Between - day precision) ของการวิเคราะห์ Protein carbonyl content (nmol/mg) ในสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน (Humatrol P)	29
ภาพ 6	กราฟแสดงค่าผลการวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl content (nmol/mg) ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง เปรียบเทียบกับซีรั่มของผู้มีสุขภาพดี	32

บทที่ 1: บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ภาวะหัวใจล้มเหลว เป็นภาวะที่หัวใจไม่สามารถบีบตัวส่งเลือดออกไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกายได้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย (1) โดยอุบัติการณ์ของภาวะหัวใจล้มเหลวเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆตามอายุ ในประเทศสหรัฐอเมริกาประชากรร้อยละ 1.2-2 มีภาวะหัวใจล้มเหลวและผู้ป่วยครึ่งหนึ่งของภาวะหัวใจล้มเหลว (Heart Failure) มีอายุมากกว่า 80 ปี (2) ความรุนแรงแรงของโรคหัวใจล้มเหลวทำให้การพยากรณ์ของโรคไม่ดีนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุที่อายุมากกว่า 75 ปี พบว่าประมาณครึ่งหนึ่งต้องเสียชีวิตและเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลภายใน 12 เดือน อัตราการตายใน 5 ปีสูงมากกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นภาวะหัวใจล้มเหลวจึงเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญของผู้สูงอายุในทุกๆประเทศรวมถึงประเทศไทย(3) จากสถิติจำนวนผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก พบว่ามีอัตราเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องถึงร้อยละ 26.8 ภายใน 5 ปี (4)

การวินิจฉัยโรคหัวใจล้มเหลวนั้นจะพิจารณาจากการซักประวัติ ผลการตรวจร่างกาย และผลเอกซ์เรย์ปอด แต่อย่างไรก็ตามอาการที่ตรวจพบจากการตรวจร่างกายอาจมิได้มาจากภาวะหัวใจล้มเหลวเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงต้องความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ตรวจด้วย ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการคิดค้นตรวจหาสารบ่งชี้ต่างๆเพื่อช่วยในการวินิจฉัยและติดตามผลให้มากขึ้น สารบ่งชี้เพื่อการวินิจฉัยที่ใช้ในปัจจุบันคือ BNP และ pro BNP ซึ่งหากตรวจพบสารบ่งชี้นี้ในเลือดสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดก็จะวินิจฉัยได้ว่ามีภาวะหัวใจล้มเหลว อย่างไรก็ตามสารบ่งชี้ชนิดนี้ยังขึ้นอยู่กับ อายุ เพศ วิธีที่ใช้ตรวจ และเชื้อชาติ นอกจากนี้แล้วในปัจจุบันการวิเคราะห์สารบ่งชี้ชนิดนี้ยังมีราคาแพง เพราะต้องอาศัยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติในการอ่านค่าซึ่งเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัตินี้มีเพียงในโรงพยาบาลใหญ่ๆเท่านั้น ดังนั้นหากมีสารบ่งชี้ตัวอื่นๆที่สามารถตรวจได้ง่ายและสามารถใช้ในโรงพยาบาลชุมชนที่มีอุปกรณ์ทางการแพทย์ไม่เพียงพอ อาจนำไปสู่แนวทางการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาได้เร็วขึ้น (5)

สาเหตุของการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวนั้นมีได้หลายสาเหตุ อาทิ กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Ischemic heart disease) ความดันโลหิตสูง (Hypertension) โรคลิ้นหัวใจ (Valvular heart disease) โรคหัวใจพิการแต่กำเนิด (Congenital heart disease) โรคกล้ามเนื้อหัวใจ (Myocardium disease) เป็นต้น เมื่อเร็วๆนี้ พบว่าภาวะ oxidative stress เป็นอีกหนึ่งกลไกการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว (6) โดยพบว่าตัวชี้วัดการเกิด oxidative stress เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วย chronic heart failure และมีความสัมพันธ์กับการเกิด myocardial dysfunction และความรุนแรงของโรค (7) oxidative stress ที่

เกิดขึ้นมีผลทำลายการทำงานของหัวใจผ่านการทำลายโปรตีนภายในเซลล์และเยื่อหุ้มต่างๆทำให้เกิด necrosis และ apoptosis ตามมา (6) จากหลายปีที่ผ่านๆมามีงานสนับสนุนการวิจัยทาง oxidative stress และหัวใจล้มเหลว ที่ศึกษาตัวชี้วัดการเกิด oxidative stress และ antioxidant enzyme ต่างๆ โดยงานวิจัยของ Christophel และคณะ (2003) พบว่าระดับ NADPH oxidase Activity เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลว (8) และ NADPH oxidase Activity ที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นกลไกการเกิด cardiac hypertrophy และหัวใจล้มเหลวตามมา (9) การเพิ่มขึ้นของ 8-iso-prostaglandin F2 alpha (10) alpha-1 antitrypsin และ fibrinogen (11) และ ischaemia modified albumin (12) ในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลว อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่ถูกอนุมูลอิสระทำลายมากสุดประมาณ 50 - 75% (11) จากการศึกษาในปี 1993 พบว่าอนุมูลอิสระจะทำลายโมเลกุลโปรตีนของกล้ามเนื้อหัวใจ (13) ดังนั้นการศึกษา Protein oxidation จึงมีบทบาทที่สำคัญในการติดตามภาวะ Oxidative stress โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Protein carbonyl (14)

Protein carbonyl (PC) เป็นผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลง Protein side chains จากกระบวนการ Oxidation โดยอนุมูลอิสระ (15) และจากงานวิจัยของ Cristina และคณะ (2008) พบว่า Protein carbonyl เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว (11) อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่าภาวะหัวใจล้มเหลวจะแบ่งระดับความรุนแรงของโรคตามอาการและอาการแสดง และอาการแสดงตามความรุนแรงนี้สามารถใช้เป็นตัวพยากรณ์โรคได้ดี ดังนั้นการศึกษาโดยแบ่งแยกตามระดับความรุนแรงจึงเป็นสิ่งสำคัญ นอกจากนี้แล้วยังมีไม่มีงานศึกษาด้านความสัมพันธ์ของภาวะ oxidative stress กับความรุนแรงของโรคนี้อย่างเด่นชัด ถึงแม้ว่างานวิจัยของ Christophe และคณะ(8) ได้พบความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของโรคกับ NADPH Oxidase Activity แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับ Protein carbonyl ในซีรั่ม กับระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวมาก่อนดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบระดับของ Protein carbonyl ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA) Functional Classification เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพยากรณ์โรคตลอดจนการติดตามการรักษาผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับของ Protein carbonyl ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (Chronic heart failure) ที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA) Functional Classification กับซีรั่มของผู้มีสุขภาพดี

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษา ระดับ Protein carbonyl ในซีรั่มของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง จำนวน 80 ราย ที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA) Functional Classification I-IV ซีรั่มที่นำมาวิเคราะห์ เป็นซีรั่มแช่แข็งที่เหลือจากการใช้ตรวจหาสารบ่งชี้ที่มีการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลที่รับผู้ป่วยเข้ารักษา และทำการตรวจวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับระดับ Protein carbonyl ในซีรั่มของคนปกติ จำนวน 20 ราย ที่มารับการตรวจสุขภาพประจำปีของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐาน: ผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง มีระดับ Protein carbonyl ในซีรั่ม สูงกว่า เมื่อเทียบกับค่าระดับ Protein carbonyl ในซีรั่มของคนสุขภาพดี และระดับ Protein carbonyl ในซีรั่ม จะแปรผันตามระดับความรุนแรงและอาจใช้ ระดับ Protein carbonyl ในการติดตามการรักษาผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรังได้

บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (Chronic heart failure)

ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (Chronic heart failure) คือภาวะที่หัวใจไม่สามารถสูบฉีดเลือดไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายได้เพียงพอ หรือ อาจหมายถึง ภาวะที่หัวใจไม่สามารถคลายตัวหรือขยายตัวเพื่อรองรับเลือดได้ปกติ ทำให้เกิดความดันเลือดในช่องปอดมากขึ้น เกิดการคั่งของเลือดในปอดมากขึ้น ทำให้มีอาการเหนื่อยง่าย และอาจก่อให้เกิดอาการบวมของร่างกายได้

2.1.1 พยาธิสรีรวิทยาของภาวะหัวใจล้มเหลว

การทำงานของหัวใจปกติจะสามารถตอบสนองความต้องการใช้ออกซิเจนของร่างกายที่เพิ่มขึ้นได้โดยการใช้กำลังสำรองของหัวใจ (cardiac reserve) แต่ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวกำลังสำรองของหัวใจลดลงอย่างมาก ใช้ได้พอเฉพาะในขณะพักเท่านั้น ดังนั้นเมื่อเริ่มกิจกรรมจึงมีอาการเหนื่อยล้าและหายใจลำบากเนื่องจากหัวใจไม่สามารถบีบตัวส่งเลือดให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย จึงมีกลไกการชดเชยของร่างกาย (compensatory mechanism) เกิดขึ้น กลไกการชดเชยของร่างกายเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน ที่ไม่เพียงแต่หัวใจเท่านั้น ยังมีผลต่อการไหลเวียนของหลอดเลือดส่วนปลาย กล้ามเนื้อลาย และไต โดยกลไกการชดเชยที่เกิดขึ้นในภาวะหัวใจล้มเหลวมีดังนี้

2.1.1.1 กลไกชดเชยแรก (acute compensatory) โดยเกิดขึ้นภายในเวลาไม่กี่นาที เริ่มจากการทำงานของระบบประสาทซิมพาเธติคจะถูกกระตุ้นทำให้อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้น หลอดเลือดแดงและดำหดตัว และ เพิ่มการบีบตัวของหัวใจ

- ***การเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ (Increased heart rate)*** จึงมีผลเพิ่มปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาทีได้ แต่การชดเชยด้วยการเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจมีข้อจำกัด และอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อหัวใจจากเหตุผล 2 ประการ คือ

1. เมื่อหัวใจเต้นเร็วมาก เวลาของการคลายตัวของหัวใจเพื่อให้เลือดเข้าหัวใจจะสั้นลงเลือดเข้าสู่หัวใจได้น้อย จึงออกจากหัวใจได้น้อยเช่นกัน ดังนั้นปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาทีจึงลดลงแม้อัตราการเต้นจะเพิ่มขึ้น

2. เลือดจะไหลเข้าหลอดเลือดโคโรนารีในช่วงหัวใจคลายตัว นั่นคือ กล้ามเนื้อหัวใจได้รับเลือดไปเลี้ยงในช่วงหัวใจคลายตัว เมื่อระยะเวลาการคลายตัวลดลง เวลาที่กล้ามเนื้อหัวใจจะได้รับเลือดจึงน้อยลงตาม แต่การเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจมีความต้องการใช้ออกซิเจนมากขึ้น ดังนั้นอาจเกิดอันตรายกับกล้ามเนื้อหัวใจได้

- *การเพิ่มปริมาตรเลือดที่หัวใจบีบออกแต่ละครั้ง (Improved stroke volume)* เนื่องจากการกระตุ้นประสาทซิมพาเธติคที่ทำให้หลอดเลือดดำหดตัว จะเพิ่มปริมาตรเลือดที่กลับเข้าสู่หัวใจ ใยกล้ามเนื้อของหัวใจถูกยืดขยายมากขึ้น เกิดหัวใจยืดขยาย (cardiac dilation) และ preload เพิ่มขึ้น การบีบตัวจึงแรงขึ้น ทำให้ปริมาตรเลือดที่หัวใจบีบออกแต่ละครั้ง และปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาทีเพิ่มขึ้น แต่กลไกการชดเชยนี้มีความจำกัด เพราะเมื่อใดที่ใยกล้ามเนื้อหัวใจถูกยืดขยายอย่างมากเกิน การหดตัวจะไม่มีประสิทธิภาพ และการยืดขยายนี้หัวใจต้องการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นมากอาจเกิดภาวะหัวใจขาดเลือดได้แม้ในภาวะที่หลอดเลือดเลี้ยงหัวใจปกติ ซึ่งจะส่งผลทำให้หัวใจบีบตัวได้ลดลงในที่สุด

- *การหดตัวของหลอดเลือดแดง (Arterial vasoconstriction)* จากการหดตัวของหลอดเลือดแดงเนื่องจากการทำงานของระบบประสาทซิมพาเธติค จะช่วยดำรงความดันโลหิตและช่วยเพิ่มการกำซาบเลือดภายใต้ภาวะที่มีปริมาตรเลือดออกจากหัวใจน้อยลง ในขณะเดียวกันจะเพิ่ม afterload ของหัวใจ ซึ่งยิ่งทำให้หัวใจต้องการออกซิเจนมากขึ้น เวนตริเคิลต้องเสียพลังงานเพื่อเอาชนะ afterload จึงทำให้ปริมาตรเลือดที่หัวใจบีบออกลดลง

- *การเพิ่มแรงในการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (Increased myocardial contraction)* ระบบซิมพาเธติคจะกระตุ้นใยกล้ามเนื้อหัวใจให้หดตัวได้มากขึ้น เรียกว่า positive inotropic effect ในหัวใจปกติการกระตุ้นนี้จะช่วยเพิ่มปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาทีได้มาก แต่ในขณะที่กล้ามเนื้อหัวใจอ่อนแอ หัวใจจะไม่สามารถเพิ่มความแรงในการหดตัวได้

2.1.1.2 กลไกการชดเชยที่เกิดทีหลัง (chronic compensatory) โดยการทำงานของระบบเรนิน-แอนจิโอเทนซิน-แอลโดสเตอโรน (rennin-angiotensin-aldosterone system) ทำให้มีการคั่งของน้ำและเกลือ และกล้ามเนื้อหัวใจหนาตัวอย่างผิดปกติ (myocardial hypertrophy) เพื่อเพิ่มปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาที

- *การเก็บน้ำและเกลือ (Sodium and water retention)*

ในภาวะที่ร่างกายมีปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาทีลดลง เลือดไปเลี้ยงไตจะลดลง เกิดการกระตุ้นกลไกเรนิน-แอนจิโอเทนซิน-แอลโดสเตอโรน โดยเริ่มที่รีเฟล็กซ์ตัวรับแรงดันในหลอดเลือดแดงรีนัล (renal artery) ถูกกระตุ้นจากความดันในหลอดเลือดที่ลดลง ทำให้มีการปล่อยเอนไซม์เรนินออกมาในกระแสเลือด เรนินทำปฏิกิริยากับแอนจิโอเทนซินซึ่งเป็นพลาสมาโปรตีนเกิดเป็นแอนจิโอเทนซิน 1 และสารนี้ถูกแอนจิโอเทนซิน 2 ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดแดงหดตัวที่แรงมาก นอกจากนี้แอนจิโอเทนซิน 2 ยังทำให้มีการหลั่งนอร์อิพิเนฟฟริน (norepinephrine) จากปลายประสาทซิมพาเธติคและกระตุ้นอะดรีนัลเมดัลลา (adrenal medulla) ให้หลังแอลโดสเตอโรน (aldosterone) มีผลทำให้มีการดูดน้ำและโซเดียมกลับมากขึ้น และเพิ่ม preload

