บทที่ 4

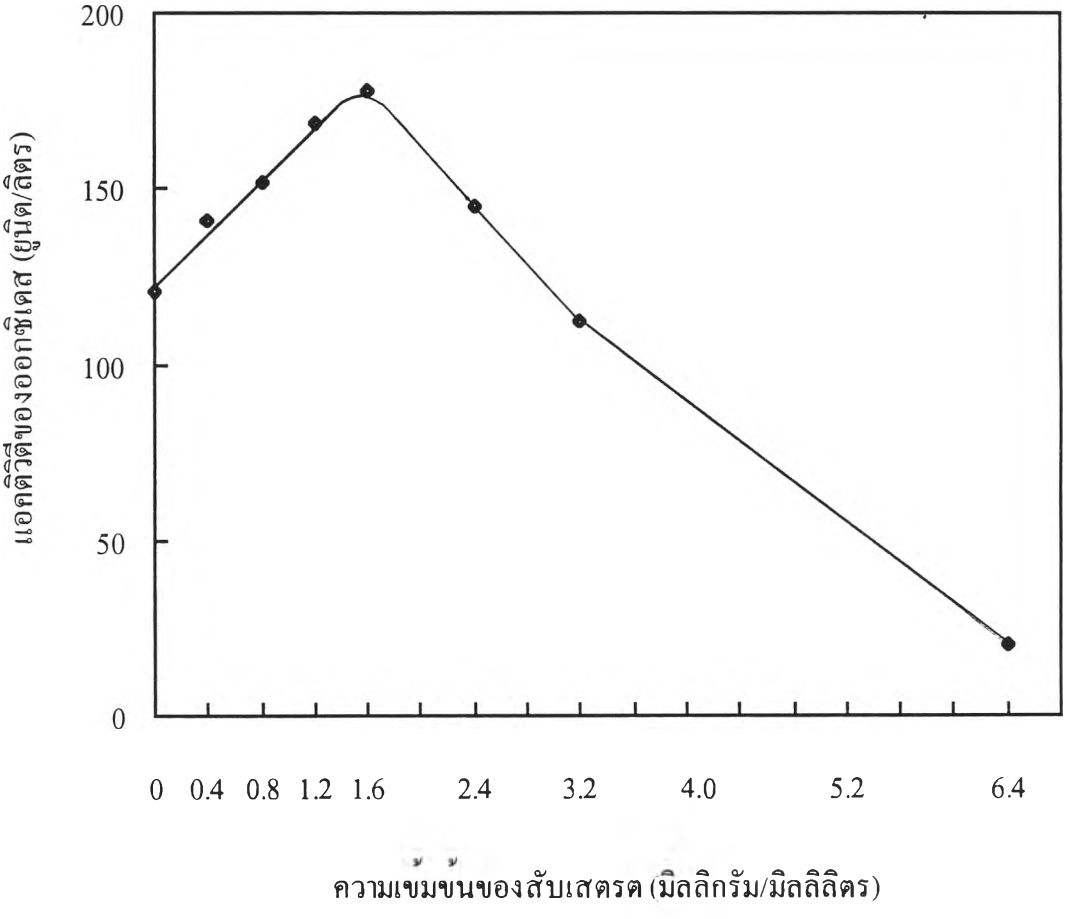
ผลการวิจัย และอภิปรายผล

4.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในซีรัมคน

จากงานของ Nomoto and Sunderman (1970) รวมถึง Wolf และคณะ (1973) ได้กำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน (oxidase activity of ceruloplasmin) ได้แก่สับเสตรตความเข้มข้นสุดท้ายในสารผสม (final concentration) เท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณซีรัม 0.1 มิลลิลิตรและปฏิกิริยาเกิดได้ดีที่พีเอช 6.0 ดังนั้นเพื่อความสมบูรณ์ในการวิเคราะห์ผู้วิจัยจึงศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ความเข้มข้นของสับสเตรต ความเข้มข้นของโซเดียมเอไซด์ที่ใช้ยับยั้งปฏิกิริยา ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา(initial velocity) ผลของเฮปาริน (heparin) ต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และความเสถียร โดยใช้ซีรัมปริมาตร 0.020 มิลลิลิตรต่อปริมาตรสารผสม 1.04 มิลลิลิตร (การเลือกใช้ปริมาณซีรัมอยู่ในข้อ 4.1.3)

4.1.1 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรตพาราฟีนิลีนไดอะมีนต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์จะได้ค่าถูกต้องแม่นยำเมื่อเอนไซม์มีความอิ่มตัวกับสับเสตรตเต็มที่เท่านั้น จากงานของ Wolf และคณะ (1973) กำหนดให้สับเสตรตพาราฟีนิลีนไดอะมีนความเข้มข้นสุดท้ายในสารผสม 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน ในงานวิจัยนี้จึงทดลองดูผลของความเข้มข้นของสับเสตรตต่อแอคติวิตี โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายของสับเสตรตตั้งแต่ 0.4 – 6.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งคลอบคลุมงานของ Wolf และคณะ ได้ผลดังรูปที่ 4.1 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน แล้วพบว่าผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสับเสตรตจนถึงจุดสูงสุดที่ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วลดลงในอัตราที่เร็วกว่าการเพิ่ม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงจุดสูงสุด ขณะเดียวกันมีอัตราการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์น้อยกว่าที่จุดสูงสุดจึงช่วยลดความแปรปรวนในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะจากการเตรียมสับเสตรตซึ่งต้องเตรียมใช้ใหม่ทุกครั้ง



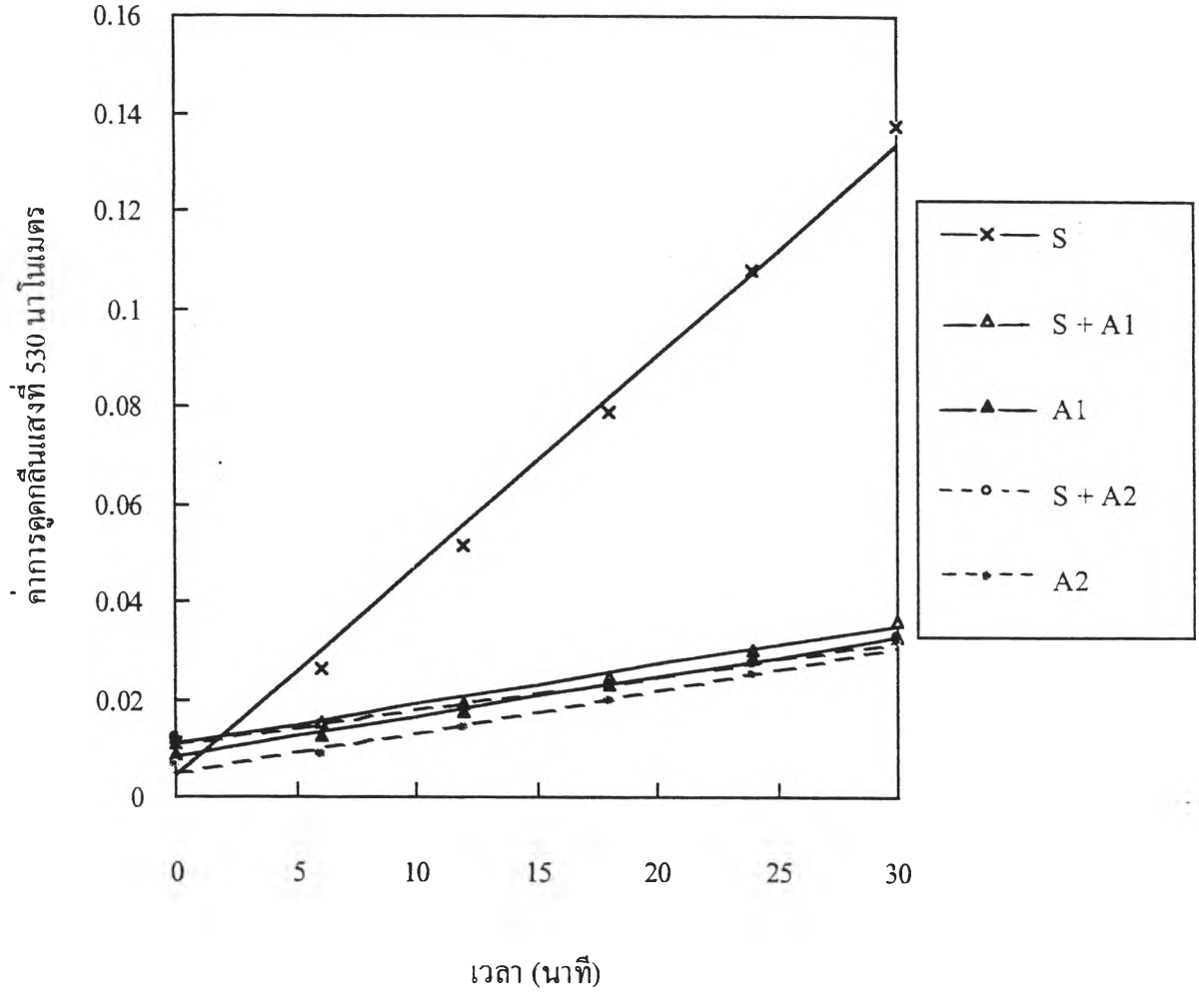
รูปที่4.1 ผลของสับสเตรตพาราฟีนิลีนไดอะมีนความเข้มข้นต่างๆ ต่อแอคติวิตีออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

