บทที่ 4

อธิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 ประเมินวิธีการตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสในเลือดคน

ผลจากการวัดความแม่นยำของการวัดสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสในเลือดคนปกติทำการวัดทั้งหมด 10 ครั้ง ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (%CV) ของสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสมีค่าเท่ากับ 3.81% ซึ่งค่า %CV ที่วัดได้ใกล้เคียงกับการวัดสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้า ของ Hegesh และคณะ (1984) ที่ได้ปรับปรุงวิธีการตรวจสมรรถนะเอนไซม์โดยใช้ปริมาณเลือดน้อยๆ โดยค่า %CV ที่วัดได้มีค่า 6.2% (Hegesh and Kaftory,1984) ซึ่งเป็นค่าความคาดเคลื่อนของการทดลองนี้เป็นที่ยอมรับได้ ในการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ทำการวัดค่าความคงตัวของสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส เนื่องจากมีรายงานแล้วว่า ถ้าใส่เลือดที่เจาะได้ในหลอดทดลองที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็ง เช่น acid-citrate-dextrose solution (ACD) จะสามารถคงสภาพเอนไซม์ได้นาน 16 ชั่วโมง เมื่อเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4^0 ซ. ส่วนเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA เก็บภายใต้อุณหภูมิ 4^0 ซ. จะคงสภาพของเอนไซม์ไม่เกิน 12 ชั่วโมง (Hegesh, 1968) ในการทดลองครั้งนี้จึงทำการตรวจวัดทันทีหลังเจาะเลือด

4.2 ผลการวัดปริมาณเมทฮีโมโกลบินในคนปกติ โดยแบ่งตามเพศ และอายุ

เมทฮีโมโกลบินเป็นอนุพันธ์หนึ่งของฮีโมโกลบิน ที่เกิดจากออกซิไดซ์ของ Fe^{2+} (Ferrous form) ของฮีโมโกลบินไปอยู่ในรูปของ Fe^{3+} (Ferric Form) ทำให้แขนตรงตำแหน่งที่ 6 ไปจับกับโมเลกุลของน้ำ หรือ ไฮดรอกซีกรุ๊ปทำให้ไม่สามารถจับกับออกซิเจนและไม่สามารถนำออกซิเจนไปส่งให้กับเนื้อเยื่อต่างๆได้ โดยปกติฮีโมโกลบินในร่างกายสามารถเกิดออโตออกซิไดส์เป็นเมทฮีโมโกลบินได้ไม่เกิน 1% และร่างกายจะมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินกลับเป็นฮีโมโกลบินได้ ค่าการดูดกลืนแสงของเมทฮีโมโกลบินมีค่าเท่ากับ 630 นาโนเมตร ซึ่งแตกต่างจากออกซีฮีโมโกลบิน และดีออกซีฮีโมโกลบิน เมทฮีโมโกลบินมีคุณสมบัติพิเศษคือ มีความเป็นประจุบวกสูงโดยแขนตรงตำแหน่งที่ 6 ของ Fe^{3+} สามารถที่จะจับกับแอนอิออน (anion)ต่างๆได้ดี ดังนั้นเมื่อเติมไซยาไนด์ลงไปในเลือด (ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปแตสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ในการทดลอง)

หรือฮีโมลัยเสกต์(hemolysate) ไซยาไนด์จะเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินเป็นไซยาโนเมทฮีโมโกลบิน (cyanomethemoglobin) ทำให้ค่าดูดกลืนแสงต่ำกว่า 630 นาโนเมตร (Mansouri and Lurie, 1993) นอกจากนี้การตรวจวัดเมทฮีโมโกลบินจะต้องทำทันที เนื่องจากเมทฮีโมโกลบิน จะไม่คงตัว ถึงแม้จะเก็บในตู้เย็น และจะเปลี่ยนเป็นฮีโมโกลบินเร็วมากเมื่อตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (สุกัญญา เจริญศรี, 2540)

4.2.1 ปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเพศชายโดยแบ่งตามช่วงอายุ

ถึงแม้ว่าปริมาณเมทฮีโมโกลบินจะมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นตามอายุ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในการทดลองในครั้งมีพบว่า ในเพศชายมีปริมาณเมทฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นตามช่วงอายุ ปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่วัดได้ในเพศชายตั้งแต่อายุ 20 – 50 ปีขึ้นไป มีปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือด 0 – 0.38 % ซึ่งเป็นค่าปกติที่สามารถพบได้ในเลือดคนปกติ (ปกติพบประมาณ 1%) (Mansouri and Lurie, 1993)