- *การหนาตัวอย่างผิดปกติของกล้ามเนื้อหัวใจ (Myocardial hypertrophy)*

กลไกชดเชยสุดท้าย คือ การหนาตัว โตผิดปกติของกล้ามเนื้อหัวใจ โดยอาจมีหรือไม่มีการยืดขยาย (dilate) ของหัวใจร่วมด้วย

แม้ว่ากลไกชดเชยจะช่วยเพิ่มปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาทีได้ในเบื้องต้น แต่การทำให้หลอดเลือดทั่งร่างกายหดตัว มีผลทำให้กล้ามเนื้อหัวใจต้องทำงานหนักเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเกิดการทำลายหน้าที่การบีบตัวของหัวใจในที่สุด และเกิด decompensate heart failure ในที่สุด

ภาวะหัวใจล้มเหลวที่ไม่สามารถชดเชยได้ (decompensate heart disease) เป็นภาวะที่หัวใจไม่สามารถชดเชยได้ เวนตริเคิลจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เรียกว่า remodeling มากขึ้นเรื่อยๆ เชื่อว่า remodeling เกิดจากการทำงานอย่างต่อเนื่องของระบบนิวโรฮอร์โมนที่ถูกกระตุ้นให้หลั่งออกมาจากกลไกชดเชยของร่างกาย ร่างกาย ทำให้การยืดขยายใยกล้ามเนื้อหัวใจจากการมีปริมาตรเลือดในหัวใจมากจะทำให้มีแรงกดดันหรือความเครียดต่อผนังเวนตริเคิล เพื่อลดแรงดันนี้เซลล์หัวใจจะหนาตัวอย่างผิดปกติทำให้ผนังของหัวใจหนาขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มแรงการบีบตัวของหัวใจเพื่อลดปริมาตรเลือดที่อยู่ภายใน แต่เมื่อกลไกนี้เกิดนานขึ้น โครงสร้าง หน้าที่และลักษณะยีนของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะเปลี่ยนไป เมื่อเซลล์เปลี่ยน การบีบตัวจะไม่มีประสิทธิภาพ แรงกดดันในผนังหัวใจจึงยังเพิ่มขึ้น และเพิ่มความต้องการใช้ออกซิเจน ซึ่งเสริมให้หัวใจทำหน้าที่ผิดปกติมากขึ้น นอกจากนี้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่มียีนผิดปกติจะตายก่อนกำหนด และเร่งกระบวนการ

apoptosis (โปรแกรมการตายของเซลล์) ซึ่งจะมีผลต่อเซลล์กล้ามเนื้อทั้งหัวใจ การทำงานของหัวใจเลวร้ายมากขึ้น

2.1.3 อาการแสดงทางคลินิกของภาวะหัวใจล้มเหลว

อาการของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวคือ ผิวหนังอาจมีการซีด เขียวคล้ำ เนื่องจากการไหลเวียนไม่ดี หายใจลำบากเมื่อออกกำลังหรือนอนราบ เหนื่อยล้า ทำกิจกรรมได้น้อยลง การบวมตามแขนและขาแต่อาการแสดงในผู้สูงอายุอาจมีอาการปวดเมื่อย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ ร่วมด้วย (4)

2.1.4 ชนิดของภาวะหัวใจล้มเหลว เนื่องจากภาวะหัวใจล้มเหลวแต่ละประเภทจะมีลักษณะปรากฏทางคลินิกคล้ายๆ กัน แต่เพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย และรักษาโรค ได้มีการจำแนกประเภทของภาวะหัวใจล้มเหลวแตกต่างกันไปเช่น จำแนกเป็น ภาวะหัวใจล้มเหลวในการบีบตัวและคลายตัว (Systolic and Diastolic heart failure) เป็นการจำแนกเพื่อประโยชน์ในการบำบัดรักษาแต่ไม่ได้ช่วยในการแยกประเภทของภาวะหัวใจล้มเหลว หัวใจ(เวนตริเคิล)ซ้ายหรือขวาล้มเหลว (Left ventricular and Right ventricular failure) แบ่งตามลักษณะอาการและอาการแสดงที่เด่นทำให้เกิดความเข้าใจลักษณะทางคลินิก ภาวะหัวใจล้มเหลวเฉียบพลันและเรื้อรัง (Acute and Chronic heart failure) โดยการศึกษาได้ศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเท่านั้น โดยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง จะมีอาการที่จะค่อยๆ เกิดขึ้น เสมือนมีอาการไม่มากหรือไม่รุนแรง แต่ร่างกายมีกลไกลชดเชยเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความสามารถในการหดตัวของหัวใจลดลง มีการทำงานของนิวโรฮอร์โมนอย่างต่อเนื่อง มีการเพิ่มของ preload และ afterload และเกิด cardiac remodeling ในที่สุด (4,7,16)

2.1.5 ระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

การแบ่งระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวมักใช้อาการและอาการแสดง และนิยมใช้การแบ่งของ New York Heart Association (NYHA) ซึ่งใช้ความสามารถในการทำงานและอาการแสดงทางคลินิก แบ่งไว้ 4 ระดับดังนี้

Class I ผู้ป่วยโรคหัวใจซึ่งสามารถทำกิจวัตรประจำวันได้ตามปกติโดยไม่เหนื่อยไม่มีใจสั่น ไม่มีอาการอ่อนแรงและไม่มีเจ็บหน้าอกแบบ angina

Class II ผู้ป่วยโรคหัวใจซึ่งอยู่เฉยๆ จะไม่เหนื่อยแต่ถ้าออกแรงหรือทำกิจวัตรประจำวันที่หนักปานกลางถึงมากจะมีอาการเหนื่อย หรือ ใจสั่น หรือ มีอาการอ่อนแรง หรือมีอาการเจ็บหน้าอกแบบ angina

Class III ผู้ป่วยโรคหัวใจซึ่งอยู่เฉยๆ จะไม่เหนื่อยแต่ถ้าออกแรงหรือทำกิจวัตรประจำวันที่เบาๆ เช่น อาบน้ำ เดินภายในบ้านหรือนอกบ้านในระยะสั้นๆ จะมีอาการเหนื่อย หรือ ใจสั่น หรือ มีอาการอ่อนแรง หรือมีอาการเจ็บหน้าอกแบบ angina

Class IV ผู้ป่วยโรคหัวใจซึ่งอยู่เฉยๆ จะมีอาการเหนื่อย หรือ ใจสั่น หรือ มีอาการอ่อนแรง หรือมีอาการเจ็บหน้าอกแบบ angina และถ้าออกแรงหรือทำกิจวัตรประจำวันที่เบาๆ อาการดังกล่าวข้างต้นก็จะเพิ่มมากขึ้น

2.1.6 การประเมินผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว

2.1.6.1 การตรวจร่างกาย

- การประเมินลักษณะทั่วไป ค้นหาอาการของภาวะหัวใจล้มเหลว เช่น หายใจลำบากขณะพัก เขียวคล้ำ ผอมมาก (cachexia) ซึ่งแสดงถึงการเจ็บป่วยมานาน
- การวัดสัญญาณชีพ ให้ความสนใจกับชีพจรที่เร็ว จังหวะผิดปกติ อาการแสดงของความดันโลหิตต่ำเมื่อเปลี่ยนท่า การตรวจชีพจร อาจพบหัวใจเต้นเร็ว ความเบาแรงผิดปกติ
- วัดความอิ่มตัวของออกซิเจน เพื่อค้นหาภาวะขาดออกซิเจน
- การประเมินการรับรู้ เวลา สถานที่ของผู้ป่วย การทดสอบตรวจสภาพจิตอย่างง่าย โดยเฉพาะผู้สูงอายุ จะช่วยให้พยาบาลได้ข้อมูลได้แม่นตรงกว่าการสอบถาม
- ตรวจหัวใจด้วยการคลำบริเวณหน้าอก หาตำแหน่งของคลื่นชีพจรที่ยอดหัวใจ (apical pulse) เพื่อประเมินขนาดของหัวใจ ฟังเสียงหัวใจ สังเกตเสียง 3 และเสียง 4 ของหัวใจ
- ตรวจปอด ค้นหาเสียง crepitation เสียงวี๊ด เสียง crepitation ในช่วงท้ายของการหายใจเข้าและยังคงได้ยินขณะไอ แสดงถึงภาวะหัวใจล้มเหลว
- ตรวจหลอดเลือดดำจูกูลาร์ การที่ระดับหลอดเลือดดำสูงกว่า 4 เซนติเมตร จาก sternal angle แสดงถึงเวนตริเคิลขวาล้มเหลว
- วัดรอบท้อง ตรวจตับและ hepatojular reflux การมีน้ำในช่องท้องบ่งบอกว่าน้ำในร่างกายมากกว่าปกติถึง 10 ลิตร

- ประเมินอาการบวมบริเวณส่วนต่ำของร่างกาย ให้ประเมินบริเวณด้านหน้ากระดูกหน้าแข้ง หรือข้อเท้าในผู้ที่เดินไปมา และในผู้ที่นอนบนเตียงให้ประเมินที่บริเวณกระดูกก้นกบ อาการบวมบอกถึงความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลว

- การชั่งน้ำหนักจะเป็นการบอกสภาพการคั่งน้ำของร่างกายเป็นตัวบ่งชี้การมีน้ำเกินและเสียน้ำที่ดี จึงจะต้องชั่งและบันทึกไว้ทุกครั้ง

2.1.6.2 การประเมินทางห้องปฏิบัติการ

- การตรวจอิเลคโทรลัยท์ อิเลคโทรลัยท์ที่ติดตามเป็นประจำได้แก่ โซเดียม โปแตสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และคลอไรด์ มักพบการเสียสมดุลของอิเลคโทรลัยท์หรือภาวะโปแตสเซียมต่ำ

- การตรวจยูเรียในโตรเจนและครีอะตินินในเลือด และ creatinine clearance เพื่อประเมินการทำหน้าที่ของไต ว่ามีเลือดไปเลี้ยงพอหรือไม่

- การตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะ จะให้สภาพโปรตีนในปัสสาวะและความถ่วงจำเพาะที่สูงขึ้น ซึ่งอาจแสดงถึงการทำหน้าที่ของไตที่เป็นผลจากภาวะหัวใจล้มเหลว

- ฮีโมโกลบินและฮีมาโตคริท มักทำเพื่อวิเคราะห์ภาวะโลหิตจางที่อาจเป็นสาเหตุเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวหรือทำให้ภาวะหัวใจล้มเหลวเลวลง

- การตรวจความดันก๊าซในเลือดแดง จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับภาวะขาดออกซิเจนอาจพบภาวะด่างจากการหายใจที่มักเกิดร่วมกับการระบายอากาศที่มากเกินไป และอาจจะพบภาวะกรดจากการหายใจเนื่องจากมีการคั่งของคาร์บอนไดออกไซด์ การมีภาวะกรดจากเมตาบอลิสมแสดงถึงการมีกรดแลคติคในร่างกายมาก

- การตรวจเอนไซม์ของตับและบิลลิลูบิน เอนไซม์แอสพาร์เตทอะมิโนทรานสเฟอเรสอะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส (AST และ ALT) จะถูกปล่อยออกมาเมื่อตับถูกทำลาย จึงช่วยบอกการล้มเหลวของตับ และการขับบิลลิลูบินออกจากร่างกาย

- การตรวจเวลาของโพรธรอมบิน (prothrombin time; PT) เวลาของโพรธรอมบินที่เพิ่มขึ้นเป็นอาการแสดงแรกๆ ของการมีตับโตจากการคั่งเลือด

- อัลบูมินในเลือด อัลบูมินในเลือดที่ต่ำลงแสดงถึงภาวะตับแข็งเนื่องจากการคั่งเลือดที่เกิดอย่างเรื้อรัง

- การตรวจฮอร์โมนธัยรอกซิน และ thyroid stimulating hormone มักตรวจในผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี ผู้ที่มี atrial fibrillation และผู้ที่มีประวัติเป็นโรคของต่อมธัยรอยด์ ซึ่งภาวะหัวใจล้มเหลวอาจจะเกิดจากการทำงานมากหรือน้อยกว่าปกติของต่อมธัยรอยด์(4)

- การตรวจฮอร์โมน BNP ค่า BNP ที่สูงแสดงถึงการมีภาวะหัวใจล้มเหลว และถ้าหากค่านี้สูงขึ้นร่วมกับอาการหายใจลำบากและอาการบวมจะช่วยให้วินิจฉัยที่แม่นยำขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ค่านี้ในการติดตามการบำบัดการรักษาภาวะหัวใจล้มเหลวด้วย (4,17-20)

2.1.6.3 การตรวจเพื่อการวินิจฉัยอื่นๆ

- การเอกซเรย์ จะทำในผู้ป่วยทุกคนมีประโยชน์ในการวินิจฉัยเวนตริเคิลซ้ายล้มเหลวซึ่งลักษณะเงาหัวใจจะมีขนาดใหญ่ แสดงถึงการมีการหนาตัวอย่างผิดปกติของหัวใจหรือมีการยืดขยายแต่ในผู้ที่เป็นหัวใจล้มเหลวในการคลายตัว (diastolic heart failure) ขนาดของหัวใจอาจปกติได้การเอกซเรย์จะช่วยในการวินิจฉัยการคั่งเลือดของปอดและการบวมของปอด น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion) ซึ่งมักจะเกิดในผู้ป่วยที่เวนตริเคิลทั้งสองซีกล้มเหลว

- Echocardiogram เป็นการตรวจที่เป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยภาวะหัวใจล้มเหลวมากที่สุด การใช้ two-dimensional echocardiogram (2D) ตรวจผ่านทรงอกร่วมกับ Doppler flow study จะช่วยในการวิเคราะห์ได้ว่าความผิดปกติของการบีบตัวหรือการคลายตัวของหัวใจ ประเมินหน้าที่ของเวนตริเคิล วัดความดัน การคลายตัวและการยืดหยุ่นของเวนตรอเคิล นอกจากนี้ยังบอกขนาดของห้องหัวใจ และช่วยในการประเมินโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด โรคลิ้นหัวใจ โรคของเยื่อบุและเยื้อหุ้มหัวใจ

- EKG หรือการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ จะให้ข้อมูลของการมีเวนตริเคิลหนาตัวอย่างผิดปกติ หัวใจเต้นผิดจังหวะ หัวใจขาดเลือดในระดับต่างๆ ตั้งแต่กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด กล้ามเนื้อหัวใจได้รับบาดเจ็บจนถึงกล้ามเนื้อหัวใจตาย

- Radionuclide studies เช่น thallium imaging หรือ technetium pyrophosphate scanning จะบอกสาเหตุของภาวะหัวใจล้มเหลวและลักษณะการเคลื่อนไหวของหัวใจ

- Pulmonary artery catheter เป็นการตรวจที่สามารถให้ข้อมูลในเอเตรียมความดันในหลอดเลือดพุลโมนารีย์และ pulmonary artery wedge pressure ซึ่งช่วยในการประเมิน

หน้าที่ของหัวใจ ปริมาตรน้ำในระบบไหลเวียน มักใช้การตรวจนี้ในการวินิจฉัยและเป็นแนวทางในการจัดการบำบัดภาวะหัวใจล้มเหลว(4)