รูปที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรตพาราฟีนิลีนไดอะมีนต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในซีรัมคนปกติ

วิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสตามวิธีข้อ 3.3.2 โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายของสับเสตรตตั้งแต่ 0.4 – 6.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้ซีรัม 0.020 มิลลิลิตร

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมเอไซด์ต่อการยับยั้งแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน หรือความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสับเสตรตเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ คำนวณจากความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ในหลอดควบคุมที่มีการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับหลอดทดสอบที่ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาเต็มที่ ดังนั้นจึงศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมเอไซด์ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาในหลอดควบคุมได้อย่างสมบูรณ์ (Complete inhibition) ได้ผลดังรูปที่ 4.2 เมื่อพิจารณาความสมบูรณ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาของโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.1 , 0.2 เปอร์เซ็นต์ แล้วพบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์หลอดที่มีซีรัมซึ่งเปรียบเสมือนหลอดควบคุมมีความเร็วเริ่มต้นเป็น (0.031-0.021) / 12 = **0.00083** เท่ากับหลอดที่ไม่มีซีรัมคือ (0.028-0.018) / 12 = **0.00083** สำหรับที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์พบว่าหลอดที่มีซีรัมมีความเร็วเริ่มต้น (0.032-0.023) / 12 = **0.00075** ซึ่งใกล้เคียงกับหลอดที่ไม่มีซีรัมคือ (0.03-0.02) / 12 = **0.00083** แสดงว่าโซเดียมเอไซด์ทั้งสองความเข้มข้นสามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ทั้งที่มีและไม่มีซีรัม และโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ไม่แตกต่างกันดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ก็เพียงพอแล้ว อย่างไรก็ตามมีการเกิดออกซิเดชันของสับเสตรตอันเนื่องจากสาเหตุอื่นในระหว่างการบ่มปฏิกิริยาเสมอดังจะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นในหลอดที่ไม่มีซีรัม



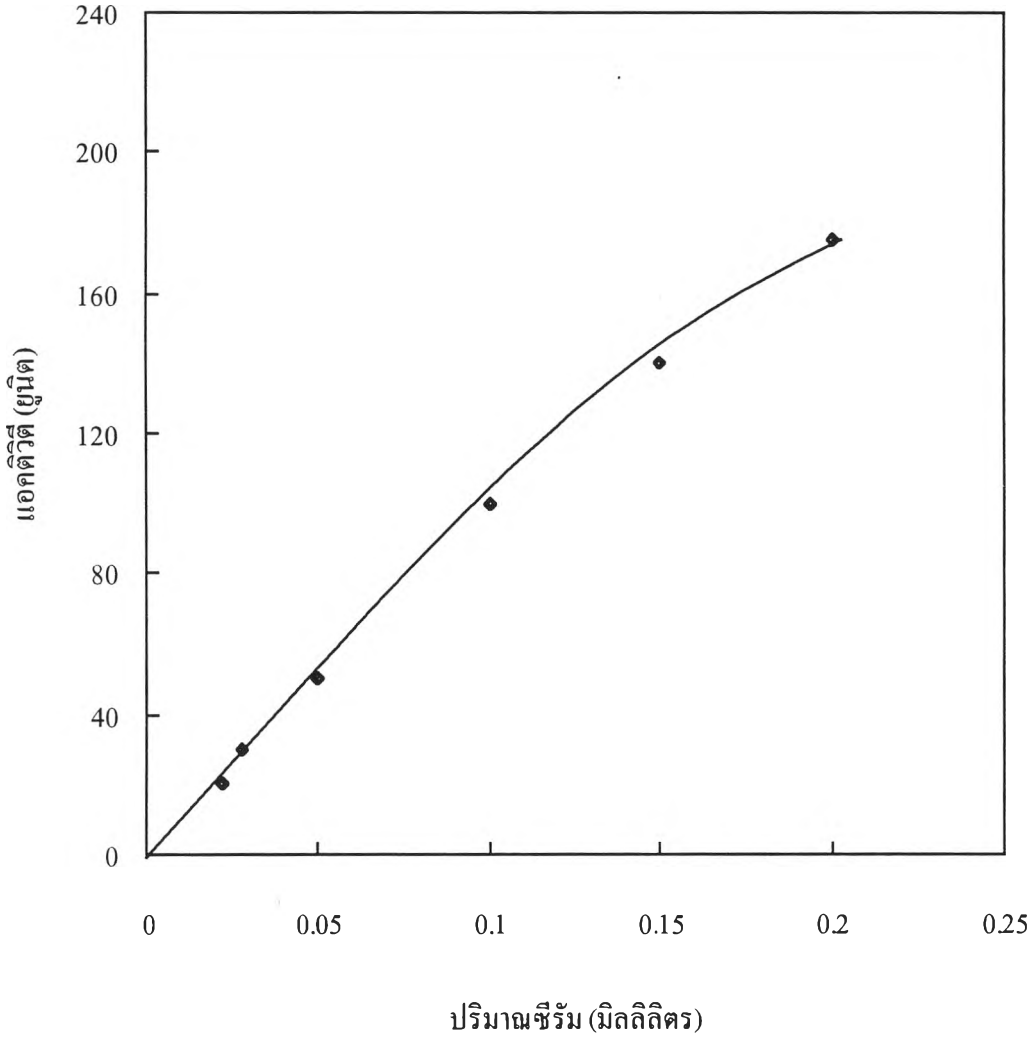
<u>รูปที่ 4.2</u> ผลของโซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.1 (A1) และ 0.2 (A2) เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

วิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสตามข้อ 3.3.2 โดยใช้โซเดียมเอไซด์ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งปฏิกิริยาในหลอดที่มีซีรัม (S) และไม่มีซีรัมปริมาตร 0.02 มิลลิลิตรวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 6 นาทีนับจากเริ่มใส่ซีรัม (นาทีที่ 0) จนครบ 30 นาที

4.1.3 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สับเสตรตของเซอรูโลพลาสมิน