4.2.2 ปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเพศหญิงโดยแบ่งตามช่วงอายุ

ปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเพศหญิงที่มีอายุในช่วงระหว่าง 20 – 30 ปี จะไม่พบว่ามีเมทฮีโมโกลบินในเลือดเช่นเดียวกับในเพศชาย แต่ในเพศหญิงพบว่า ช่วงอายุระหว่าง 31 – 40 ปี และ 41 – 50 ปี มีปริมาณเมทฮีโมโกลบินสูงกว่ากลุ่มที่มีอายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากการศึกษาเพศหญิงทั้ง 4 กลุ่ม มีค่าเมทฮีโมโกลบินในเลือดเท่ากับ 0 – 0.40 % และเป็นค่าปกติที่พบได้ในร่างกาย (Mansouri and Lurie, 1993)

4.3 ผลของสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ที่วัดได้จากคนปกติโดยแบ่งตามเพศ และช่วงอายุ

สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ในร่างกายของคนมีด้วยกัน 2 รูปแบบ คือ รูปแบบที่ละลายน้ำ (soluble form) และ รูปแบบที่ยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound form) (Hultquist and Passon, 1971) โดยไซโตโครมบีห้ารีดักเตสรูปแบบละลายน้ำจะเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่หลักในการรีดิวส์เมทฮีโมโกลบินกลับเป็นฮีโมโกลบินถึง 95%

(Scott, Duncan and Ekstand, 1965) คุณสมบัติของสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร และปฏิกิริยาจะเกิดได้สมบูรณ์จะต้องอาศัยสาร NADH ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ใช้ในการทดลองหาสมรรถนะเอนไซม์ดังกล่าวในครั้งนี้ (Hegesh, Calmanovici and Avron, 1968; Beutler et al., 1977)

การศึกษาสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ประยุกต์ใช้วิธีของ Hegesh และคณะ (1968) โดยอาศัยปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

$$\text{Met.Hb } (Fe^{3+}) + \text{NADH} + H^{+} \longrightarrow \text{Hb}(Fe^{2+}) + NAD^{+}$$

จากปฏิกิริยาข้างบนพบว่า สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส มีผลกับปริมาณ methemoglobin- ferrocyanide complex โดยวัดปริมาณ methemoglobin- ferrocyanide complex ที่เกิดจากการเติมสาร ferricyanide ให้กับปฏิกิริยา

4.3.1 ผลการศึกษาสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ในเพศชายแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามช่วงอายุ

ผลการศึกษาพบว่า เพศชายที่มีอายุน้อยจะมีสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสต่ำกว่าเพศชายที่มีอายุมากกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสที่วัดได้ในเพศชายในช่วงอายุระหว่าง 20 – 60 ปี มีค่าอยู่ระหว่าง 2.73 – 4.2 unit/min/g of hemoglobin ซึ่งได้ค่าที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Beutler และคณะ (1977) ในผู้ใหญ่โดยไม่แบ่งตามเพศและอายุคือ 2.5 – 4.3 unit/min./g of hemoglobin โดยที่ 1 unit = μmole of NADH cytochrome b_5 reductae (Beutler et al.,1977)

4.3.2 ผลการศึกษาสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสในเพศหญิงโดยแบ่งตามช่วงอายุ

ผลจากการศึกษาในเพศหญิงพบว่าเพศหญิงที่มีอายุระหว่าง 20 – 30 ปี และ 31 – 40 ปีจะมีสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ต่ำกว่า เพศหญิงที่มีอายุระหว่าง 41 – 50 ปีอย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติ แต่ในช่วงระหว่างอายุ 31 – 40 ปี และ 41 – 50 ปี มีสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส สูงกว่าเพศหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 50 ปี ขึ้นไป สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสที่วัดได้ในเพศหญิงในช่วงอายุระหว่าง 20 – 60 ปี มีค่าอยู่ระหว่าง 2.78 – 4.26 unit/min/g of hemoglobin ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 4.3.1

4.4 ผลการศึกษาปริมาณเมทฮีโมโกลบิน และสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสในเลือดคนปกติโดยเปรียบเทียบระหว่างเพศในช่วงอายุเดียวกัน