2.1.8 ภาวะแทรกซ้อนของภาวะหัวใจล้มเหลว

ภาวะแทรกซ้อนของภาวะหัวใจล้มเหลวที่สำคัญคือ ช็อคจากหัวใจ (cardiogenic shock) และภาวะปอดบวมน้ำอย่างเฉียบพลัน (acute pulmonary edema)

1.1.8.1 ช็อคจากหัวใจ ในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว จะสังเกตภาวะช็อคจากหัวใจได้จากอาการที่เลวลงของผู้ป่วย และอาการที่บ่งบอกว่ามีการกำซาบของเลือดไปยังอวัยวะสำคัญต่างๆ ลดลง เช่น มีปริมาตรปัสสาวะที่ลดลง ระดับความรู้สึกตัวที่ลดลง การวินิจฉัยช็อคจากหัวใจในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว จะต้องประเมินภาวะปริมาตรเลือดพร่องของผู้ป่วยที่อาจเกิดจากการใช้ยาปัสสาวะที่มากเกิน หรือเกิดจากการซึมผ่านสารเหลวออกไปอยู่นอกหลอดเลือดอย่างมากเกิน การบำบัดมักใช้ยาเพิ่มการบีบตัวของหัวใจ เช่น โดบูทามีน โดพามีน และเพื่อลดภาวะด้านหลังของหัวใจ อาจต้องใช้ยาขยายหลอดเลือด เช่น ไนโตรพรัสไซด์ ซึ่งการใช้ยาทั้งสองชนิดร่วมกันต้องติดตามสัญญาณชีพ ปริมาตรปัสสาวะ และอาการทั่วไปอย่างใกล้ชิด อาจจะมีการติดตามภาวะฮีโมไดนามิคของผู้ป่วย โดยติดตามความดันในหลอดเลือดแดง วัด pulmonary artery wedge pressure และปริมาตรเลือดที่หัวใจส่งออกต่อนาที

1.1.8.2 ภาวะปอดบวมน้ำเฉียบพลัน ภาวะปอดบวมน้ำเฉียบพลันแสดงถึงการมีการคั่งเลือดในปอดที่รุนแรง เกิดเมื่อความดันในหลอดเลือดฝอยของปอดสูงขึ้นเกินกว่าความดันที่รักษาน้ำไว้ในหลอดเลือด สารน้ำจึงออกไปอยู่ในถุงลมปอด ลดบริเวณที่ใช้แลกเปลี่ยนก๊าซของปอด มักพบปอดบวมน้ำในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเพราะหัวใจรับภาระมานานเกิน แต่อาจพบเป็นอาการเริ่มแรกของผู้ป่วยกล้ามเนื้อหัวใจตาย ที่ทำให้ความดันในหลอดเลือดพุลโมนารีย์สูงอย่างทันทีทันใด(4)

2.2 ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (Oxidative stress)

คือ ภาวะที่มีความไม่สมดุลของการสร้างอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระหรือเกิดจากการที่มีสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ในสภาวะปกติร่างกายจะมีกระบวนการควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้มากเกินไปโดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านการออกซิเดชั่น (antioxidants) หลายชนิด ทั้งที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กลูตาไทโอน (glutathione, GSH) เอนไซม์ glutathione peroxidase หรือได้รับจากภายนอก เช่น วิตามินอี วิตามินซี หรือเบต้า

แคโรทีน เป็นต้น หากกระบวนการเหล่านี้ต่ำลง หรือเสียไป หรือมีภาวะที่ทำให้อนุมูลอิสระสูงขึ้นมากในร่างกาย จะทำให้สมดุลเสียไป จากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ โดยการทำลายดังกล่าวจัดเป็น oxidative damage ซึ่งโมเลกุลเป้าหมายที่เกิด oxidative damage จะแตกต่างกันไปขึ้นกับลักษณะของเซลล์ ชนิดและความรุนแรงของสภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้น

2.2.1 อนุมูลอิสระ (Free radicals)

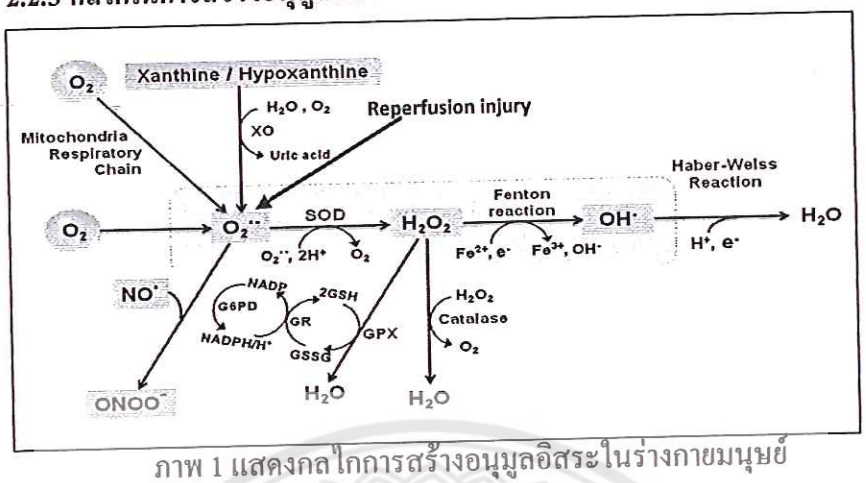
คืออะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร เนื่องจากโครงสร้างของมันมีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่ (unpaired electron) อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอนอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ $10^{-3} - 10^{-10}$ วินาที จัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำให้อนุมูลอิสระสามารถไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ เพื่อที่จะดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลนั้นมาให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น โมเลกุลที่อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาด้วยนั้นอาจเป็นกรดไขมัน กรดนิวคลิอิกหรือโปรตีน ซึ่งทำให้เซลล์ภายในร่างกายถูกทำลายหรือได้รับบาดเจ็บ แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างหรือหน้าที่ของเซลล์เหล่านั้น (cellular dysfunction) จนกลายเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ

2.2.2 ชนิดของอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ดังนี้

2.2.2.1 อนุมูลอิสระของออกซิเจน (Reactive oxygen species; ROS) คือ Active forms ของออกซิเจนซึ่งเกิดขึ้น เนื่องจากกระบวนการเมแทบอลึซึมของออกซิเจน เช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxides (H_2O_2), hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) เป็นต้น

2.2.2.2 อนุมูลอิสระของไนโตรเจน (Reactive nitrogen species ; RNS) คือ Active forms ของไนโตรเจนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจน ได้แก่ nitric oxidide (NO), peroxynitrite ($ONOO^-$) และ nitrogen dioxide ($NO_2^{\cdot}$) เป็นต้น

2.2.3 กลไกในการสร้างอนุมูลอิสระ



ภาพ 1 แสดงกลไกการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์

ดัดแปลงมาจาก : เสาวนีย์ เหลืองอร่าม.(2552). เอกสารประกอบการสอนภาวะเครียดจากการออกซิเดชั่นกับการออกกำลังกาย.

ในสิ่งมีชีวิตมีหลายปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกายได้ เช่น กระบวนการสร้างพลังงานซึ่งเกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย การเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวแรกขึ้นคือ superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) ซึ่งเกิดขึ้นจากออกซิเจนรับอิเล็กตรอนเข้ามา 1 ตัว ดังสมการ

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-} \qquad (1)$$

ภายในเซลล์มีเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ทำหน้าที่เปลี่ยน $O_2^{\cdot-}$ โดยปฏิกิริยาดิสมิวเทชั่น (dismutation) ได้เป็น H_2O_2

$$2\,O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{(SOD)} O_2 + H_2O_2 \qquad (2)$$

H_2O_2 เป็นตัวออกซิไดซ์ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต เพราะสามารถทำให้เกิด hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมาก เนื่องจากโมเลกุลของ H_2O_2 ไม่มีประจุและขั้วต่ำจึงทำให้ง่ายต่อการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นไขมันเป็นส่วนใหญ่ (hydrophobic) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ H_2O_2 หลุดลอดออกจากไมโตครอนเดรีย และแพร่กระจายไปยังเซลล์ต่างๆ ได้ง่ายซึ่งเป็นอันตรายต่อชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ไม่ว่าจะเป็นดีเอ็นเอ โปรตีน หรือไขมัน ในภาวะปกติ H_2O_2 จะถูกเอนไซม์ catalase (CAT) เปลี่ยนเป็นน้ำและออกซิเจนซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{(CAT)} 2H_2O + O_2 \qquad (3)$$

ในปฏิกิริยาฮาร์เบอร์-ไวส์ (Haber – Weiss Reaction) โลหะ เช่น ferric ion (Fe^{3+}) จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาระหว่าง H_2O_2 กับ $O_2^{\cdot-}$ เกิดเป็น $OH^{\cdot}$ ขึ้น

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe(III)/Cu(II)} O_2 + OH^- + OH^{\cdot} \qquad (4)$$

ส่วนในปฏิกิริยาเฟนตอน (Fenton reaction) เป็นปฏิกิริยาการเกิด $OH^{\cdot}$ เช่นกัน โดยเริ่มจาก Fe^{3+} ถูกรีดิวซ์โดย $O_2^{\cdot-}$ เกิดเป็น Fe^{2+} และออกซิเจน จากนั้น Fe^{2+} จะเกิดปฏิกิริยาต่อกับ H_2O_2 ได้เป็น OH^- $OH^{\cdot}$ และ Fe^{3+} อย่างละหนึ่งโมเลกุล จะเห็นว่าปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดต่อไปเนื่องจากมี Fe^{3+} ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาแรกเกิดขึ้นด้วย

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad (5)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot} \qquad (6)$$

2.2.4 การทำลายชีวโมเลกุล (biomolecules) ของอนุมูลอิสระ

2.2.4.1 การทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) อนุมูลอิสระ เช่น $OH^{\cdot}$ สามารถทำลายกรดนิวคลีอิกของเซลล์ได้ โดยการทำลายจะสะสมเพิ่มมากขึ้นตามอายุของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงแสดงอาการของโรคเมื่ออายุมากขึ้น พบว่า $OH^{\cdot}$ มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในผู้ที่เป็นมะเร็ง ซึ่งเกิดจาก DNA ถูกทำลาย โดย $OH^{\cdot}$ จะเข้าจับกับน้ำตาลของเบส ทำให้การสร้างสาย DNA หยุดลง เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบส ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์ (mutation) และโรคมะเร็ง

2.2.4.2 การทำลายโปรตีน (protein damage) โปรตีนสามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่และการทำงานของโปรตีนบางตัวยังเกี่ยวข้องกับ transition metal เช่น Fe^{3+} เป็นต้น กรดอะมิโนพวก tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine, methionine และ cystine จะถูกทำลายได้ง่ายด้วยอนุมูลอิสระ ทำให้คุณสมบัติและโครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป เกิดการแตกหัก (fragmentation) และเกาะกลุ่มรวมตัวกัน (aggregation) ทำให้โปรตีนถูกทำลายด้วย proteolytic enzyme ซึ่งทำหน้าที่ทำลายโปรตีนที่หมดอายุการใช้งานหรือเสื่อมสภาพแล้ว ดังนั้นโปรตีนที่ถูกอนุมูลอิสระทำลายจึงมีอายุการทำงานสั้นซึ่งส่งผลต่อกระบวนการเมแทบอลึซึมต่างๆ ที่มีโปรตีนเกี่ยวข้อง ซึ่งโปรตีนที่ถูกอนุมูลอิสระทำลายคือ protein carbonyl

2.2.4.3 การทำลายไขมัน (lipids damage) อนุมูลอิสระเข้าทำลายเซลล์โดยทำให้เกิดกระบวนการ peroxidation ของไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติในการเป็นของไหล (fluidity) และความต้านทานต่อกระแสไฟฟ้าลดลง (electrical resistance) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ phospholipids ที่เยื่อหุ้มเซลล์ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้เอนไซม์ (membrane-bound enzyme) เข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยากขึ้น ส่งผลให้กระบวนการทำงานภายในเซลล์เปลี่ยนแปลง เนื่องจากขาดเอนไซม์ในการทำงาน ในกระบวนการ lipid peroxidation จะมีสารกลุ่ม aldehyde เกิดขึ้นคือ malondialdehyde (MDA) ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ (21)

2.2.5 ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นกับการเกิดโรค

จากการศึกษาพบว่าโรคบางโรคมีสาเหตุมาจากการทำลายโดยกระบวนการออกซิเดชั่นของดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน แต่ในบางโรคภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น ก็ไม่ได้เป็นสาเหตุเบื้องต้น แต่กลับเป็นผลสืบเนื่องจากกระบวนการเกิดโรค และส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ ดังเช่น การติดเชื้อ (infection) การบาดเจ็บ (trauma) การได้รับสารพิษ (toxins) หรือภาวะอื่นๆ มักเป็นต้นเหตุของการสร้างและสะสมของอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคต่อไป โดยภาวะที่ไม่สมดุลของปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และรีดักชั่นในร่างกาย มีผลต่อการปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีนของโรคและภาวะต่างๆ โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) ส่วนใหญ่มักสืบเนื่องมาจากโรคที่ผนังหลอดเลือดแดงแข็งตัว (artherosclerosis) ซึ่งเป็นภาวะที่ผนังหลอดเลือดมีความหนาเพิ่มขึ้น โดยที่ภาวะเส้นเลือดอุดตันในสมอง (stroke) และภาวะหัวใจขาดเลือด เกิดขึ้นได้เมื่อหลอดเลือดมีการอุดตันอย่างสมบูรณ์ ภาวะผนังหลอดเลือดแดงแข็งตัว เริ่มต้นจากการเคลื่อนย้ายของ monocytes เข้าไปในหลอดเลือดโดยการกระตุ้นต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของการทำลายหลอดเลือด (endothelium injury) เช่นการทำลายทางกลศาสตร์จากภาวะความดันโลหิตสูง การติดเชื้อไวรัส การได้รับสารพิษ เช่น ควันบุหรี่ การสะสมของสารบางอย่าง เช่น กลูโคส โคเลสเตอรอล หรือ homocysteine Atherosclerotic lesions เริ่มที่มีการสะสมของแถบไขมันที่เรียกว่า fatty streak ซึ่งเกิดมาจากการรวมตัวเป็นกลุ่มของ foam cells ในผนังหลอดเลือด โดย foam cells นี้ประกอบไปด้วย LDL cholesterol ที่เกิดการออกซิไดส์ แล้วถูกจับกินโดย macrophages ซึ่งก็คือ monocytes ที่เข้ามาอยู่ในผนังหลอดเลือดตอนแรก จากการทดลองพบว่า macrophages นี้มีตัวรับที่สามารถจดจำและจับ oxidized LDL ไว้ได้ ดังนั้นจึงจัดว่า macrophages เหล่านี้เป็นตัวตั้งต้น (precursors) ของการสร้างแผ่นเคลือบหลอดเลือดที่ทำให้เกิดหลอดเลือดแดงแข็ง ตามมา (22-23) จากการศึกษาผลกระทบของกระบวนการออกซิเดชั่น ที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) นั้นพบว่าโปรตีนเป็นเป้าหมายหลักของการโดนทำลายจากอนุมูล