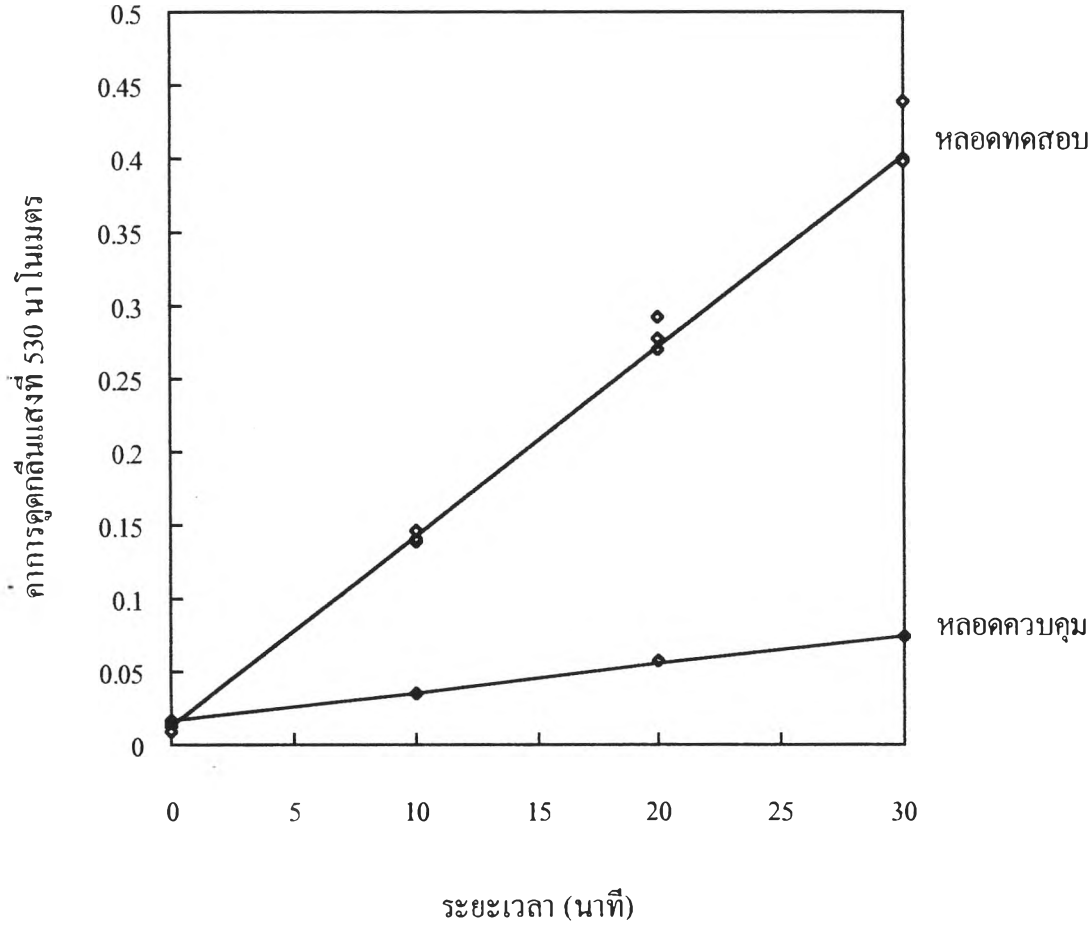
จากผลการศึกษาความเข้มข้นของสับเสตรตที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินตามข้อ 4.1.1 ได้เลือกความเข้มข้นที่ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงทดลองดูผลของสับเสตรตความเข้มข้นดังกล่าวต่อซีรัม 0.020 มิลลิลิตรว่ามีอัตราการเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อย่างสม่ำเสมอคือเป็นเส้นตรงตลอดระยะเวลาบ่มหรือไม่ เพราะการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ใดๆ ก็ตามจะคำนวณได้แม่นยำในช่วงที่มีสับเสตรตมากพอที่จะทำให้อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ต่อเนื่องสม่ำเสมอ และเป็นเส้นตรงซึ่งจะอยู่ในช่วงของความเร็วเริ่มต้นนั่นเอง

จากการศึกษาของ Nomoto and William (1970) ให้ใช้ซีรัม 0.1 มิลลิลิตรในสารผสมสุดท้าย (Total volume) 3 มิลลิลิตรซึ่งเริ่มพ้นจากความเร็วเริ่มต้นดังรูปที่ 4.3 เนื่องจากภายใต้สภาวะของการทดลองนี้ (ปริมาตรสารผสมสุดท้าย 1.04 มิลลิลิตร) การใช้ซีรัมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรอาจทำให้คำนวณค่าแอคติวิตีคลาดเคลื่อนได้ง่าย ฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงเปลี่ยนมาใช้ซีรัมปริมาตร 0.02 มิลลิลิตรซึ่งยังอยู่ในความเร็วเริ่มต้นและเป็นการประหยัดซีรัมด้วย ได้ผลดังรูปที่ 4.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเส้นแนวโน้มของค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรงตลอดระยะเวลาการบ่ม 30 นาที แสดงว่ามีสับเสตรตเหลือพอให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างสม่ำเสมอและคงที่ ฉะนั้นสามารถใช้สับเสตรตความเข้มข้นสุดท้ายในสารผสม 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้ซีรัม 0.02 มิลลิลิตรวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินได้ที่ 30 นาทีนับตั้งแต่เริ่มใส่ซีรัม



รูปที่ 4.3 ผลของปริมาณซีรัมต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน (ดัดแปลงจาก Nomoto and William , 1970)

วิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสตามข้อ 3.3.2 โดยใช้สับเสตรตความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารผสมปริมาตรรวมสุดท้าย 3 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.4 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการออกซิไดซ์สับเสตรตของเซอรูโลพลาสมิน

วิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสตามข้อ 3.3.2 โดยใช้สับเสตรตความเข้มข้นสุดท้าย 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 5 นาที จากเริ่มใส่ซีรัม 0.020 มิลลิลิตร (นาทีที่ 0) จนครบ 30 นาที

4.1.4 ผลของเฮปารินต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

เพื่อความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส และวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในเลือดได้ในหลอดเดียวกัน ซึ่ง 2 พารามิเตอร์หลังต้องเก็บในเฮปารินป้องกันการเกิดลิ่มเลือด (cloting) ดังนั้นจึงศึกษาผลของเฮปารินต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในซีรัม ได้ผลดังรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าในหลอดควบคุมที่มีซีรัมที่ปั่นจากตัวอย่างเลือดทั้งที่มีและไม่มีเฮปารินให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่ต่างกันนัก โดยหลอดควบคุมที่มีเฮปารินมีความเร็วเริ่มต้นเป็น (0.035-0.027)/30 = **0.00026** และหลอดที่ไม่มีเฮปารินมีความเร็วเริ่มต้น (0.038-0.026)/30 = **0.00039** ในหลอดทดสอบก็ให้ผลไม่แตกต่างกับในหลอดควบคุมโดยความเร็วเริ่มต้นของหลอดที่มีเฮปารินเป็น (0.4-0.015)/30 = **0.0128** และที่ไม่มีเฮปารินเป็น (0.422-0.015)/30 = **0.0135** เมื่อพิจารณาค่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในหน่วยสากลโดยคำนวณจาก ε/1.000 = 7.473 ที่เวลา 10 นาที (ตามตัวอย่างการคำนวณข้อ 3.2.3) พบว่า

$$\text{หลอดที่มีเฮปาริน} = \frac{(0.145-0.025) \times 50{,}000}{7.473 \times 10} = 80.29 \text{ ยูนิต}$$