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณเมทฮีโมโกลบินระหว่างเพศชายและเพศหญิงทั้ง 4 กลุ่มพบว่า เพศชายที่มีช่วงอายุระหว่าง 31 – 40 ปีเท่านั้นที่มีปริมาณเมทฮีโมโกลบิน ต่ำกว่าในเพศหญิงที่มีช่วงอายุเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสที่วัดได้ในเพศหญิงทุกช่วงอายุ มีความแตกต่าง และมีค่าสูงกว่า สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสที่วัดได้ในเพศชายที่มีอายุเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Panin และคณะ (1984) ที่รายงานว่าเพศชายและเพศหญิงในช่วงอายุระหว่าง 23 – 40 ปี ไม่พบว่ามีความแตกต่างของสมรรถนะเอนไซม์ดังกล่าว แต่การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Moore และคณะ (1982) ที่ศึกษาในคนชนชาติ Jewish ในช่วงอายุระหว่าง 12 – 77 ปี พบว่า เพศชายจำนวน 270 คน มีสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ต่ำกว่าในเพศหญิงจำนวน 285 คนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.03$ (Moore et al., 1982) อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของช่วงอายุในการศึกษาทดลอง อาจมีส่วนทำให้ได้ผลที่แตกต่าง นอกจากเพศแล้ว พันธุกรรม, เชื้อชาติ ก็ยังมีผลทำให้สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสแตกต่างกันไป

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทฮีโมโกลบิน และสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสในคนปกติ

ในคนปกติปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสเพิ่มขึ้นตาม

หมายเหตุ : ผลการศึกษาตั้งแต่ ข้อ 4.2 – 4.5 ในครั้งนี้ยังไม่ถือว่าเป็นตัวแทนของเพศชายและเพศหญิงของประเทศไทย เนื่องจากยังไม่ครอบคลุมประชากรทั่วภูมิภาคในประเทศไทย

4.6 สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส และปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา nitroglycerin ทางหลอดเลือดดำ

ผู้ใหญ่ที่มีสภาวะเมทฮีโมโกลบินในเลือดสูงที่ได้รายงานมีสาเหตุเกิดจาก การได้รับยาที่มีฤทธิ์ออกซิไดส์ หรือได้รับยาในกลุ่มไนไตรท เช่น glyceryl trinitrate (nitroglycerin) (Bruning-Fann and Kaneene, 1993) nitroglycerin จัดอยู่ในกลุ่มของ organic nitrate เป็นยาที่ใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นยาที่ถูกเลือกมาใช้ในการรักษาอาการปวดเค้นอกเนื่องจากหัวใจขาดเลือด เมื่อยาเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับ และอวัยวะส่วนปลายต่างๆในร่างกาย โดยเอนไซม์ glutathione เป็นไนตริก (Kaplan et al., 1985) ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเกิดสภาวะเมทฮีโมโกลบินในเลือดสูงได้ โดยไนตริกจะไปเปลี่ยนออกซีฮีโมโกลบินเป็นเมทฮีโมโกลบิน

ผลการศึกษาในผู้ป่วยที่มีอายุระหว่าง 50 – 65 ปี ได้รับยา nitroglycerin ทางหลอดเลือดดำในขนาด 24,000 –104,000 ไมโครกรัม โดยให้อัตราเร็ว 0.1 – 3 ไมโครกรัม/กก./นาที พบว่าในเพศชายมีปริมาณเมทฮีโมโกลบิน และสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ไม่แตกต่างจากเพศหญิง

เมื่อเทียบกับคนปกติพบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับยาจะมีปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่วัดได้ในผู้ป่วยที่ได้รับยามีค่า 0.10 ± 0.03 (mean $\pm$ SE) จัดว่าเป็นค่าปกติที่พบได้ในร่างกาย ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณยาที่ผู้ป่วยได้รับยังไม่สูงที่จะทำให้เกิดเมทฮีโมโกลบินในเลือดสูงได้ นอกจากนี้จึงเป็นขนาดยาที่ใช้ในการรักษาที่ยอมรับได้ คือประมาณ 0.5 – 3.0 μg/kg/min (Husum, Lindeburg and Jacobsen,1982) จากการศึกษาของ Kaplan และคณะ (1985) รายงานว่า ขนาดของยา nitroglycerin ทางหลอดเลือดดำที่ให้ในอัตราเร็ว 290 ± 13 μg/min (4.1 ± 0.2 μg/kg/min) เป็นระยะเวลา 7.1 ± 0.5 วัน จะมีปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดเพิ่ม 1.57 ± 0.08 % โดยที่ปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดยาที่สูงขึ้น (Kaplan et al., 1985) จึงเป็นไปได้ว่าขนาดยาที่ได้รับ และระยะเวลาที่ผู้ป่วยได้รับยาในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่มากพอที่จะทำให้เกิดเมทฮีโมโกลบินสูงได้