อิสระซึ่งมีการทำลายมากสุดประมาณ 50 - 75% (11) เนื่องจากระบบโดยรวมของร่างกายมีองค์ประกอบของโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ เมื่อโปรตีนถูกทำลายจะส่งผลต่อการทำงานของตัวรับโปรตีน เอนไซม์ และตัวโปรตีนขนส่ง นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้เกิดความเสียหายแก่สารชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น การยับยั้งการซ่อมแซมของดีเอ็นเอ ความสามารถที่ลดลงในการถอดรหัสและการจำลองของดีเอ็น เป็นต้น (19) ซึ่งปฏิกิริยาเคมีที่เกิดจากการการโจมตีของ reactive oxygen species (ROS) บนโปรตีนจะทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระจากกรดอะมิโน แล้วเกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนระหว่างกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน โดยสามารถนำเอาหลักการนี้มาใช้เพื่อประเมินระดับของการเกิดความเสียหายของโปรตีนจากภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นได้ ตัวอย่างของตัวบ่งชี้ในการประเมินนี้ ได้แก่ Protein carbonyl (24) และ ischemia Modified Albumin เป็นต้น

2.3. Protein carbonyl

คือ protein carbonyl เป็นโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยอนุมูลอิสระ ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือบริเวณ side chain ของกรดอะมิโน proline, lysine, arginine, และ threonine ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัวจากการม้วนพับ (unfolding), เกิดร่างแห (cross linking), และแตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (fragmentation) (14) เมื่อเกิดภาวะ oxidative stress ระดับของ protein carbonyl จะเพิ่มสูงขึ้นและไม่คงที่ พบได้เร็วในกระแสเลือดและคงอยู่ได้นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าอื่นๆ ที่เกิดในภาวะ oxidative stress จึงนิยมใช้ protein carbonyl เป็น biomarker ของการตรวจภาวะ protein oxidation (25)

จากการศึกษาของ Pantke และคณะในปี 1999 ซึ่งศึกษาระดับของ oxidized proteins ในผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดเส้นเลือดหัวใจ coronary พบว่า มีระดับของ Protein carbonyls ในซีรั่มมนุษย์สูงขึ้น และมีความสัมพันธ์กันกับ oxidative stress markers อื่นเช่น malondialdehyde (MDA) และ oxidized glutathione (25) ทำให้เห็นประโยชน์ของการตรวจวัด protein carbonyls และนำมาใช้เป็น marker ในทางการแพทย์ได้ ซึ่งในภายหลังได้มีการสนับสนุนแนวคิดนี้ ด้วยผลการการศึกษาของ Mutlu-Turkoglu และคณะในปี 2005 พบว่าระดับของ protein carbonyls ว่ามีระดับเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วย coronary artery diseases (26) การศึกษาของ Cristina Banfi และคณะในปี ค.ศ. 2008 เกี่ยวกับระดับของ Protein carbonyl ในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว พบว่าระดับของ protein carbonyl เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว (11)

บทที่ 3: วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การคัดเลือกตัวอย่าง

กลุ่มผู้มีสุขภาพดี

จำนวน 20 ราย ไม่กำหนดเพศและวัย

<u>เกณฑ์การคัดเข้า</u>

- ECG ปกติ ไม่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง หรือโรคหัวใจ โรคมะเร็ง
- ไม่รับประทานอาหารเสริมหรือยาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามิน ซี วิตามิน อี ภายในระยะเวลา 12 เดือน ก่อนเข้าร่วมการวิจัย โดยพิจารณาข้อมูลจากแบบสอบถามคัดกรองผู้มีสุขภาพดี

กลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง (Chronic heart failure)

จำนวน 80 ราย โดยแบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA) Functional Classification I-IV จำนวน Class ละ 20 ราย โดยไม่กำหนดเพศ และวัย

<u>เกณฑ์การคัดเข้า</u>

- ผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจและรักษาในโรงพยาบาลพุทธชินราชและได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง
- ventricular ejection fraction $\leq$ 40%

<u>เกณฑ์การคัดออก</u>

- การทำงานของตับผิดปกติ โดยมีค่า liver function test อยู่นอกช่วงปกติ

Alanine aminotransferase (ALT, SGPT)	ค่าปกติ	7 – 41 U/L
Aspartate aminotransferase (AST, SGOT)	ค่าปกติ	12 – 38 U/L
Total Bilirubin	ค่าปกติ	0.3 – 1.3 mg/dL
Direct Bilirubin	ค่าปกติ	0.1 – 0.4 mg/dL

- การทำงานของไตผิดปกติ โดยมีค่า renal function test อยู่นอกช่วงปกติ

Serum creatinine	ค่าปกติ	0.6 – 1.6 mg/dL
Blood urea nitrogen (BUN)	ค่าปกติ	8 – 23 mg/dL

- เป็นเบาหวาน
- เป็นมะเร็ง
- ได้รับการผ่าตัดภายในระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน (11)

3.2 การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

กลุ่มผู้มีสุขภาพดี

ซีรั่มได้จากเลือดของผู้มีสุขภาพดีที่แบ่งเก็บด้วยปริมาตร 3 มิลลิลิตรจากผู้มีสุขภาพดี จำนวน 20 ราย และเก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

กลุ่มผู้ป่วย Chronic heart failure

ซีรั่มของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยภาวะ Chronic heart failure จำนวน 80 ราย ที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart association (NYHA) และเหลือจากการส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกของโรงพยาบาล เก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

3.3 การควบคุมคุณภาพก่อนวิเคราะห์ (Pre-analytical Quality Control)

Protein carbonyl

- การทดสอบ Linearity จะทำการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Protein carbonyl โดยนำสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน HUMATROL P (HUMAN GmbH Wiesbaden D-65205 lot # P/21) ที่ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 6 ค่าในอัตราส่วนสารควบคุมคุณภาพต่อน้ำกลั่นดังนี้ 0:100, 20:80, 40:60, 60:40, 80;20, 100:0 และเนื่องจากความเข้มข้นโปรตีนรวมของ HUMATROL P มีค่า 73.9 mg/ml ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดของการวิเคราะห์จึงต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นไม่เกิน 10 mg/ml จากนั้นนำมาแทนสิ่งส่งตรวจจริงในการวิเคราะห์หาปริมาณ protein carbonyl content ด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH assay นำผลการวิเคราะห์ protein carbonyl content มาเขียนกราฟเส้นตรงเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน HUMATROL P ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วยการคำนวณหาค่า correlation coefficient (r^2)

- Within - run precision จะทำการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Protein carbonyl โดยใช้สารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน HUMATROL (HUMAN GmbH Wiesbaden D-65205 lot # P/021) โดยค่าความเข้มข้นโปรตีนรวมของ HUMATROL P มีค่า 73.9 mg/ml ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นไม่เกินความเข้มข้น 10 mg/ml จำนวน 15 ครั้งด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH assay ภายในวันเดียว แล้วนำผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ไปหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) จากสูตร

$$\%CV = \frac{S.D}{Mean} \times 100$$

สำนักหอสมุด
1.6343491
๒ - ส.ค. ๒๕๕๖

- Between – day precision จะทำการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Protein carbonyl โดยใช้สารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน HUMATROL (HUMAN GmbH Wiesbaden D-65205 lot # P/019)โดยค่าความเข้มข้นโปรตีนรวมของ HUMATROL P มีค่า 73.9 mg/ml ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นไม่เกินความเข้มข้น 10mg/ml จำนวน 3 ครั้งด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH assay ทำการวิเคราะห์เป็นระยะเวลา 5 วัน แล้วนำผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ไปหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) จากสูตร

$$\%CV = \frac{S.D}{Mean} \times 100$$

3.4.การตรวจวัดความเข้มข้นของ Protein carbonyl

Protein carbonyl

นำซีรั่มของผู้ป่วย 50 µl มาเจือจางกับ phosphate-buffered saline (PBS) 450 µl (เจือจาง 10 เท่า เนื่องจากวิธีที่นำมาวิเคราะห์นั้นจะวิเคราะห์ค่า protein carbonyl content ได้ดีที่ความเข้มข้นไม่เกิน 10 mg/ml) เตรียมหลอดทดลองเติมสารละลาย DNPH 800 µl ในหลอด S สำหรับหลอดตัวอย่าง และเติม 2.5 M HCl 800 µl ในหลอด C สำหรับหลอดควบคุม จากนั้นเติมซีรั่มจำนวน 200 µl ลงในหลอดทดลองทั้งหลอดควบคุมและหลอดตัวอย่าง และนำหลอดทดลองไปวางไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยที่นำออกมา vortex ทุกๆ 15 นาที เมื่อครบ 1 ชั่วโมง เติม 20% TCA ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลองทุกหลอดและผสมให้เข้ากัน แช่หลอดทดลองในน้ำแข็งและทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้โปรตีนที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่างหลอดทดลอง ให้เทส่วน supernatant ทิ้ง และตกตะกอนโปรตีนด้วย 10% TCA 1 ml จากนั้นแช่หลอดทดลองในน้ำแข็งและทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วน supernatant ทิ้ง ล้าง protein pellet ด้วย ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) ปริมาตร 1 ml แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง แล้วเติม 6 M guanidine hydrochloride ปริมาตร 500 µl แล้วผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณ protein carbonyl content ด้วย UV spectrophotometer (รุ่น UV-1601 ยี่ห้อ SHIMADZU) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 375 nm โดยใช้หลอดทดลอง C ของแต่ละตัวอย่าง เป็น blank

<u>ขั้นตอนการวัดค่า Total corrected protein</u>

นำสารในหลอดควบคุม ที่เก็บหลังจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 375 nm แล้วจำนวน 500 µl ไปวิเคราะห์ปริมาณ total corrected protein ด้วย UV spectrophotometer วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยใช้ 6 M guanidine hydrochloride เป็น blank นำค่า total corrected protein ไปคำนวณหาปริมาณ protein carbonyl content ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

<u>การคำนวณที่เกี่ยวข้อง</u>

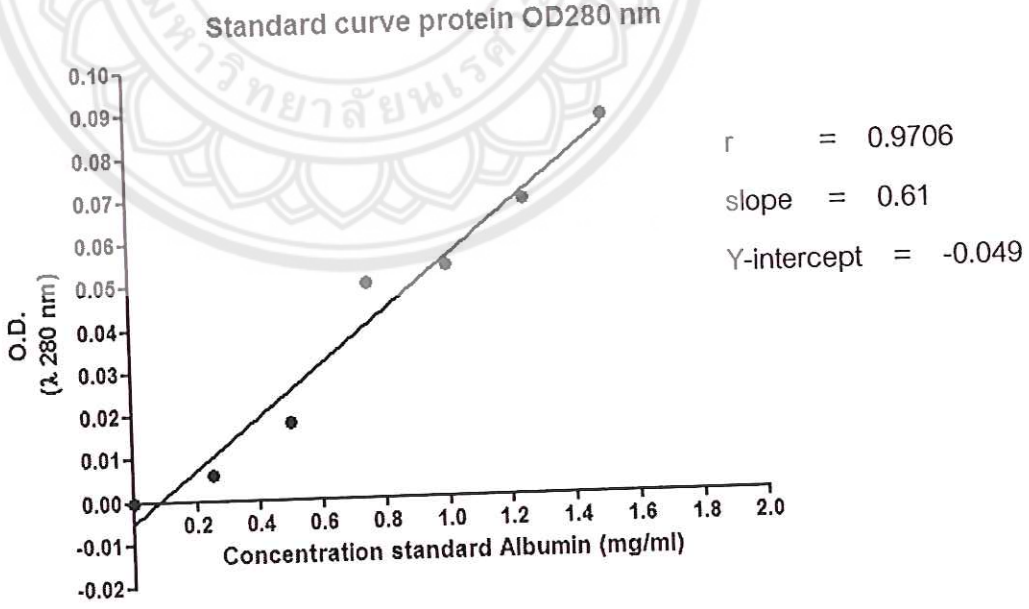
1) **ค่า protein carbonyl concentration (nmol/ml)**

ได้จากการวัดการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 375 nm

$$\text{Concentration (nmol/ml)} = OD_{375\ nm} \times 45.45$$

2) ค่า **total corrected protein**

ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้ นำสารละลายมาตรฐานของโปรตีนอัลบูมินที่ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ค่า ได้แก่ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00,1.25 และ 1.50 mg/ml ทำการวิเคราะห์โดยหลักการของวิธี Spectrophotometric DNPH assay จากนั้นนำปฏิกิริยาในส่วนควบคุม (control, C) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยใช้ 6 M guanidine HCl เป็น blank นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานเพื่อหาค่า parameters ต่างๆ ของกราฟเพื่อใช้ในการคำนวณหา corrected protein concentration ต่อไป



ภาพ 2 กราฟมาตรฐานของโปรตีนอัลบูมิน ที่เจือจางให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

โดย protein concentration สามารถคำนวณจาก

$$\text{Protein concentration (mg/ml)} = \frac{[\ OD_{280\ nm} - \text{Y intercept}\ ] \times 2.5}{\text{slope}}$$

* 2.5 = corrected faction คิดคำนวณกลับไปหา original sample

3) ค่า **Protein carbonyl content (nmol/mg)**

คำนวณค่า protein carbonyl content (nmol/mg) ซึ่งเป็นค่าปริมาณ carbonyl ที่ถูกต้องต่อปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในปฏิกิริยาวิเคราะห์ (corrected protein) โดยสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{Protein carbonyl content (nmol/mg)} = \frac{\text{Protein carbonyl concentration (nmol/ml)}}{\text{Corrected protein concentration (mg/ml)}}$$

3.5.การวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1) ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วย Shapiro-wilk test

3.5.2) หากมีการกระจายตัวของข้อมูลปกติข้อมูลนำเสนอในรูปค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5.3) หากมีการกระจายตัวของข้อมูลไม่ปกติข้อมูลนำเสนอในรูปค่ามัธยฐานและช่วงความเชื่อมั่น (95% confidence interval หรือ 99% confidence interval

3.5.3) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างของความเข้มข้นโปรตีนคาร์บอนิล ในซีรั่มผู้มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยหัวใจล้มเลวแบบเรื้อรังที่แบ่งระดับตามความรุนแรง (NYHA functional classification) ด้วยสถิติ Kruskal Wallis test with dunett test

3.5.4) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ p value < 0.05

บทที่ 4: ผลการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาระดับของ Protein carbonyl content (PC) ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรังจำนวน 80 ราย ที่แบ่งแยกระดับตามความรุนแรงของ New York Heart Association (NYHA) Functional Classification I-IV เปรียบเทียบกับซีรั่มของผู้มีสุขภาพดี