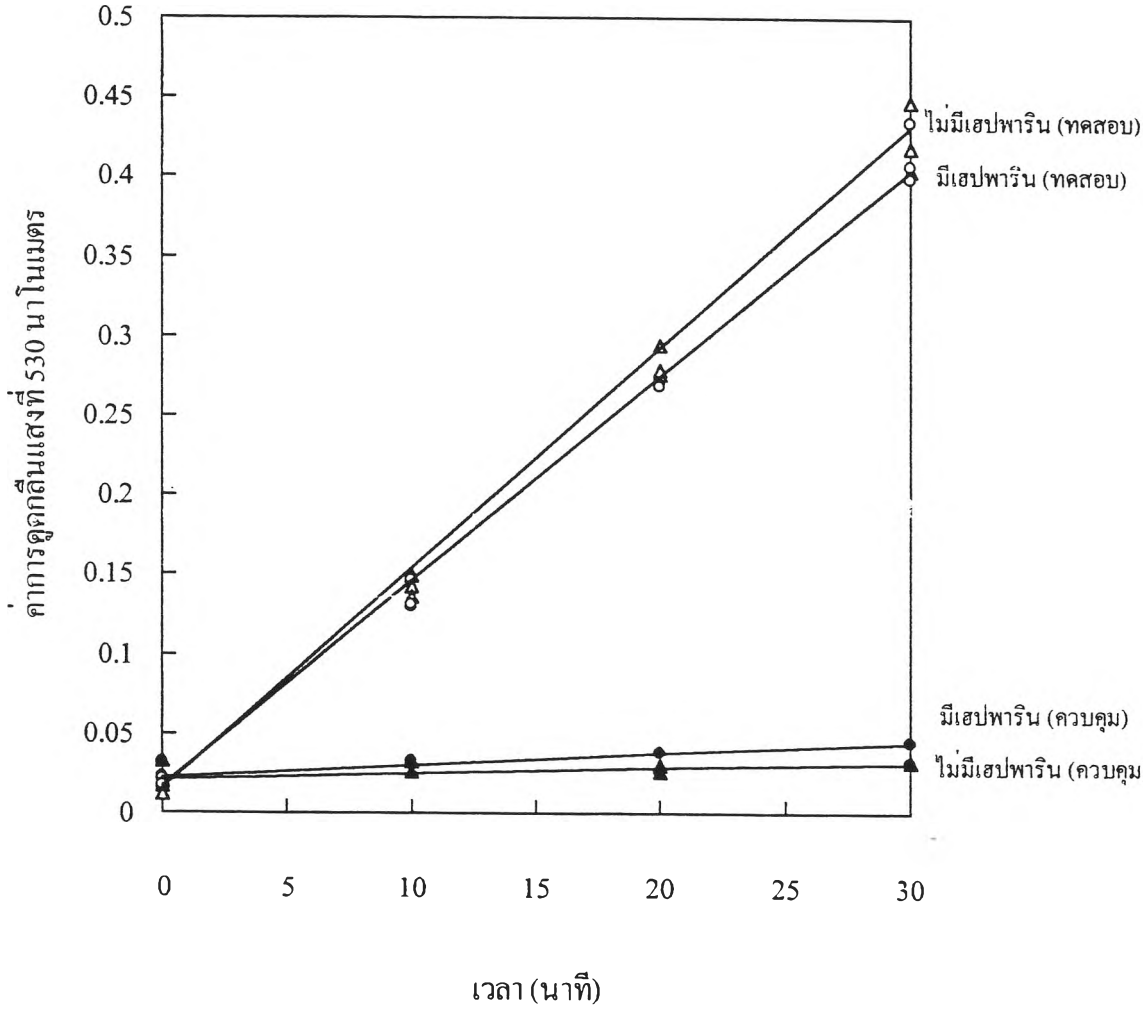
$$\text{หลอดที่ไม่มีเฮปาริน} = \frac{(0.151-0.024) \times 50.000}{7.473 \times 10} = 84.97 \text{ ยูนิต}$$

แสดงว่าเฮปารินมีผลทำให้แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินลดลงประมาณ 4.7 ยูนิต (5.51 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งยังอยู่ในขอบเขตความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ยของประชากรที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (81.66±8.57 *) ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการเก็บตัวอย่างรวมถึงความถูกต้องในการวิเคราะห์จึงกำหนดให้เก็บเลือดสำหรับวิเคราะห์ตะกั่วในเลือด แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิดดีไฮดราเตสในเฮปารินที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

.....

* คำนวณจากตัวอย่างข้อ 4.6 จำนวน 53 ตัวอย่างซึ่งมีค่าเฉลี่ยของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน = 81.66 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 31.0895 และใช้การทดสอบ t-test ซึ่งมีสูตรคำนวณคือ

95 เปอร์เซ็นต์ของขอบเขตความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ย $\mu = \bar{x} \pm t_{\alpha/2,\, n-1}\, s/\sqrt{n}$

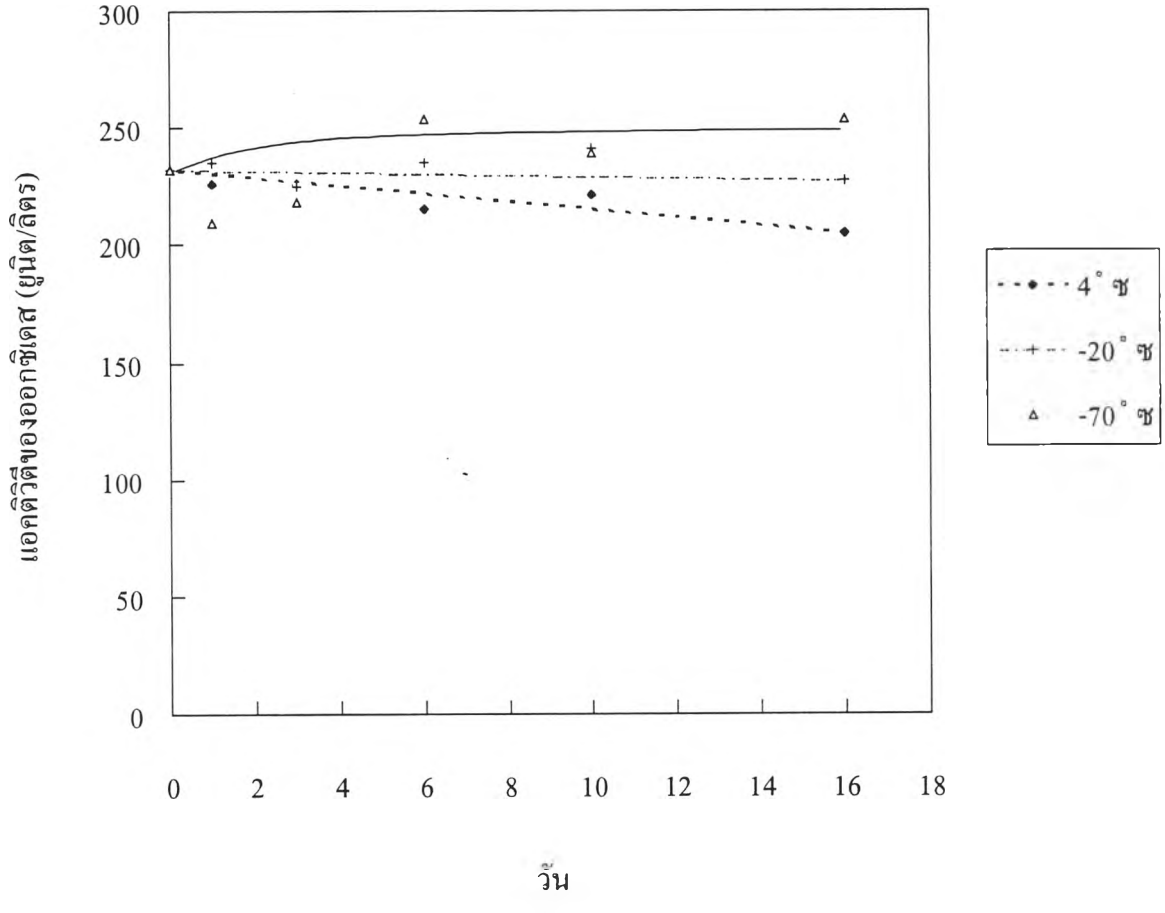


รูปที่ 4.5 ผลของเฮปารินต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

เจาะเลือดใหม่ 10 มิลลิลิตร แยกเก็บในหลอดที่มีเฮปารินป้องกันการเกิดลิ่มเลือดความเข้มข้น 1,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรและหลอดเปล่าที่ไม่มีเฮปารินอย่างละ 5 มิลลิลิตร นำทั้งสองหลอดปั่นแยกซีรัมออกมาวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสตามวิธีในข้อ 3.3.2

4.1.5 ความเสถียรของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในซีรัมที่เก็บที่อุณหภูมิต่างๆ

เพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเก็บแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินให้เสถียรมากที่สุด ได้ผลดังรูปที่ 4.6 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเก็บซีรัมให้คงความเสถียรที่สุดคือ –20 องศาเซลเซียสพบว่าไม่มีการลดลงของแอคติวิตีเลยตลอด 16 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บได้รองลงมาคือแอคติวิตีลดลง 13.79 เปอร์เซ็นต์ (วันละ 0.86 เปอร์เซ็นต์) สำหรับอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสมีค่าแอคติวิตีของออกซิเดสแปรปรวนกว่าทุกอุณหภูมิซึ่งน่าจะเกิดจากการลดลงของแอคติวิตีอย่างรวดเร็วอันเนื่องมาจากการละลายซีรัมจากอุณหภูมิต่ำมากๆ มาที่อุณหภูมิปกติขณะทำการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงเลือกเก็บซีรัมที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสและวิเคราะห์แอคติวิตีภายใน 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.6 ความเสถียรของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินของซีรัมที่เก็บที่อุณหภูมิต่างๆ