นอกจากเมทฮีโมโกลบินที่สูงกว่าปกติเล็กน้อยแล้ว ยังพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา nitroglycerin ทางหลอดเลือดดำจะมีสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส สูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานการศึกษาถึง nitroglycerin ต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสมาก่อน และเมื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างเมทฮีโมโกลบินกับสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสในผู้ป่วยที่ได้รับยาพบว่า เมื่อปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดสูงขึ้นมีผลทำให้สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสสูงขึ้นตามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Gupta และคณะ (1999) ที่ทำการศึกษาในคนที่ดื่มน้ำที่ปนเปื้อนไนไตรทที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันแล้วพบว่า ความเข้มข้นของไนไตรทที่สูงขึ้น จะไปมีผลทำให้ฮีโมโกลบินออกซิไดส์เป็นเมทฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้น และเมทฮีโมโกลบินที่เพิ่มขึ้นมีความเกี่ยวข้องกันกับการเกิดปากอักเสบ (stomatitis) และสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส ที่สูงขึ้นเพื่อทำหน้าที่รีดิวส์เมทฮีโมโกลบินต่อไป Gupta และคณะได้เสนอแนะว่าการที่สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส สูงขึ้นนั้นอาจเป็นผลจากการเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของไนไตรทที่ความเข้มข้นสูง (Gupta et al., 1999)

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสและสภาวะเมทฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดของผู้ป่วยที่ได้รับยา nitroglycerin เปรียบเทียบกับคนปกติที่มาบริจาคเลือดให้กับสภากาชาดไทยพอที่จะได้ข้อสรุปที่สำคัญดังต่อไปนี้

1. ปริมาณของเมทฮีโมโกลบินจากคนปกติที่มาบริจาคเลือดให้กับสภากาชาดไทยมีความเข้มข้นโดยเฉลี่ย 0.06 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนฮีโมโกลบินทั้งหมดในร่างกาย (mean $\pm$ SE)
2. ปริมาณของเมทฮีโมโกลบินในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในหน่วยวิกฤต โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้รับการรักษาด้วยยา nitroglycerin จนได้ขนาด 24,000 – 104,000 ไมโครกรัม มีความเข้มข้นในเลือดโดยเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.10 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนฮีโมโกลบินทั้งหมดในร่างกาย (mean $\pm$ SE)

3. ปริมาณของเมทฮีโมโกลบินทั้งสองกลุ่มจากข้อ 1 และข้อ 2 ที่วัดได้มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ แต่ปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่วัดได้ทั้ง 2 กลุ่มถือว่าอยู่ในค่าปกติที่พบได้ในร่างกายปกติ

4. สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสที่วัดได้จากคนปกติที่มาบริจาคเลือดให้กับสภากาชาดไทยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.22 ± 0.04 unit/min/g of hemoglobin (mean $\pm$ SE) ไม่พบคนที่มีสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสผิดปกติ แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเพศชายมีสมรรถนะเอนไซม์ต่ำกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ อย่างไรก็ตามสมรรถนะเอนไซม์ที่วัดได้เป็นตัวแทนของคนที่มาบริจาคเลือดให้กับสภากาชาดไทยเท่านั้นไม่ได้เป็นตัวแทนของคนไทยทั้งประเทศ

5. สมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตสที่วัดได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ได้รับการรักษาด้วยยา nitroglycerin จนได้ขนาดยา 24,000 – 104,000 ไมโครกรัม มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.34 ± 0.06 unit/min/g of hemoglobin (mean $\pm$ SE) พบว่าแตกต่างจากกลุ่มคนปกติที่มาบริจาคเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

จะเห็นได้ว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา nitroglycerin ทางหลอดเลือดดำในขนาด 24,000 –104,000 ไมโครกรัม จะมีปริมาณเมทฮีโมโกลบินและสมรรถนะเอนไซม์ไซโตโครมบีห้ารีดักเตส สูงกว่าในคนปกติ แต่เป็นค่าที่ยอมรับได้จึงเป็นข้อควรระมัดระวังในการให้การรักษาผู้ป่วยต่อการใช้ nitroglycerin ในขนาดรักษาที่สูงกว่านี้ และเป็นระยะเวลานานๆ ซึ่งเป็นต้นเหตุทำให้เกิดสภาวะเมทฮีโมโกลบินสูงในเลือดได้