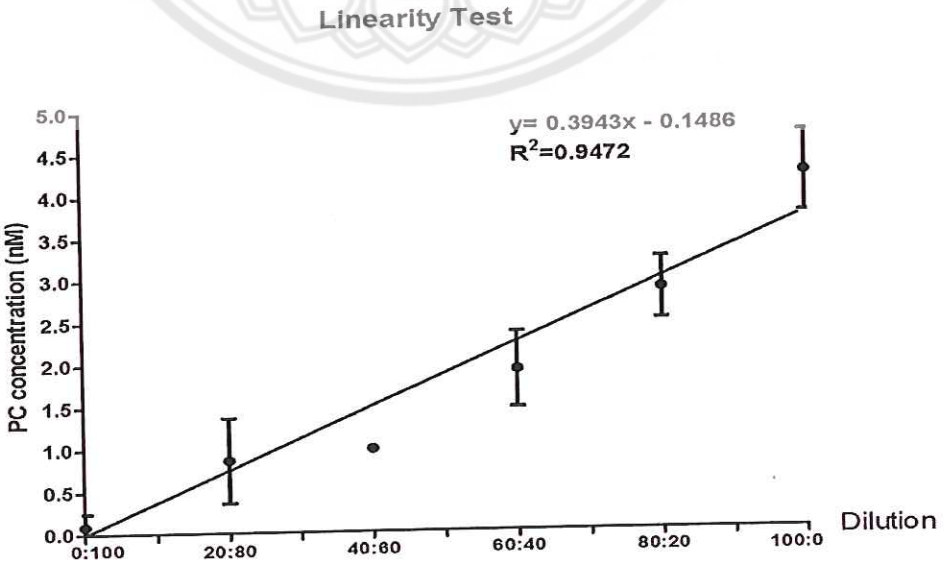
4.1 การควบคุมคุณภาพก่อนวิเคราะห์

4.1.1 Protein carbonyl (PC)

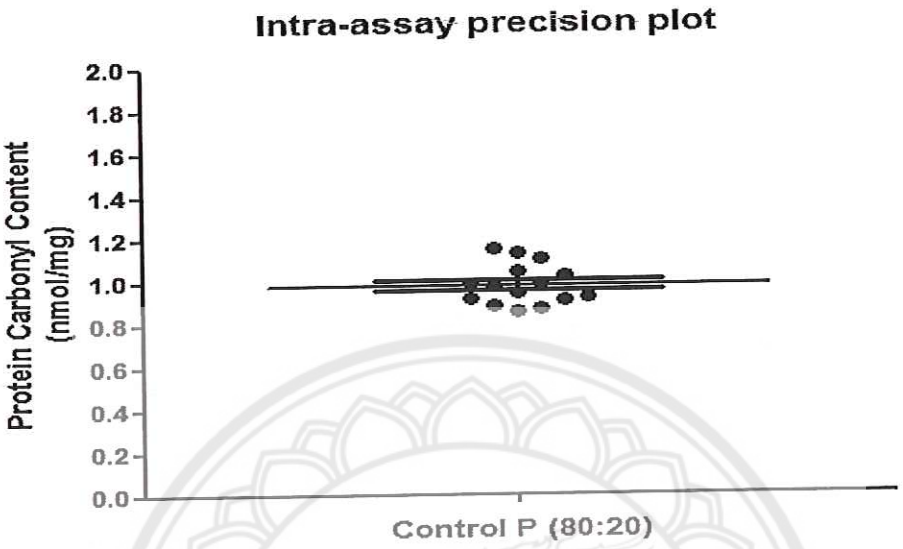
- Linearity ผลการทดลองพบว่า ระดับของ protein carbonyl content มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยแสดงผลเส้นกราฟที่เป็นเส้นตรง และมีค่า Correlation coefficient (r^2) = 0.9472 (ภาพ 3)

- Within-run precision ผลการทดลองพบว่า ความแม่นยำภายในขณะทำการวิเคราะห์ (within run precision) จากการทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจำนวน 15 ครั้ง พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.9823 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.0934 และร้อยละของค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) 9.51 % (ภาพ 4)

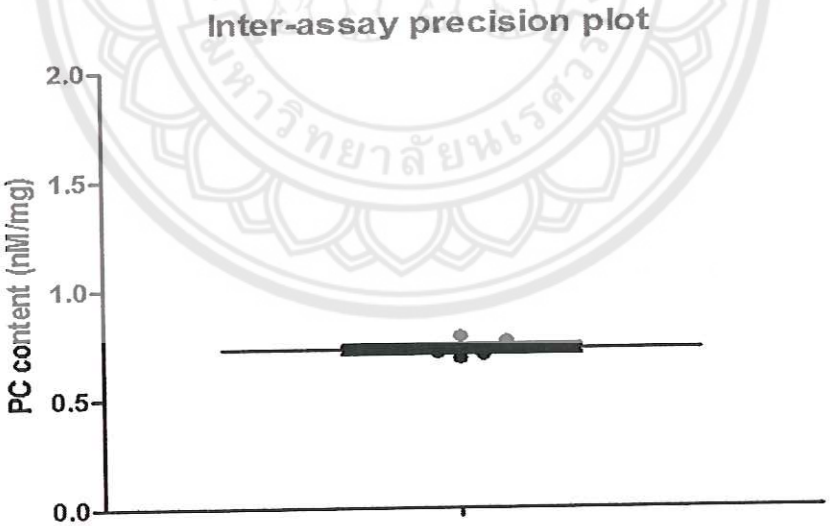
- Between – day precision ผลการทดลองพบว่า ความแม่นยำระหว่างวันของการวิเคราะห์ (between day precision) จากการทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันจำนวน 3 ปฏิกิริยา (3 ครั้ง) ต่อวัน เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7260 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.04219 และร้อยละของค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) 5.81% (ภาพ 5)



ภาพ 3 กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างระดับ protein carbonyl content(nmol/mg) และสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน



ภาพ 4. กราฟแสดงการวิเคราะห์ความแม่นยำภายในการทำวิเคราะห์ (within run precision) ของการวิเคราะห์ protein carbonyl content ในสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน



ภาพ 5 กราฟแสดงการวิเคราะห์ความแม่นยำระหว่างวันของการตรวจวิเคราะห์ (Between - day precision) ของ protein carbonyl content ในสารควบคุมคุณภาพมาตรฐาน

4.2 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Protein carbonyl ในซีรั่มผู้ที่มีสุขภาพดีกับผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง (Chronic heart failure)

4.2.1 ข้อมูลพื้นฐาน

นำซีรั่มของผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง(Chronic heart Failure) ผลการศึกษาพบว่า ซีรั่มของผู้มีสุขภาพดี จำนวน 20 ราย เป็นเพศชาย 5 ราย เพศหญิง 15 ราย ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (Chronic heart Failure) แบ่งเป็น Functional Class I 20 ราย เป็นเพศชาย 14 ราย เพศหญิง 6 ราย Functional Class II 20 ราย เป็น เพศชาย 12 ราย เพศหญิง 8 ราย Functional Class III 20 ราย เป็น เพศชาย 14 ราย เพศหญิง 6 ราย Functional Class IV 20 ราย เป็น เพศชาย 16 ราย เพศหญิง 4 ราย และ เมื่อทำการเปรียบเทียบอายุของทั้ง 5 กลุ่ม ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มสุขภาพดี และ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง Functional Class I และไม่พบความแตกต่างของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังแต่ละ Functional Class แต่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มสุขภาพดี กับ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง Functional Class II, III, IV อย่างมีนัยสำคัญที่ p value < 0.05 ดังแสดงตาราง 1

ตาราง 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

		Healthy subject	Chronic Heart Failure			
			Class I	Class II	Class III	Class IV
Number (person)		20	20	20	20	20
Gender	Male	5	14	12	14	16
	Female	15	6	8	6	4
Age (Mean±SD)		47.6±15.29	54.7±15.95	62.8±15.22*	64.4±16.75*	63.05±11.21*

analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test

* เปรียบเทียบกับกลุ่มสุขภาพดี กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P<0.05$

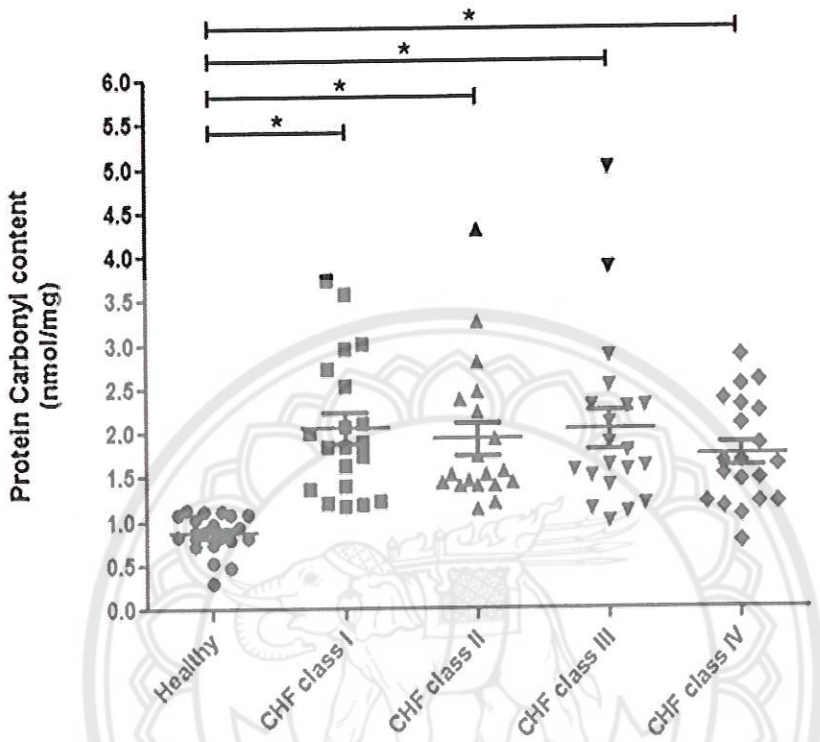
4.2.2 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Protein carbonyl (PC) ในผู้มีสุขภาพดีเปรียบเทียบกับป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรัง

ผลการทดลองพบว่า ค่า PC ในกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวแบบเรื้อรังมีค่าสูงกว่า กลุ่มสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และไม่พบความแตกต่างของค่า Protein Carbonyl ในกลุ่มผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวทั้ง 4 class ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 2 การเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl content (nmol/mg) ในซีรั่มผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้องรัง functional class I, II, III และ IV

	Healthy	CHF class I	CHF class II	CHF class III	CHF class IV
Median	0.8610	1.875**	1.529**	1.584**	1.650**
25% Percentile	0.7630	1.371	1.407	1.259	1.205
75% Percentile	1.087	2.684	2.274	2.306	2.284
Mean	0.8690	2.061	1.843	1.902	1.743
Std. Deviation	0.2287	0.7881	0.7925	0.9034	0.5867
Std. Error	0.05115	0.1762	0.1690	0.1739	0.1312

** เปรียบเทียบกับกลุ่มสุขภาพดี กำหนดระดับนัยสำคัญที่ P<0.001



ภาพ 6 กราฟแสดงค่าผลการวิเคราะห์ระดับ protein carbonyl content (nmol/mg) ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง เปรียบเทียบกับซีรั่มของผู้มีสุขภาพดี ที่ P <0.001

บทที่ 5: อภิปรายผลการวิจัย

ภาวะเครียดจากออกซิเดชั่น คือ ภาวะที่มีความไม่สมดุลของการสร้างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นผลเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระหรือการที่มีสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในร่างกายส่งผลให้เซลล์ภายในร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลาย (6) โดยprotein carbonyl เป็นโปรตีนที่เกิดจากการออกซิเดชัน เนื่องจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน (Reactive oxygen species; ROS) เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน เรียกกระบวนการนี้ว่า Protein peroxidation เมื่อเกิดภาวะ oxidative stress แล้วระดับของ Protein carbonyl จะเพิ่มสูงขึ้น สามารถตรวจพบได้เร็วและอยู่ในเลือดได้นานอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับดัชนีชี้วัดตัวอื่นๆ ที่เกิดในภาวะ oxidative stress จึงนิยมใช้ Protein carbonyl เป็น Biomarker ของการตรวจภาวะ protein oxidation (14,25) และเนื่องจากโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่ถูกอนุมูลอิสระทำลายมากสุดประมาณ 50 - 75% (14) เมื่อโปรตีนถูกทำลายจะส่งผลต่อการทำงานของตัวรับโปรตีน เอนไซม์ และตัวโปรตีนขนส่ง นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้เกิดความเสียหายแก่สารชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น การยับยั้งการซ่อมแซมของดีเอ็นเอ ความสามารถที่ลดลงในการถอดรหัสและการจำลองของดีเอ็นเอ (19) เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันได้มีงานวิจัยที่พิสูจน์แล้วว่าเมื่อโปรตีนถูกออกซิไดซ์จะมีผลต่อการเกิดโรคเนื่องจากความเสื่อมของวัย เช่น Alzheimer's disease , rheumatoid arthritis , altherosclerosis และ Chronic heart failure (11)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ protein carbonyl content ในซีรั่มของผู้มีสุขภาพดีต่อผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง Functional Class I, II, III และ IV พบว่า ค่า protein carbonyl content ในซีรั่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังมีค่าเพิ่มขึ้นจากกลุ่มสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p *value* <0.001) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Banfi และคณะในปี 2008 ที่พบว่าระดับของ protein carbonyl content มีค่าเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเมื่อเทียบกับกลุ่ม control นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ พบว่า α 1 antitrypsin และ fibrinogen มีผลต่อการเกิด Endothelial damage ในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวอีกด้วย (11) จากการศึกษาของ Giordano พบว่าการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวมีความสำคัญใน cardiac function รวมถึงการเกิด Hypertrophy, vasomotor function, การเปลี่ยนแปลงของ extracellular matrix และการหลั่งของ cytokines (7). นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆที่สนับสนุนการศึกษาข้างต้นดังในการศึกษาของ Christophe และคณะ (2003) ที่พบ NADPH oxidase activity (8) งานวิจัยของ Miguel และคณะ (2004) ที่พบ tumor necrosis factor-α (TNFα) (27) ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยหัวใจ

ล้มเหลว นอกจากนี้งานวิจัยของ Bettencourt ในปี 2004 พบว่า ระดับ NT-pro BNP และ BNP ที่เพิ่มขึ้นสามารถใช้ในการพยากรณ์ความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวต่ออัตราการเสียชีวิตได้ (28)

เมื่อเทียบระดับของ protein carbonyl ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Radovanovic et.al. (2012) ที่พบว่า reactive carbonyl derivatives จะมีระดับเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้มีสุขภาพดี แต่จะไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (16) ซึ่งคณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่า protein carbonyl content ที่ไม่แตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรังในการศึกษานี้เป็นผลจากการปรับตัวของร่างกายโดยผู้ที่อยู่ในสภาพของหัวใจล้มเหลวเรื้อรังร่างกายจะพยายามปรับตัวเพื่อให้ทนต่อสภาพที่เปลี่ยนแปลงเพื่อให้ร่างกายสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้รวมไปถึงการปรับสมดุลของอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นโดยการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ glutathione peroxidase (GSH-Px) ซึ่งเป็น antioxidant ในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งการศึกษาในครั้งนั้นได้ให้ข้อสมมุติฐานถึง antioxidant ได้ถูกใช้ไปอย่างมากในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นเมื่อผู้ป่วยมีระดับความรุนแรงของโรคมากขึ้น(16) นอกจากนี้ได้มีงานวิจัยของ Zheng et.al. (2010) ที่ศึกษาในหนู mice ที่เป็น experimental autoimmune encephalomyelitis ที่ทำการศึกษาในแบบ acute และ chronic phase ของการเกิดโรคและพบว่า ระดับของ protein carbonyl จะเพิ่มขึ้นสูงสุดแค่ในช่วง acute phase แต่กลับลดลงใน chronic phase (29) ประกอบกับการศึกษาในครั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยไม่ได้วัด oxidative modifications ทั้งหมดของ protein เช่นการเปลี่ยนจาก tyrosine ไปเป็น 3-chlorotyrosine, 3-nitrotyrosine, dityrosine หรือmethionine oxidation ซึ่งรูปแบบที่กล่าวมานี้อาจให้ผลที่แตกต่างออกไป (11,14)

เมื่อพิจารณาข้อมูลด้านอายุพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มสุขภาพดี กับ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง Functional Class II , III และ IV อย่างมีนัยสำคัญที่ p value < 0.05 แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Kritsanee และคณะ (2011) พบว่าอายุไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ protein carbonyl (30)

เอกสารอ้างอิง

1. Tully KC. Chapter 3. Cardiovascular disease in older adult. In: Cotter VT, Strumpf NE, editors. Advanced practice nursing with older adults; Clinical guidelines. New York: Mcgraw-Hill; 2002. p.29-65

2. Richard J. Rodeheffer, Margaret M. Redfield.(2006) Heart Failure Diagnosis and Evaluation. Mayo Clinic Cardiology: Concise Textbook, Third Edition,1101-1102.