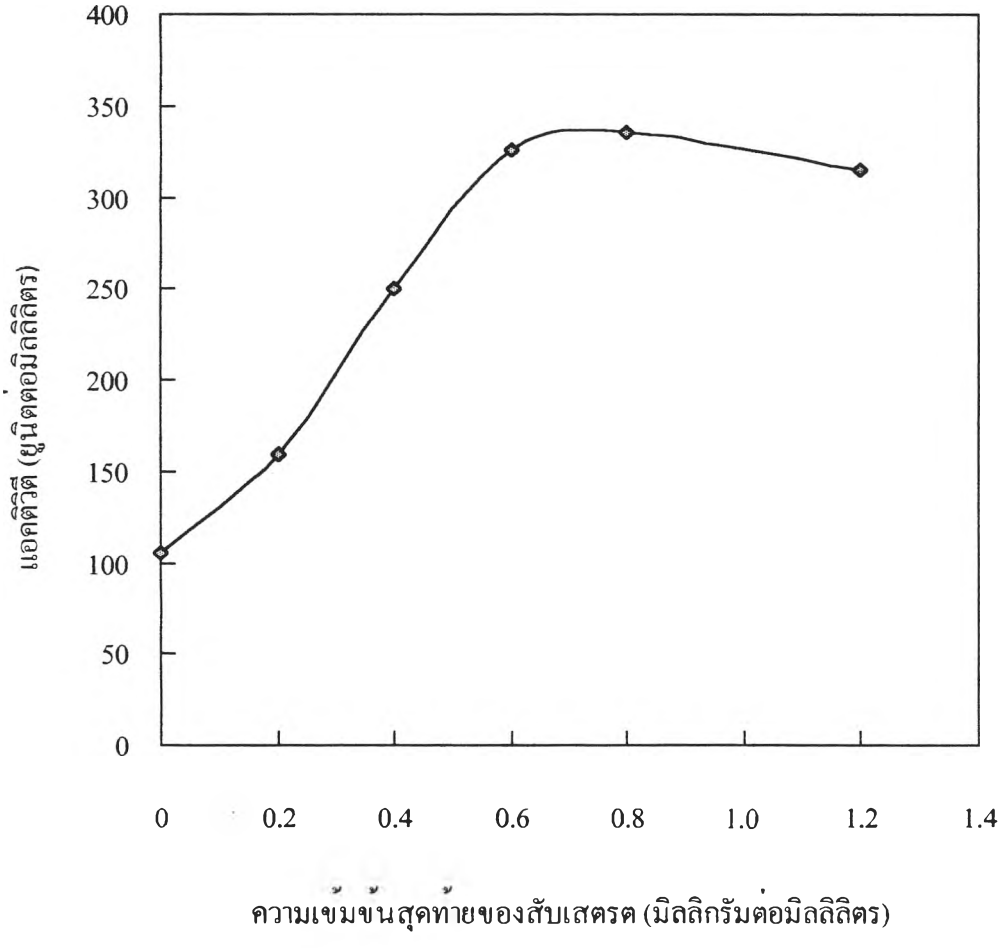
เจาะเลือดใหม่ประมาณ 15 มิลลิลิตรปั่นให้ได้เฉพาะซีรัมเก็บในหลอดๆ ละ 0.7 มิลลิลิตร 16 หลอด แยกเก็บที่อุณหภูมิ 4 -20 และ –70 องศาเซลเซียสอุณหภูมิละ 5 หลอด เหลือ 1 หลอดสำหรับวิเคราะห์ในวันที่เจาะเลือดทันทีถือเป็นวันที่ 0 จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บทั้ง 3 อุณหภูมิในวันที่ 1 , 3 , 6 , 10 และ 16 นับจากวันที่เจาะเลือด โดยใช้ซีรัมแล้วทิ้งไม่นำกลับมาใช้ใหม่ทั้งนี้เพื่อป้องกันการลดลงของแอคติวิตีของออกซิเดสจากละลาย

4.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสในเลือดคน

จากการศึกษาของ Burch and Siegel (1971) กำหนดสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส (activity of aminolevulinic acid dehydratase) ได้แก่ความเข้มข้นของสับเสตรตในสารผสมสุดท้ายเป็น 0.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้อุณหภูมิในการบ่มที่ 38 องศาเซลเซียส และปฏิกิริยาเกิดได้ดีที่พีเอช 6.65 ดังนั้นเพื่อความสมบูรณ์ของการวิเคราะห์แอคติวิตีจึงศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสับเสตรต ปริมาณเลือดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเหมาะสม และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเร็วเริ่มต้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำสีกับเออริชรีเอเจนต์และความเสถียรของแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของสับเสตรตอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ต่อการวิเคราะห์แอคติวิตี

เนื่องจากการคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์จะทำได้แม่นยำเมื่อเอนไซม์มีความอิ่มตัวกับสับเสตรตเต็มที่ ดังนั้นจึงทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวโดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายของสับเสตรตตั้งแต่ 0.2 – 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคลอบคลุมงานของ Burch and Siegel (1971) ที่กำหนดให้ใช้ความเข้มข้น 0.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังรูปที่ 4.7 พบว่าแอคติวิตีเพิ่มสูงสุดที่สับเสตรตความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วลดลงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นมากขึ้นคล้ายคลึงกับงานของ Burch and Siegel (1971) ดังนั้นจึงเลือกใช้สับเสตรตความเข้มข้น 0.68 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นเดิมซึ่งให้แอคติวิตีใกล้เคียงจุดสูงสุด อีกทั้งมีการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ค่อนข้างน้อย จึงช่วยลดความคลาดเคลื่อนของแอคติวิตีจากการเตรียมสับเสตรตซึ่งต้องเตรียมใช้ใหม่ทุกครั้ง

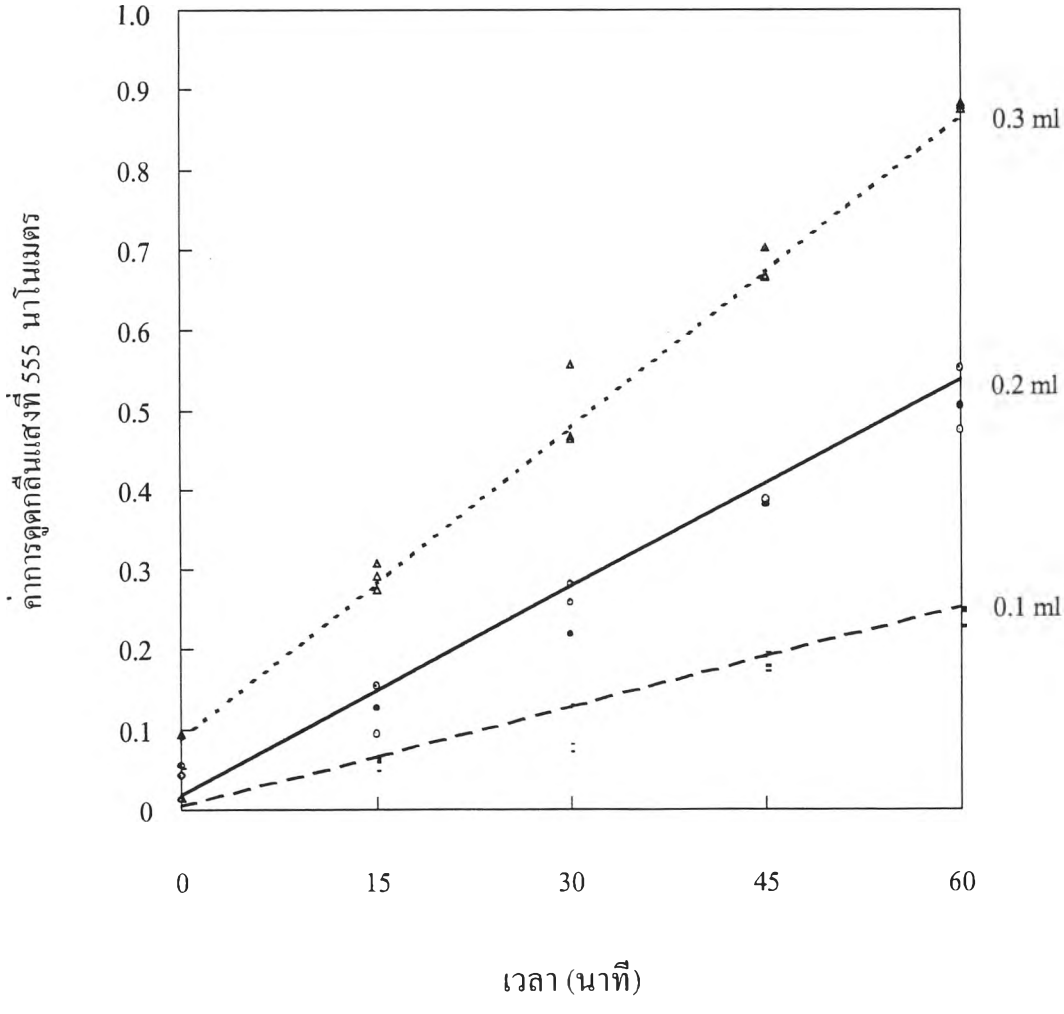


รูปที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของสับเสตรตต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ในเลือดคน

วิเคราะห์แอคติวิตีตามข้อ 3.3.3 โดยแปรความเข้มข้นสุดท้ายของสับเสตรตตั้งแต่ 0.2–1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้เลือด 0.2 มิลลิลิตร

4.2.2 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับเสตรตของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ของเลือดปริมาณต่างๆ

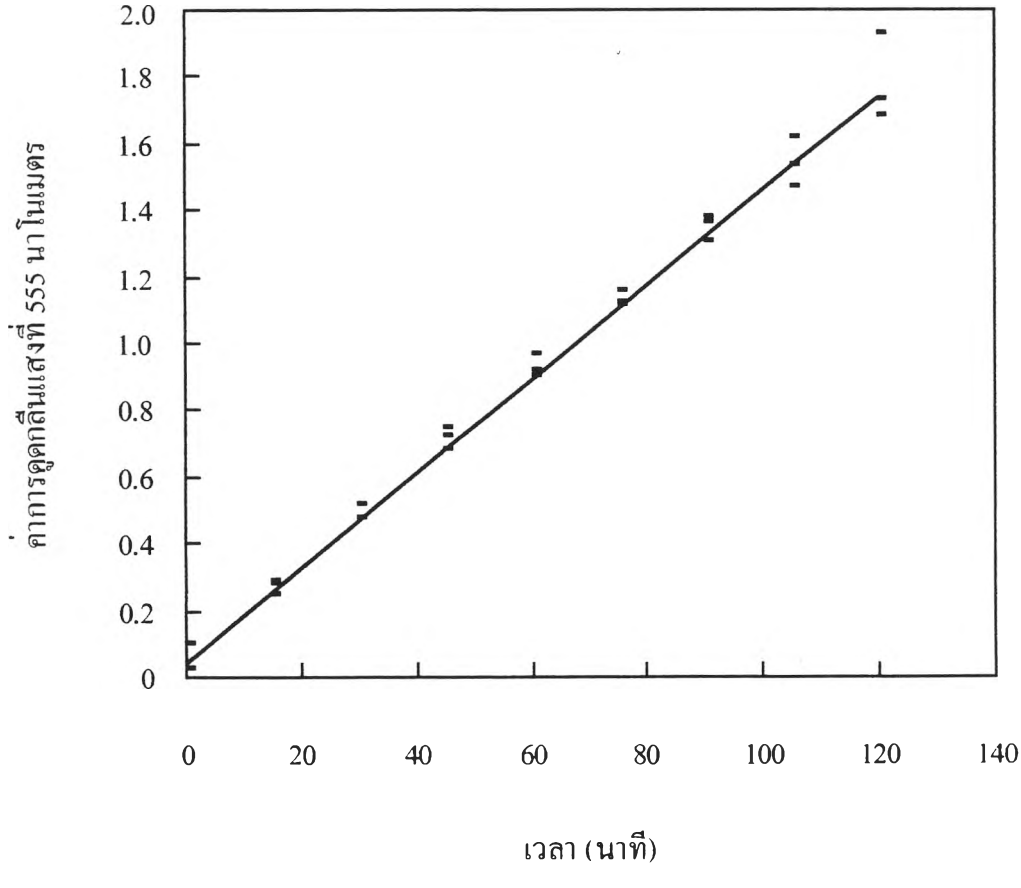
จากการศึกษาของ Burch and Siegel (1971) กำหนดให้ใช้เลือด 0.2 มิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตี ดังนั้นจึงทดลองดูผลของเลือด 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตร ต่อการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ตามเวลาบ่มตั้งแต่ 0 - 60 นาทีว่ามีอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์อันเนื่องมาจากเอนไซม์อย่างสม่ำเสมอเป็นเส้นตรงในช่วงความเร็วเริ่มต้นซึ่งเป็นช่วงที่คำนวณแอคติวิตีได้แม่นยำที่สุด ได้ผลดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับเสตรตของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสของเลือดปริมาณต่างๆ

ใช้เลือดปริมาตร 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิลิตร วิเคราะห์แอคติวิตีตามข้อ 3.3.3 โดยยับยั้งปฏิกิริยาด้วยไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 0.02 โมลาร์ทุก 15 นาทีจนครบ 60 นาที

ปริมาณเลือดทั้ง 3 อย่างให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรงตลอดเวลาบ่ม 60 นาที แต่ที่ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรให้ค่าการดูดกลืนแสงที่นาทีที่ 60 สูงมาก อีกทั้งที่เวลา 0 นาทียังให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าที่ควร ซึ่งอาจเกิดจากสีของฮีโมโกลบินของเลือด ส่วนเลือดปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรเมื่อถูกยับยั้งด้วยตะกั่วอาจทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำเกินไป ดังนั้นจึงเลือกใช้เลือดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงพอเหมาะและสะดวกในการคำนวณเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสกับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ซึ่งใช้เลือดปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ความเร็วเริ่มต้นของเลือดปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรยังคงเป็นเส้นตรงอยู่ในความเร็วเริ่มต้นซึ่งเป็นช่วงที่สามารถคำนวณแอคติวิตีได้แม่นยำตลอดระยะเวลาบ่มถึง 120 นาทีดังรูปที่ 4.9 (ในงานวิจัยนี้ใช้เวลาบ่ม 60 นาที)