3. งานเวชสารสารสนเทศ. 2553. สถิติผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง พ.ศ 2549-2553.พิษณุโลก. โรงพยาบาลพุทธชินราช

4. ผ่องพรรณ อรุณแสง. การพยาบาลผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด. พิมพ์ครั้งที่ 5. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา ขอนแก่น, 2551; 4:111-166.

5. Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt PR, et al. The influence of age, sex and other variables on the plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population. Heart 2003;89 (7):745-51

6. Grieve DJ, Shah AM. Oxidative stress in heart failure more than just damage. Eur Heart J 2003 Dec; 24(24): 2161-3.

7. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. J Clin Invest 2005;115(3):500-8.

8. Heymes C, Bendall J K., Ratajczak J, *et al.* Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. J. Am. Coll. Cardiol. 2003. Jun ;18 (41) : 2164-71.

9. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M , Shah AM. Activation of NADPH Oxidase During Progression of Cardiac Hypertrophy to Failure. Hypertension 2002; 40(4): 477-84.

10. Mallat Z, Philip I, Lebret M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated level of8-iso-prostaglandin F2 alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilation and progression to heart failure. Circulation 1998;97(16):1536-9

11. Banfi C, Brioschi M, Barcella S, Veglia F, Biglioli P, Tremoli E, & Agostoni P. Oxidative protein in plasma of patients with heart failure: Role in endothelial damage. Eur J Heart Fail 2008; 10(3): 244-251.

12. Savas Ozsu, Ayhan Gulsoy, S. Caner Karahan, AhmetMentese, Irfan Nuhoglu and Tevfik Ozlu. Diagnostic value of plrural effusion ischaemia-modified albumin in patients with cardiac failure. Annals Clinical Biochemistry 2010 :1-6.

13. Kaul, N, Siveski-Iliskovic, N, Hill, M, Slezak, J, Singal, PK. Free radicals and the heart. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 1993, 30(2),55-67.

14. Dalle-Donne I, Giustarini D., Colombo R., Rossi R., & Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. Trends Mol Med 2003; 9(4): 169-176.

15. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A. and Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003, 329(1-2), 23-38.

16. Radovanovic S.,Radojevic AS.,Ercegovac MP, et al. Marker of oxidative damage and antioxidant Enzyme activities as predictors of morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. Journal of cardiac failure 2012, 18(6),493-501.

17. Maeda K, Tsutamoto T, Wadsa A et al. High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure. J AM Coll Cardiol 2000; 36-1587.

18. Stanek B, Frey B, Hulsmann M et al. Prognostic evaluation of neurohumoral plasma levels before and during beta-blocker therapy in advanced left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol 2001;38-436.

19. Yoshimura M, Mizuno Y, Nakayama M et al. B-type natriuretic peptide as a marker of the effects of enalapril in patients with heart failure. Am J Med 2002; 112: 716-720

20. Eugene Braunwald. Biomarkers in Heart Failure. N Engl J Med 2008; 358:2148-2159.

21. เสาวนีย์ เหลืองอร่าม.. ภาวะเครียดจากการออกซิเดชั่นกับการออกกำลังกาย. เอกสารประกอบการเรียนการสอนภาวะเครียดจากการออกซิเดชั่นกับการออกกำลังกาย. คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2552.

22. Willcox J.K., et al. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44, 275-295.

23. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D. and Milzani A. (2006). Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. Clinical Chemistry, 52:4, 601-623.

24. Aruoma O (1998): Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. J. Am. Oil Chemists Soc. 75, 199–212.

25. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T. (1999)Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. Free Radic Biol Med 1999 ;27(9-10): 1080-6.

26. Mutlu-Turkoglu U, Akalin Z, Ilhan E, Yilmaz E, Bilge A, Nisanci Y, et al.(2005). Increased plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in patients with angiographically defined coronary artery disease. Clin Biochem Dec;38(12):1059-65.

27. Rivera M. Soluble TNF-? and interleukin-6 receptors in the urine of heart failure patients. Their clinical value and relationship with plasma levels. Eur J Heart Fail. 2004; 6(7):877-882

28. Bettencourt P. NT-proBNP and BNP: biomarkers for heart failure management. Eur J Heart Fail 2004;6(3): 359-363.

29. Zheng J. Bizzozero OA. Accumulation of protein carbonyls within cerebellar astrocytes in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci Res 2010; 88(15):3376-85.

30. Maneewong K, Mekrungruangwong T, Luangaram S, Thongsri T, Kumphune S. Combinatorial Determination of Ischemia Modified Albumin and Protein Carbonyl in the Diagnosis of Non ST-Elevation Myocardial Infarction. Ind J Clin Biochem. 2011; 26(4): 389-95

การเปรียบเทียบระดับของ Protein Carbonyl content และ Ischemia-Modified Albumin ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

ฐิฒิภรณ์ เมฆรุ่งเรืองวงศ์[1,2] อาทิตา วินารักษ์วงศ์[1,2] เฉลิมพล สังข์ทอง[1,2] กานต์ชนา วงศ์อินทร์อยู่[1,2]

ไชยวัฒน์ ไชยสมบูรณ์[3] โตมร ทองศรี[4] และ สราวุธ คำปวน[1,3]

[1] หน่วยวิจัยชีวการแพทย์ทางด้านวิทยาศาสตร์ของหัวใจและหลอดเลือด

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีหัวใจและทรวงอก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก

[3] ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรอ.เมือง จ.พิษณุโลก

[4] กลุ่มงานอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลพุทธชินราช

ผู้รับผิดชอบบทความ:

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สราวุธ คำปวน

หน่วยวิจัยชีวการแพทย์ทางด้านวิทยาศาสตร์ของหัวใจและหลอดเลือด และ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

โทร 055-966-353 โทรสาร 055-966-300 E-mail address: sarawutk@nu.ac.th

Comparison of serum protein carbonyl content and ischemia modified albumin in chronic heart failure

Titiporn Mekrungruangwong[1,2], Atita Winarukwong [1,2], Chalermpol Sangtong[1,2], Karnchana Vonginyoo [1,2], Chaiwat Chaisomboon[3] TomonThongsri[4], Sarawut Kumphune[1,3]

[1] Biomedical Research Unit in Cardiovascular Sciences (BRUCS), Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000 THAILAND

[2] Department of Cardio Thoracic Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000 THAILAND

[3] Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000 THAILAND

[4] Department of Medicine, Buddhachinaraj Hospital, Phitsanulok 65000 THAILAND

Corresponding author: Assistant Professor Dr. Sarawut Kumphune, PhD

Biomedical Research Unit in Cardiovascular Sciences (BRUCS) and Department of Medical Technology

Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University

Phitsanulok, 65000 Thailand

Tel.: +66(0)83-960 6006 Fax: +66(0) 55 966 300

E-mail address: sarawutk@nu.ac.th

MANUSCRIPT

บทคัดย่อ

Protein carbonyl (PC) และ ischemia modified albumin (IMA) เป็นโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกลไกของภาวะเครียดออกซิเดชั่น ซึ่งพบว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้สามารถเป็นสารบ่งชี้เพื่อวินิจฉัยความผิดปกติของหัวใจได้ และได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนทั้ง 2 ชนิดในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการตรวจวิเคราะห์โปรตีนทั้งสองชนิด ในการพยากรณ์ภาวะผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับ PC content และ IMA ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA) เปรียบเทียบกับผู้มีสุขภาพดี โดยวัดระดับ PC content ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ I, II, III และ IV กลุ่มละ 20 ราย และซีรั่มของผู้มีสุขภาพดี 20 ราย ด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH และวัดระดับความเข้มข้นของ IMA ในซีรั่มโดยวิธี Albumin cobalt binding assay ผลการศึกษาพบว่า ระดับของ PC content ในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังทุกกลุ่มมีค่าสูงกว่าผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.001) แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ PC content ในผู้ป่วยแต่ละระดับความรุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของ IMA ในทุกกลุ่มไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P >0.05) และไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ PC content สรุปได้ว่า ระดับของ PC content ในซีรั่ม สามารถคัดกรองกลุ่มผู้มีสุขภาพดีออกจากกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังได้ดีกว่า IMA แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะใช้เป็นสารบ่งชี้ในการพยากรณ์ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

คำสำคัญ : หัวใจล้มเหลวเรื้อรัง, Protein Carbonyl, Ischemia Modified Albumin

ABSTRACT

Protein carbonyl (PC) and Ischemia modified albumin (IMA) are categorized as oxidatively modified protein and have been shown to be biomarkers for diagnosis, prognosis, and monitoring in cardiovascular diseases. However, the roles of these two proteins as prognostic and monitoring marker have never been investigated. This study aimed to determine the level of serum PC content and IMA in patients with chronic heart failure (CHF), who classified following the New York Heart Association (NYHA), compared to healthy subjects. The serum PC content was determined by Spectrophotometric DNPH assay, while serum IMA level was determined by Albumin cobalt binding assay. The results showed that the PC content level in all CHF classes were significantly higher than that of healthy subjects and there were not significantly different between functional classes. In addition, the serum IMA level was not different in all subject groups and not correlated with serum PC content level. In conclusion, the serum PC content level found to have better performance than IMA to discriminate healthy subject from CHF, but insufficient to be used as prognostic marker.

Key words: Chronic heart failure, Protein Carbonyl, Ischemia Modified Albumin

บทนำ

ภาวะหัวใจล้มเหลว เป็นภาวะที่หัวใจไม่สามารถบีบตัวส่งเลือดออกไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของร่างกายได้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย[1] ระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์ของโรค โดยพบว่าหากภาวะหัวใจล้มเหลวมีความรุนแรงมากขึ้น จะทำให้การพยากรณ์โรคของผู้ป่วยแย่ลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้สูงอายุที่มากกว่า 75 ปี ดังนั้นภาวะหัวใจล้มเหลวจึงเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในผู้ป่วยสูงอายุ[1-2] การวินิจฉัยภาวะหัวใจล้มเหลวนั้นสามารถวินิจฉัยได้จากซักประวัติ การตรวจร่างกาย และถ่ายภาพรังสีทรวงอก แต่อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยบางราย ไม่สามารถวินิจฉัยภาวะหัวใจล้มเหลวได้จากการตรวจร่างกายและภาพถ่ายรังสีทรวงอกเนื่องจากการไม่สามารถแปลผลการตรวจได้หรือมีความไม่ชัดเจน เช่น ในผู้ป่วยที่มีรูปร่างอ้วน ผู้ป่วยที่มีภาวะถุงลมโป่งพอง (Chronic obstructive pulmonary disease; COPD) หรือในผู้ป่วยสูงอายุที่ไม่มีกิจกรรมและอาการยังไม่รุนแรงอาจทำให้การซักประวัติเรื่องการหอบเหนื่อยหรืออาการหายใจลำบากซึ่งเป็นหนึ่งในอาการสำคัญของภาวะหัวใจล้มเหลวไม่สามารถบอกกับแพทย์ได้อย่างชัดเจนเป็นต้น[1] ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยด้วยหลักการดังที่กล่าวมานั้นต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ตรวจ

นอกจากการตรวจวินิจฉัยดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจวิเคราะห์สารบ่งชี้การทำงานของหัวใจ เพื่อช่วยในการวินิจฉัย พยากรณ์โรค และติดตามผลการรักษา โดยในปัจจุบันสารบ่งชี้การทำงานของหัวใจ ที่ใช้ในปัจจุบันคือ Brain Natriuretic Peptide (BNP) และ pro-

BNP อย่างไรก็ตามการประเมินผลการวิเคราะห์สารบ่งชี้ดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ เพศ วิธีที่ใช้ตรวจ และเชื้อชาติ[3] นอกจากนี้ยังมีราคาแพง และสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้เฉพาะในโรงพยาบาลที่มีเครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติเท่านั้น ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าสารบ่งชี้ชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการวินิจฉัยภาวะหัวใจล้มเหลว สามารถตรวจวิเคราะห์ และแปลผลการวิเคราะห์ได้ง่าย และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง จากการศึกษาวิจัยพบว่า ภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง[4] โดยมีความสัมพันธ์กับการเสียความสามารถในการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ[5] และระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง[4-5] โดยกลไกพื้นฐานพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต และที่สำคัญทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ และนำไปสู่ความผิดปกติของการทำงานของหัวใจ อนุมูลอิสระที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชั่นนั้น พบว่ามีผลในการลดปริมาณของไนตริกออกไซด์ ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของหลอดเลือดและส่งเสริมการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวเร็วยิ่งขึ้น[4-5] จากการศึกษาที่ผ่านมามีผลงานวิจัยที่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่าง ภาวะเครียดออกซิเดชั่นและภาวะหัวใจล้มเหลว โดยทำการศึกษาถึงระดับของสารบ่งชี้การเกิด ภาวะเครียดออกซิเดชั่นและสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ต่างๆ เช่นจากการศึกษาของ Christopher และคณะในปี ค.ศ.2003 พบว่าระดับ NADPH oxidase activity ในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้นผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว[6] และ NADPH oxidase activity ที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจเป็นกลไกการเกิด กล้ามเนื้อหัวใจโตใน

ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว[7] ผลการศึกษาของ Kaul และคณะในปี ค.ศ.1993 พบว่าอนุมูลอิสระสามารถทำลายโมเลกุลของโปรตีนในกล้ามเนื้อหัวใจ[8] นอกจากนี้มีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลของโปรตีนในภาวะเครียดออกซิเดชั่น หรือ Protein oxidation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ทำให้การเกิดการจับกันระหว่างโปรตีนและหมู่คาร์โบไนล์ (Protein-bound carbonyl group) หรือเรียกว่า Protein Carbonyl หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนอัลบูมินทางด้านปลายอะมิโน (N-terminus) ของโปรตีนอัลบูมิน ทำให้เกิด Ischemia modified albumin (IMA) จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ระดับของ PC content และ IMA สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อเป็นสารบ่งชี้การทำงานของหัวใจได้[9-12] และจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยในปี ค.ศ. 2011 ได้พบว่า การตรวจวิเคราะห์ระดับของ Protein carbonyl (PC) content และ Ischemia modified albumin (IMA) ในซีรั่ม สามารถใช้ในการวินิจฉัยภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้[12] อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่มของผู้ป่วยในภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การศึกษาระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งแยกระดับความรุนแรง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาระดับของ PC content และ และIMA ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA)[1-2] เพื่อให้ทราบถึงประโยชน์ของการวิเคราะห์ระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่ม ในการวินิจฉัย พยากรณ์ ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การคัดเลือกตัวอย่าง