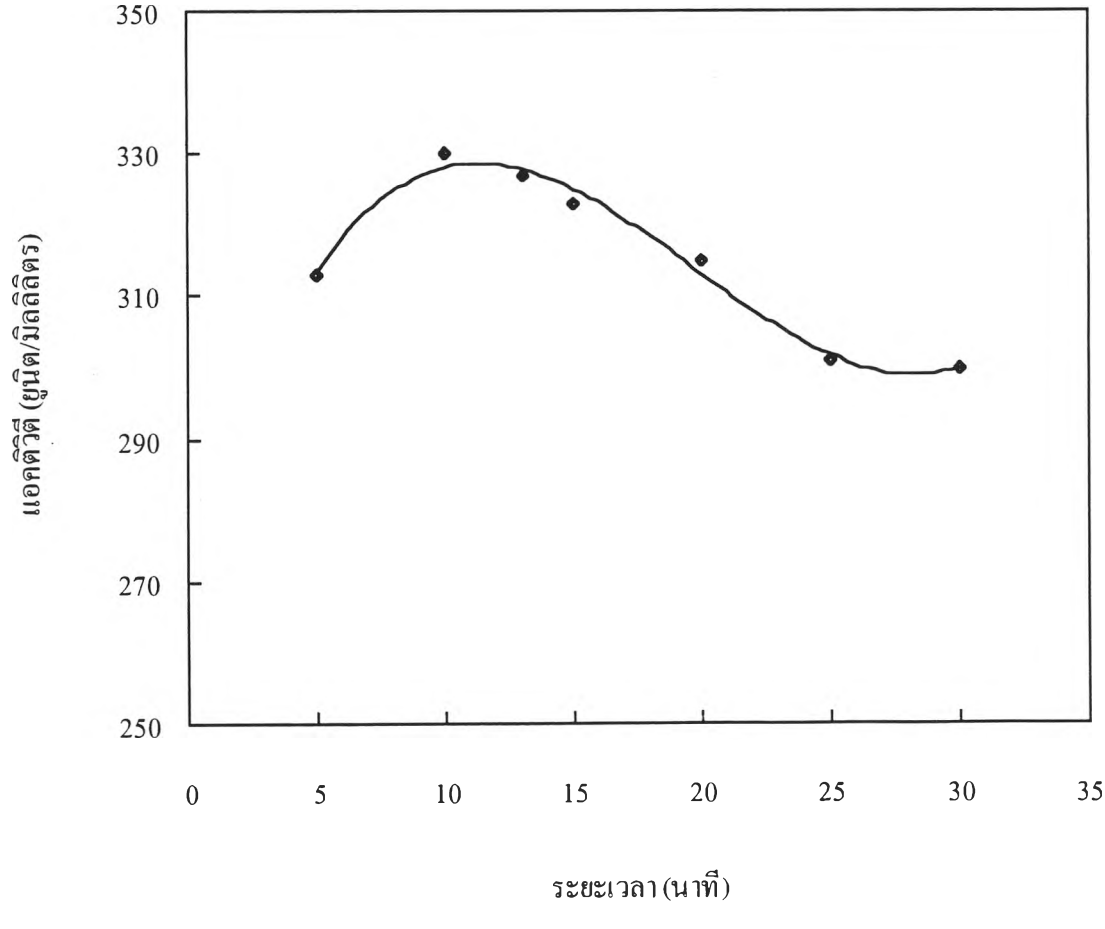


รูปที่ 4.9 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสับเสตรตของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสจากเลือดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

วิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธี 3.3.3 โดยใช้เลือด 0.2 มิลลิลิตร แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 0.02 โมลาร์ทุก 20 นาทีจนครบ 120 นาที

4.2.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับทำสีกับเออริชรีเอเจนต์

สีชมพูซึ่งเกิดจากผลิตภัณฑ์พอโฟบิลิโนเจนกับเออริชรีเอเจนต์จะเพิ่มขึ้นและเสถียรอยู่ช่วงเวลาหนึ่งแล้วจางลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกิดสี ได้ผลดังรูปที่ 4.10 ซึ่งเห็นได้ว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับเกิดสีกับเออริชรีเอเจนต์ได้แก่ระยะเวลา 13 นาที เพราะให้ค่าแอคติวิตีใกล้เคียงจุดสูงสุด (10 นาที) อีกทั้งอัตราการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีก็น้อยกว่าจุดอื่น ฉะนั้นหากทิ้งระยะเวลาต่างกันเล็กน้อย แอคติวิตีจะไม่เปลี่ยนมากนักจึงถือเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสม

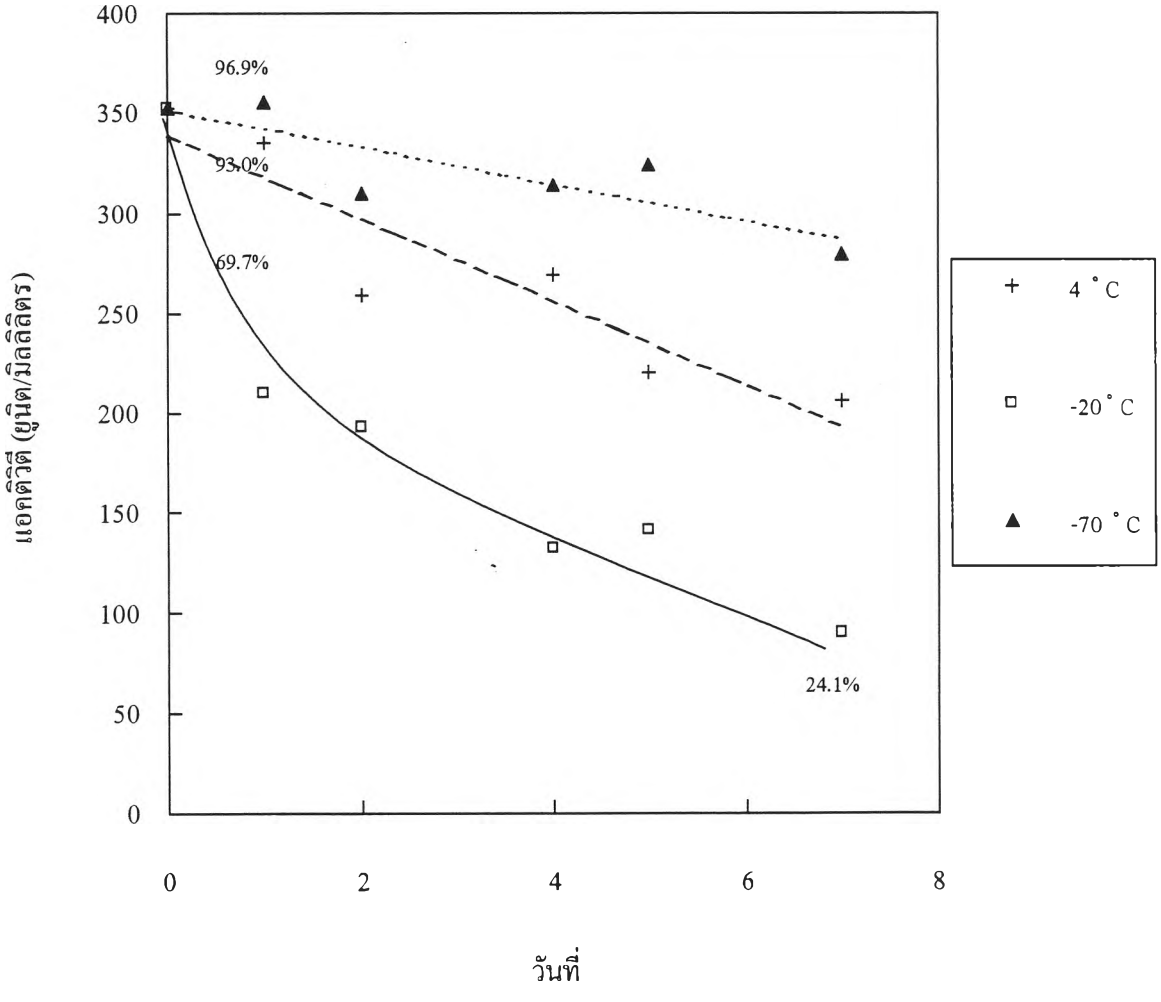


รูปที่ 4.10 ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับทำสีกับเออริชรีเอเจนต์

วิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ตามวิธีข้อ 3.3.3 โดยหลังจากแยกสารใส (Supernatant) มาทำสีกับเออริชรีเอเจนต์แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงนาทีที่ 5 ,10 ,13 ,15 , 20 , 25 และ 30

4.2.4 ความเสถียรของแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ที่อุณหภูมิต่างๆ

เพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเก็บเลือดให้มีแอคติวิตีเสถียรมากที่สุด ได้ผลดังรูปที่ 4.11 พบว่าอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสสามารถคงแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ได้เสถียรที่สุดโดยใน 1 สัปดาห์แอคติวิตีลดลงประมาณ 21.7 เปอร์เซ็นต์หรือวันละ 3.1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเก็บได้รองลงมาคือแอคติวิตีลดลงในวันที่ 7 ประมาณ 49 เปอร์เซ็นต์หรือวันละ 7 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่คงแอคติวิตีได้เสถียรน้อยที่สุดคือ –20 องศาเซลเซียส โดยแอคติวิตีในวันที่ 7 ลดลงถึง 75.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเก็บเลือดที่ 4 องศาเซลเซียสและวิเคราะห์แอคติวิตีภายใน 15 ชั่วโมง การเก็บตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ –70 และ –20 องศาเซลเซียสจะทำให้เม็ดเลือดแตก ฉะนั้นต้องวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นก่อนเก็บจึงจะสามารถคำนวณค่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสได้