กลุ่มผู้มีสุขภาพดีจำนวน 20 รายไม่กำหนดเพศและวัย โดยนิยามคำว่าสุขภาพดีคือ ผล การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจปกติ ไม่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวานความดันโลหิตสูงหรือโรคหัวใจโรคมะเร็งไม่รับประทานอาหารเสริมหรือยาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นวิตามินซี หรือ วิตามินอีภายในระยะเวลา12 เดือนก่อนเข้าร่วมการวิจัยโดยพิจารณาข้อมูลจากแบบสอบถามคัดกรองผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง จำนวน 80 ราย โดยแบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA)[1-2] จำนวนกลุ่มละ 20 รายไม่กำหนดเพศ และวัยโดยเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจและรักษาในโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก และได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง โดยมีค่าความสามารถในการบีบเลือดออกจากหัวใจ (Ejection fraction) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 40เปอร์เซ็นต์ หากผู้ป่วยมีการทำงานของตับ ไต ผิดปกติ โรคเบาหวาน มะเร็ง หรือได้รับการผ่าตัดภายในระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน โดยพิจารณาข้อมูลจากแบบสอบถามและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการในเวชระเบียนของโรงพยาบาลอย่างน้อย 6 เดือนจะถูกคัดออกจากการศึกษา อาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษานี้จะต้องเป็นผู้ยินยอมเข้าร่วมงานวิจัยโดยการลงนามเข้าร่วมการศึกษา และการศึกษานี้ได้รับการรับรองการวิจัยจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์จากโรงพยาบาลพุทธชินราชเลขที่ 104/54 และมหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 55 01 01 0007

2. การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

ซีรั่มได้จากเลือดของผู้มีสุขภาพดีที่แบ่งเก็บด้วยปริมาตร 3 มล. จากผู้มีสุขภาพดีจำนวน 20 ราย และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ ซีรั่มของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง จำนวน 80 ราย ที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart association (NYHA) และเหลือจากการส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิกของโรงพยาบาลทำการเก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

3. การตรวจวัดระดับของ PC content ในซีรั่ม

ทำการตรวจวิเคราะห์ระดับของ Protein Carbonyl content (PC content) ด้วย วิธี Spectrophotometric DNPH assay โดยหลักการคือ PC ในซีรั่มจะทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) และเกิดผลิตผลจากปฏิกิริยาที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยหลักการ วัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 360-385 นาโนเมตร โดยนำซีรั่มปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง 2 หลอด (หลอดที่ 1 สำหรับสิ่งส่งตรวจที่จะวิเคราะห์ หลอดที่ 2 สำหรับปฏิกิริยาควบคุม) จากนั้นเติม DNPH ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 และเติม 2.5 M HCl โมลาร์ในหลอดควบคุม incubate ทั้งสองหลอดในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการเขย่าผสมทุกๆ 15 นาที เติม 20% (w/v)Trichloroacetic acid (TCA)ปริมาตร 1 มล. ลงในแต่ละหลอด และผสมให้เข้ากัน นำทั้งสองหลอดแช่ลงในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา

10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนบนทิ้ง และทำการละลายตะกอนด้วย 10% TCA ปริมาตร 1 มล. แช่หลอดทดลองในน้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 5 นาทีแล้วจึงปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนบนทิ้ง และทำการละลายตะกอนด้วย (1:1) Ethanol/Ethyl acetate ปริมาตร 1 มล. และผสมให้เข้ากัน แล้วจึงปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำซ้ำกันเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้าย ให้ทำการละลายตะกอนด้วย guanidine hydrochloride ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วจึงปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายโอนส่วนบน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 375 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ protein carbonyl สามารถคำนวนได้จากการหาค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของ sample ซึ่งหักลบจากค่าการดูดกลืนแสงของหลอดปฏิกิริยาควบคุม จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างตรวจมาคำนวนหาระดับความเข้มข้นของ protein carbonyl (nmol/ml) จากสมการที่ 1

สมการที่ 1 Protein carbonyl Concentration (nmol/ml) = OD375 nm x 45.45

จากนั้นทำการคำนวนหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างตรวจ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวนหาปริมาณโปรตีนด้วยสมการที่ 2 ซึ่งได้จากการทำกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรด้วย Bovine Serum Albumin

สมการที่ 2 :Protein concentration (mg/ml) = [OD280 nm - Y intercept] x 2.5 / Slope

จากนั้นคำนวนหาปริมาณ Protein Carbonyl Content (PC content) ด้วยสมการที่ 3

สมการที่ 3 : PC content (nmol/mg) = PC Concentration (nmol/ml)/Protein concentration (mg/ml)

4. การวิเคราะห์ระดับ IMA ในซีรั่ม

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนอัลบูมินทางด้านปลาย (N-terminus) ทำให้ความสามารถในการจับกับ metal ion ของโปรตีนอัลบูมินลดลงซึ่งการวัดความเข้มข้นของ IMA สามารถทำได้โดยวิธี Albumin Cobalt biding test (ACB test) การตรวจวิเคราะห์ระดับ IMA ทำได้โดยผสม 0.1% (w/v) cobalt chloride (Sigma, $CoCl_2.6H_2O$) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ ซีรั่ม 200 ไมโครลิตร ทำการเขย่าผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หลังจากนั้นเติม dithiothreitol (DTT) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (1.5 mg/ml H_2O) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม 0.9% (w/v) NaCl ปริมาตร 1 มล. เพื่อหยุดปฏิกิริยา และวัดสีที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร โดยใช้ serum-cobalt blank ที่ไม่มีการเติม DTT เป็นค่าอ้างอิงในการวัดค่าการดูดกลืนแสง และรายงานผลเป็นค่า absorbance unit (ABSU) [18]

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วย Shapiro – Wilk test แสดงผลของข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) หรือ ค่ามัธยฐาน(Median) และช่วงความเชื่อมั่น (95% confidence interval หรือ 99% confidence interval) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลอายุ

ระหว่างผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย ทั้ง 4 ระดับด้วยสถิติ analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Tukey's multiple comparison test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานระหว่างระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่มผู้มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย ทั้ง 4 ระดับด้วยสถิติ Kruskal Wallis test ร่วมกับ Dunnett test ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ PC content และ IMA ด้วย Spearman's Rank correlation coefficient กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ P value < 0.05

ผลการศึกษา

1. **ข้อมูลพื้นฐาน**

การศึกษานี้ประกอบด้วย อาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 20 ราย แยกเป็นเพศชาย 5 ราย เพศหญิง 15 ราย และ อาสาสมัครที่ได้รับการวินิจฉัยจากอายุรแพทย์โรคหัวใจว่าป่วยด้วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง และแบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ระดับ I-IV ระดับละ 20 ราย โดยมีจำนวนของ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I เพศชาย 14 ราย เพศหญิง 6 ราย ระดับ II เพศชาย 12 ราย เพศหญิง 8 ราย ระดับ III เพศชาย 14 ราย เพศหญิง 6 ราย และ ระดับ IV เพศชาย 16 ราย เพศหญิง 4 ราย จากข้อมูลพื้นฐานพบว่าเพศชายอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบอายุของทั้ง 5 กลุ่ม ไม่พบความแตกต่างของอายุระหว่างกลุ่มสุขภาพดี และ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I แต่พบความแตกต่าง

ของอายุระหว่างกลุ่มสุขภาพดี กับ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ II, III และ IV อย่างมีนัยสำคัญ (P <0.05) ดังแสดงตารางที่ 1

2. การเปรียบเทียบระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่มของผู้มีสุขภาพดีเปรียบเทียบกับผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I-IV

การศึกษาพบว่า ระดับของ PC content ในซีรั่มของที่วัดได้ในผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I-IV มีค่ามัธยฐาน 0.861 (99% CI, 0.723-1.015) นาโนโมลาร์/มิลลิกรัม, 1.875 (99% CI, 1.557-2.565) นาโนโมลาร์/มิลลิกรัม, 1.529 (99% CI, 1.364-2.321) นาโนโมลาร์/มิลลิกรัม, 1.584 (99% CI, 1.419-2.385) นาโนโมลาร์/มิลลิกรัม และ 1.650 (99% CI, 1.368-2.119) นาโนโมลาร์/มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระดับของ PC content ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I-IV มีค่าสูงกว่ากลุ่มสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.001) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของระดับของ PC content ระหว่างซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังทั้ง 4 ระดับ (รูปที่ 1)

การศึกษาพบว่าระดับ IMAในซีรั่มผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I-IV มีค่ามัธยฐาน (Absorbance unit) 0.508 (95% CI, 0.494-0.524) 0.497 (95% CI, 0.480-0.514), 0.508 (95% CI, 0.486-0.516) 0.525 (95% CI, 0.511-0.545) และ0.511 (95% CI, 0.504-0.537) ตามลำดับ เมื่อนำมา

ทดสอบทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มผู้มีสุขภาพดีเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังทั้ง 4 ระดับ ($P > 0.05$) (รูปที่ 2)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ ระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่มของผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I-IV

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของ ระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่มของผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I-IV พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ของระดับของ PC content และ IMA ในกลุ่มผู้มีสุภาพดี ($r = -0.238$, $P = 0.311$) และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I ($r = 0.365$, $P = 0.188$) ระดับ II ($r = 0.843$, $P = 0.724$) ระดับ III ($r = 0.015$, P=0.947), ระดับ IV ($r = 0.096$, $P = 0.687$) (รูปที่ 3)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ภาวะเครียดออกซิเดชั่น หมายถึง ภาวะที่มีความไม่สมดุลของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระเป็นผลเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระหรือการที่มีสารต้านอนุมูลอิสระลดลงทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในร่างกายส่งผลให้เซลล์ภายในร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลาย[4] อนุมูลอิสระจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลบางชนิด เช่น ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลิอิค โดยกระบวนการที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลโดยเพาะอย่างยิ่งโปรตีน จะทำให้เกิดหมู่ functional group ใหม่ เช่น กลุ่ม hydroxyl และ กลุ่ม carbonyl[13-16] ซึ่งเป็นผลจากกระบวนการหลายกระบวนการแตกต่างกันออกไป และสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

เชิงโมเลกุลดังกล่าว ผลจากการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุลที่กล่าวมาข้างต้นนั้นคือเกิดการแตกเป็นสายสั้น การผสานแขนง หรือ การคลี่ออกของโมเลกุลของโปรตีน[12] ซึ่งกระบวนการทั้งหลายเหล่านี้ จะสอดคล้องกับระดับความรุนแรงของการปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุลโดยอนุมูลอิสระ โปรตีน IMA และ PC เป็นโปรตีนที่พบว่าถูกเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลโดยอนุมูลอิสระ ซึ่งพบได้ในหลายพยาธิสภาพ เช่น กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ภาวะไตขาดเลือด เป็นต้น[11,17-21] ทำให้มีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการเป็นสารบ่งชี้ที่มีความไวในการบ่งชี้การทำงานของอวัยวะ[12] การศึกษาของผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ระดับ I-IV เพื่อศึกษาถึงประโยชน์ของการวิเคราะห์ระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่ม ในการวินิจฉัย พยากรณ์ ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ผลการศึกษาพบว่าระดับของ PC contentในซีรั่ม เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเมื่อเทียบกับผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) ถึงแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างของระดับของ PC content ในแต่ละระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของ IMA ในซีรั่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับผู้มีสุขภาพดี และในแต่ละระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง (P>0.05) ชี้ให้เห็นว่าการวิเคราะห์ระดับของ PC content ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง มีความไวเชิงวิธีวิเคราะห์ (method sensitivity) สูงกว่าการวิเคราะห์ระดับ IMA ในซีรั่ม ซึ่งการมีความไวเชิง

วิธีวิเคราะห์ ของ PC content ที่สูงกว่า IMA นั้นไม่เพียงแต่พบในการศึกษาในภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเท่านั้น แต่ยังพบในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดด้วย ดังรายงานการศึกษาของกฤษณี มณีวงศ์และคณะที่พบว่าความไวเชิงวิธีวิเคราะห์ของ PC content มีความไวสูงกว่าการวิเคราะห์ปริมาณของ IMA ในการวินิจฉัยผู้ป่วยภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดชนิด เอส-ที ไม่ยก (Non-ST Elevation Myocardial infarction; NSTEMI) และ ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดชนิด เอส-ที ยก (ST Elevation Myocardial infarction; STEMI)[12,22] และการตรวจวิเคราะห์ระดับ PC content พบว่า มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังสอดคล้องกับการศึกษาของ Radovanovic และคณะที่พบว่า reactive carbonyl derivatives จะมีระดับเพิ่มสูงขึ้นในซีรั่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง แต่จะไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง[23] ซึ่งคณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่า ระดับของ PC content ในซีรั่ม ที่ไม่แตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังในการศึกษานี้เป็นผลจากการปรับตัวของร่างกายโดยผู้ที่อยู่ในสภาพของหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ร่างกายมีกระบวนการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงในร่างกาย ประกอบกับภาวะเครียดออกซิเดชั่นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังอาจจะมีระดับความเครียดสูงอยู่ก่อนแล้วเป็นพื้นฐาน ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของโปรตีนไปแล้ว ทำให้ระดับของโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยภาวะเครียดออกซิเดชั่น มีปริมาณในซีรั่มสูง ดังนั้นเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจึงไม่เห็นความแตกต่างเพราะอาจเกิดกระบวนการ oxidatively modified protein ที่มีมากอยู่แล้ว ดังนั้นทั้งระดับของ PC content หรือ IMA อาจไม่เหมาะสมในการแยกระดับความรุนแรงในผู้ป่วยภาวะหัวใจ

ล้มเหลวเรื้อรังได้ แต่อาจใช้ระดับของ PC content ในการแยกผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังได้เท่านั้น ซึ่งเมื่อระดับความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น อาจต้องใช้การตรวจวิเคราะห์ระดับ oxidative stress marker อื่นๆ อาทิ Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็น Lipid peroxidation หรือ สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น glutathione เพื่อใช้ในการพิจารณาร่วมด้วย[22]

ข้อจำกัดของการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ การไม่ได้ตรวจวิเคราะห์ ระดับ oxidative modifications ทั้งหมดของ protein เช่นการเปลี่ยนจาก tyrosine ไปเป็น 3-chlorotyrosine, 3-nitrotyrosine, dityrosine หรือ methionine oxidation รวมไปถึง oxidative stress marker และ antioxidant enzyme อื่นๆ เช่น MDA, Glutathione นอกจากนี้พบว่ามีความแตกต่างของอายุ ของอาสาสมัครกลุ่มสุขภาพดี กับ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ II , III และ IV อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ กฤษณี และคณะพบว่าอายุไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของ PC content[12]

สรุปผลการศึกษา พบว่า ระดับของ PC content ในซีรั่มของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังมีค่าสูงกว่าในผู้มีสุขภาพดี และไม่พบความแตกต่างนี้ในการวิเคราะห์ IMA ในซีรั่มของทุกกลุ่มทดลอง นอกจากนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ PC content และ IMA ในซีรั่ม ทั้งในผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร รหัสโครงการ R2554C053 ขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการศึกษาครั้งนี้ คณะสหเวชศาสตร์ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิเคราะห์ผล โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. ผ่องพรรณ อรุณแสง. แนวคิดเกี่ยวกับโรคหัวใจและหลอดเลือดที่สำคัญสำหรับพยาบาล : ภาวะหัวใจล้มเหลว. ใน การพยาบาลผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด. พิมพ์ครั้งที่ 6. ขอนแก่น : โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา 2551; 111-166.
2. วรรณวรางค์ วงศ์เจริญ. Clinical assessment of heart failure. ใน อภิชาต สุคนธสรรพ์ รังสฤษฎ์ กาญจนะวณิชย์ บรรณาธิการ. Heart failure. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ไอแอมออร์เกไนเซอร์แอนด์แอ๊ดเวอร์ไทซิ่ง 2547; 1-16.
3. Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M, Trawinski J, et al. The influence of age, sex and other variables on the plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population. Heart 2003; 89(7): 745-51

4. Grieve DJ, Shah AM. Oxidative stress in heart failure more than just damage. Eur Heart J 2003 Dec; 24(24): 2161-3.

5. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. J Clin Invest 2005; 115(3): 500-8.

6. Heymes C, Bendall J K, Ratajczak J, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. J Am Coll. Cardiol2003;18(41): 2164-71.

7. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M , Shah AM. Activation of NADPH Oxidase During Progression of Cardiac Hypertrophy to Failure. Hypertension 2002; 40(4): 477-84.

8. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, SingalPK. Free radicals and the heart. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 1993; 30(2): 55-67.

9. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases .Trends Mol Med 2003;9(4): 169-176.

10. Dalle-Donne I, Rossi R., Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. ClinChimActa 2003; 329(1-2): 23-38.

11. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. Free RadicBiol Med 1999; 27 (9-10):1080-6

12. Maneewong K, Mekrungruangwong T, Luangaram S., Thongsri T, Kumphune S. Combinatorial Determination of Ischemia Modified Albumin and Protein Carbonyl in the Diagnosis of Non ST-Elevation Myocardial Infarction. Ind J ClinBiochem. 2011; 26(4):389-95

13. Marx G, Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate. Biochem J 1986 Jun 1;236(2):397-400.

14. Gidenne S, Ceppa F, Fontan E, Perrier F, Burnat P. Analytical performance of the Albumin Cobalt Binding (ACB) test on the Cobas MIRA Plus analyzer. Clin Chem Lab Med 2004 Apr;42(4):455-61.

15. Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. Heart 2006 Jan;92(1):113-4.

16. Govender R, De GJ, Delport R, Becker PJ, Vermaak WJ. Biological variation of ischaemia-modified albumin in healthy subjects. Cardiovasc J Afr 2008 May;19(3):141-4.

17. Apple FS, Wu AH, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate J, et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. Clin Chem 2005;51(5):810-24.

18. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial infarction - a preliminary report. J Emerg Med 2000; 19(4): 311-5

19. Kiyici A, Mehmetoglu I, Karaoglan H, Atalay H, Solak Y, Turk S. Ischemia-modified albumin levels in patients with end-stage renal disease patients on hemodialysis: does albumin analysis method affect albumin-adjusted ischemia-modified albumin levels? J Clin Lab Anal 2010;24(4):273-7.

20. Turedi S, Cinar O, Yavuz I, Mentese A, Gunduz A, Karahan SC, et al. Differences in ischemia-modified albumin levels between end stage renal disease patients and the normal population. J Nephrol 2010;23(3):335-40.

21. Melanson SF, Tanasijevic MJ. Laboratory diagnosis of acute myocardial injury. Cardiovasc Pathol 2005;14(3):156-61.

22. Kamphune S, Mekrungruangwong T, Luangaram S, Putaloon A, Yathongchai A, Intuyot K, et al. Diagnostic performance of combinatorial determination of ischemia modified albumin and protein carbonyl in ST elevation myocardial infarction. J Med Tech. Assoc Thailand 2010; 38(3);3415-31

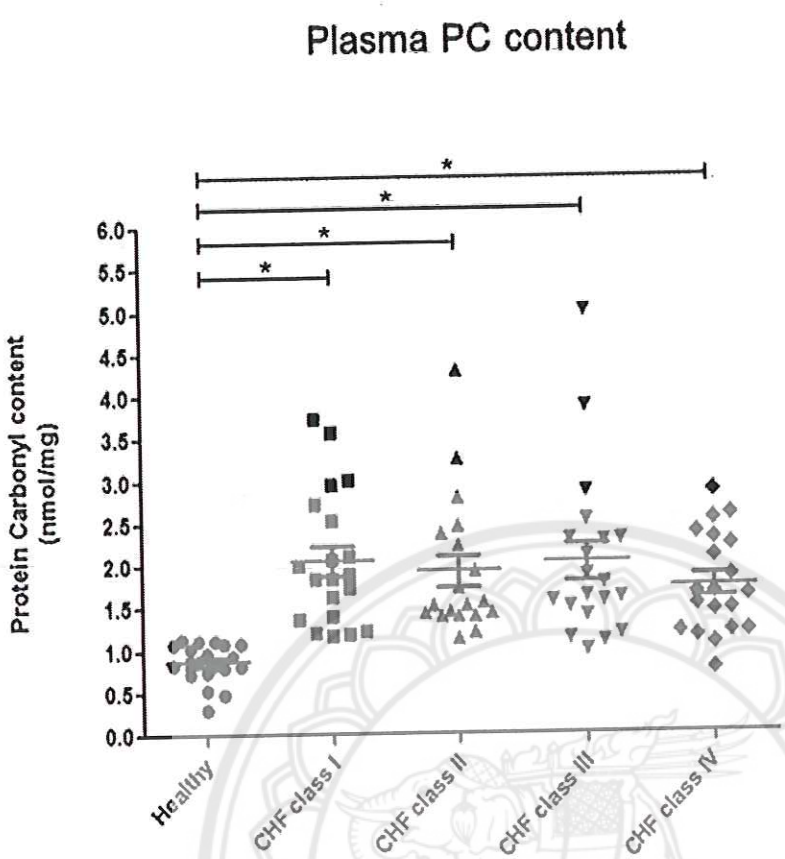
23. Radovanovic S, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Djukic T, Suvakov S, Krotin M, et al. Marker of oxidative damage and antioxidant Enzyme activities as predictors of morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. J Card Fail 2012; 18(6):493-501.

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเรื้อรัง

		Healthy subject	Chronic Heart Failure			
			Class I	Class II	Class III	Class IV
Number (person)		20	20	20	20	20
Gender	Male	5	14	12	14	16
	Female	15	6	8	6	4
Age (Mean±SD)		47.6±15.29	54.7±15.95	62.8±15.22*	64.4±16.75*	63.05±11.21*

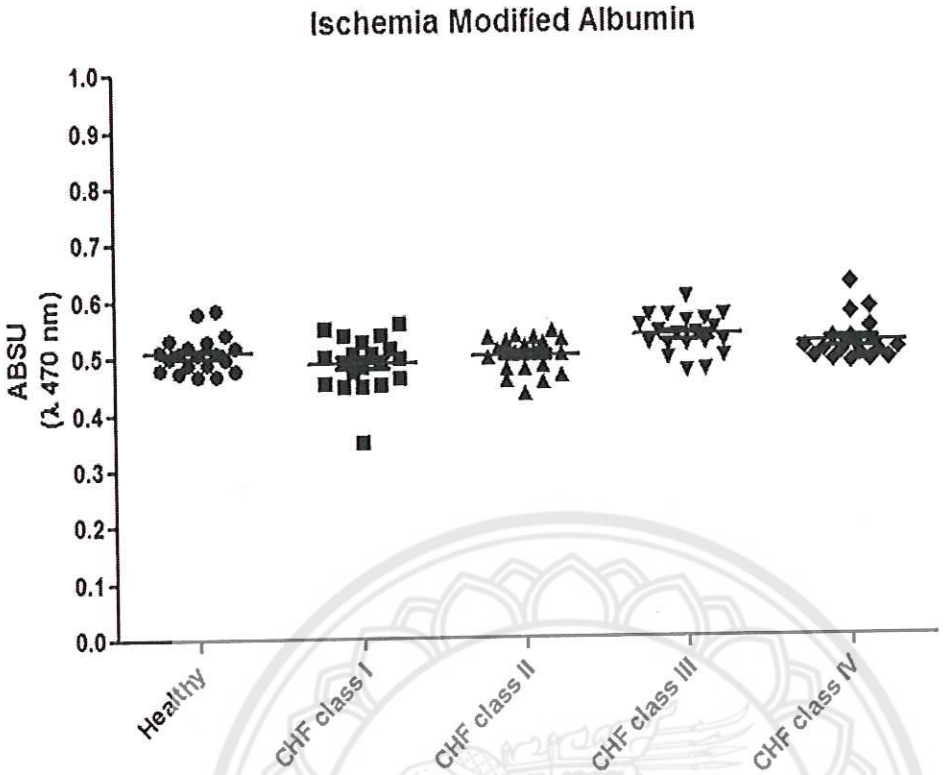
analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test

* เปรียบเทียบกับกลุ่มสุขภาพดี กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P<0.05$

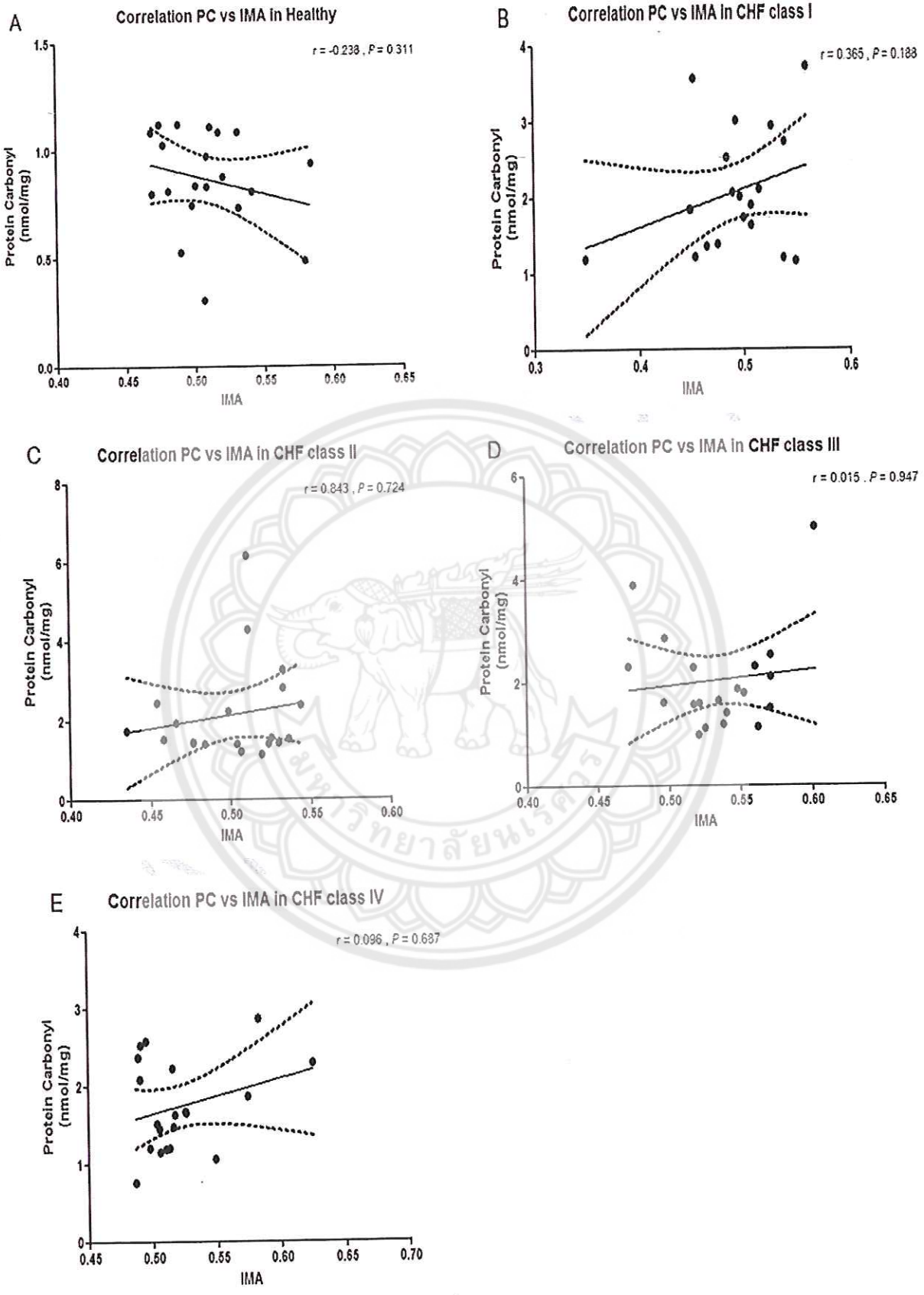


รูปที่ 1

* เปรียบเทียบกับกลุ่มสุขภาพดี ที่ $P < 0.001$


Ischemia Modified Albumin
ABSU
(λ 470 nm)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Healthy
CHF class I
CHF class II
CHF class III
CHF class IV

รูปที่ 2


A
Correlation PC vs IMA in Healthy
r = -0.238 , P = 0.311
Protein Carbonyl (nmol/mg)
IMA
B
Correlation PC vs IMA in CHF class I
r = 0.365 , P = 0.188
Protein Carbonyl (nmol/mg)
IMA
C
Correlation PC vs IMA in CHF class II
r = 0.843 , P = 0.724
Protein Carbonyl (nmol/mg)
IMA
D
Correlation PC vs IMA in CHF class III
r = 0.015 , P = 0.947
Protein Carbonyl (nmol/mg)
IMA
E
Correlation PC vs IMA in CHF class IV
r = 0.096 , P = 0.687
Protein Carbonyl (nmol/mg)
IMA

รูปที่ 3

รูปที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบระดับ Protein carbonyl ของกลุ่มสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ระดับ I-IV โดยมีค่า P <0.001

รูปที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบระดับ Ischemia modified Albumin ของกลุ่มสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ระดับ I-IV โดยมีค่า P = 1.616 , 1.080, 2.402 และ 1.513 ตามลำดับ

รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง PC และ IMA ในซีรั่มผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ระดับ I-IV รูป A คือ ผู้มีสุขภาพดี (r = -0.238, P = 0.311) รูป B คือผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ I (r= 0.365, P=0.188) รูป C คือผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ II (r = 0.843, P = 0.724) รูป D คือ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ III (r = 0.015, P = 0.947) และรูป E คือผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ IV (r = 0.096, P = 0.687)