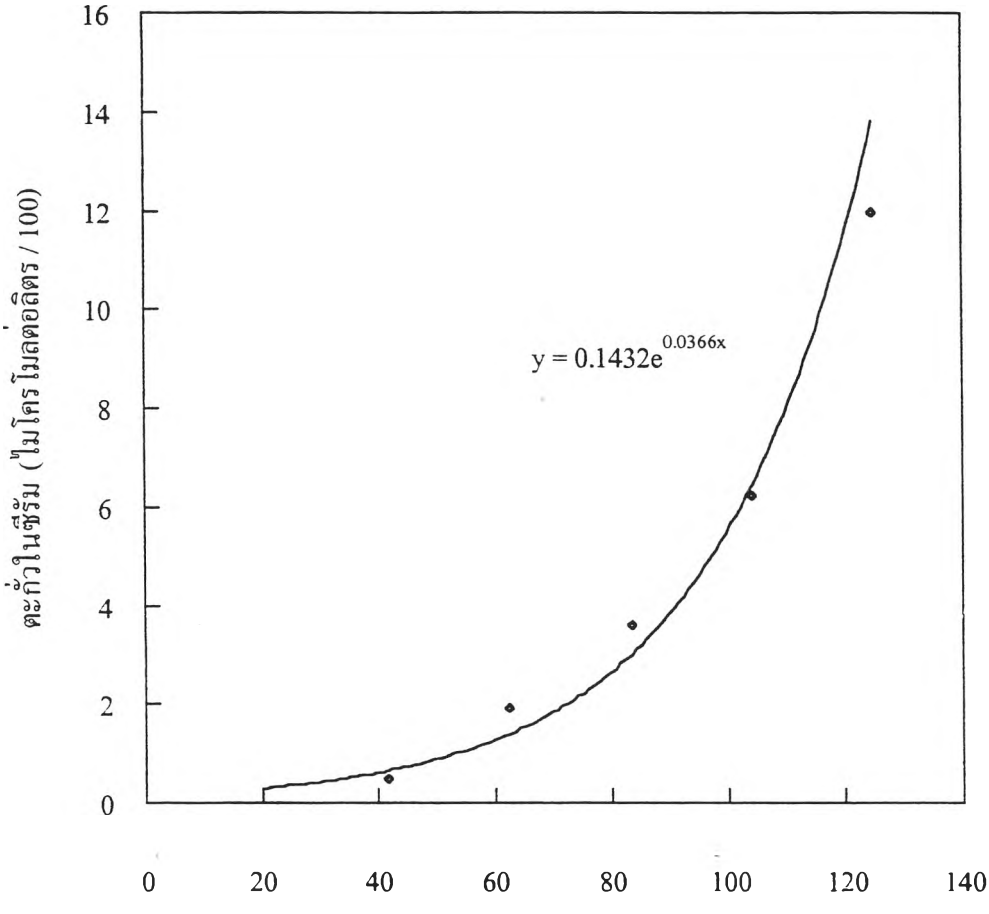


รูปที่ 4.11 ความเสถียรของแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ที่อุณหภูมิต่างๆ

เจาะเลือดใหม่เก็บหลอดละ 0.5 มิลลิลิตรจำนวน 16 หลอด แยกเก็บที่อุณหภูมิ 4 , -20 และ -70 องศาเซลเซียสอย่างละ 5 หลอดเหลือ 1 หลอดสำหรับวิเคราะห์ในวันที่เจาะเลือดทันทีถือเป็นวันที่ 0 จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ตามวิธีข้อ 3.3.3 ในวันที่ 1 , 2 , 4 , 5 และ 7 นับจากวันที่เจาะเลือด โดยใช้เลือดแล้วทิ้งไม่นำกลับมาใช้ใหม่เพื่อป้องกันการลดลงของแอคติวิตีจากการละลาย

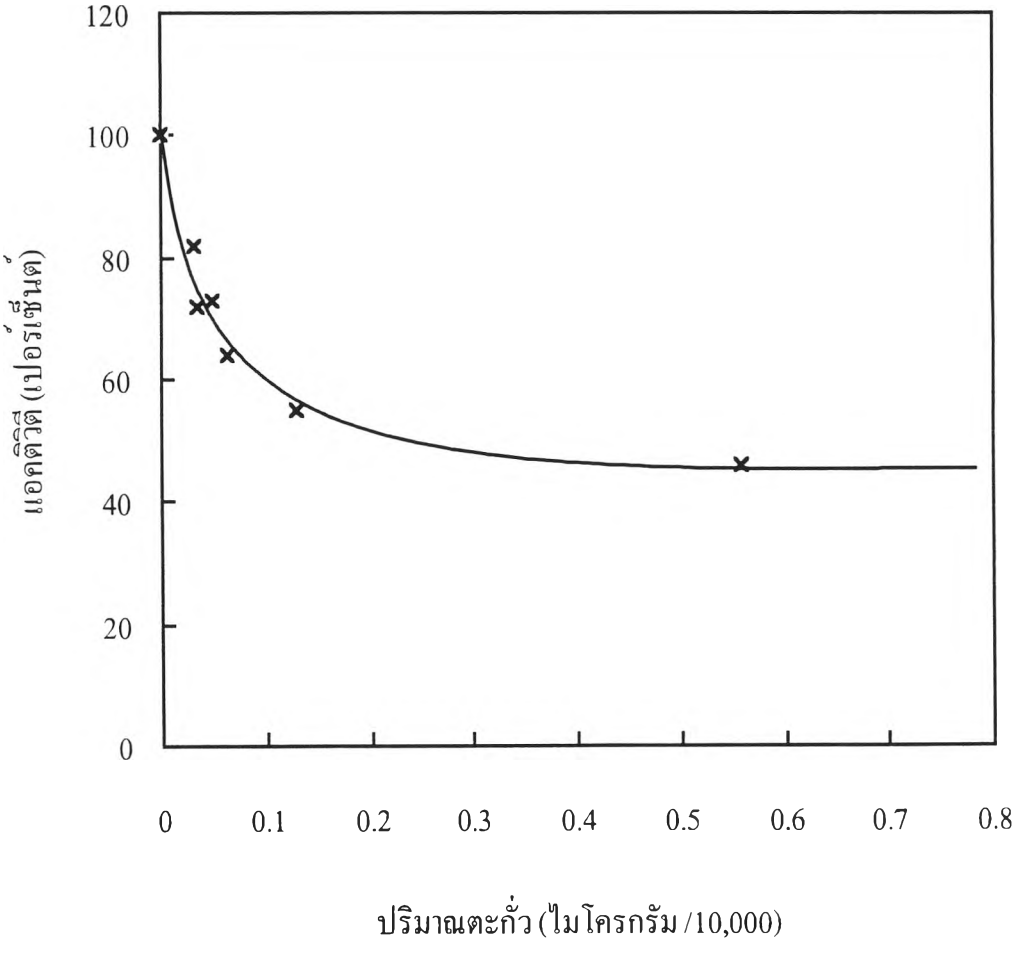
4.3 ผลของตะกั่วต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์

เพื่อเป็นการศึกษาแรกเริ่ม (preliminary study) ถึงผลของตะกั่วต่อการลดแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินเท่านั้น จึงใช้เซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์ที่ไม่มีเอนไซม์อื่นเจือปนเลยวิเคราะห์ตามข้อ 3.3.2 โดยใช้เซอรูโลพลาสมินปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร (0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือ 4 ไมโครโมล ต่อลิตร) ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีใกล้เคียงกับซีรัมคนปกติบ่มกับตะกั่วความเข้มข้นต่างๆ ที่คำนวนจากสมการถดถอยของกราฟระหว่างปริมาณตะกั่วในซีรัมกับปริมาณตะกั่วในเลือด ซึ่งดัดแปลงจากงานของ Cook and Manton (1984) ดังรูปที่ 4.12 จะได้ปริมาณตะกั่วที่ต้องใช้จริงในสารผสมสุดท้ายที่มีเอนไซม์ 0.01 มิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลการลดแอคติวิตีดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าแอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกที่ความเข้มข้นตะกั่วในสารผสมไม่เกิน 0. 062 ไมโครกรัม / 10,000 (รูปที่ 4.13) ซึ่งตรงกับ 20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.14) จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงตามความเข้มข้นของตะกั่วโดยที่ความเข้มข้น 0.557 ไมโครกรัม / 10,000 ในรูป 4.13 ซึ่งตรงกับ 80 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรในรูปที่ 4.14 ค่าแอคติวิตีลดลงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับงานของ Rosawan (1996) ที่เคยรายงานไว้



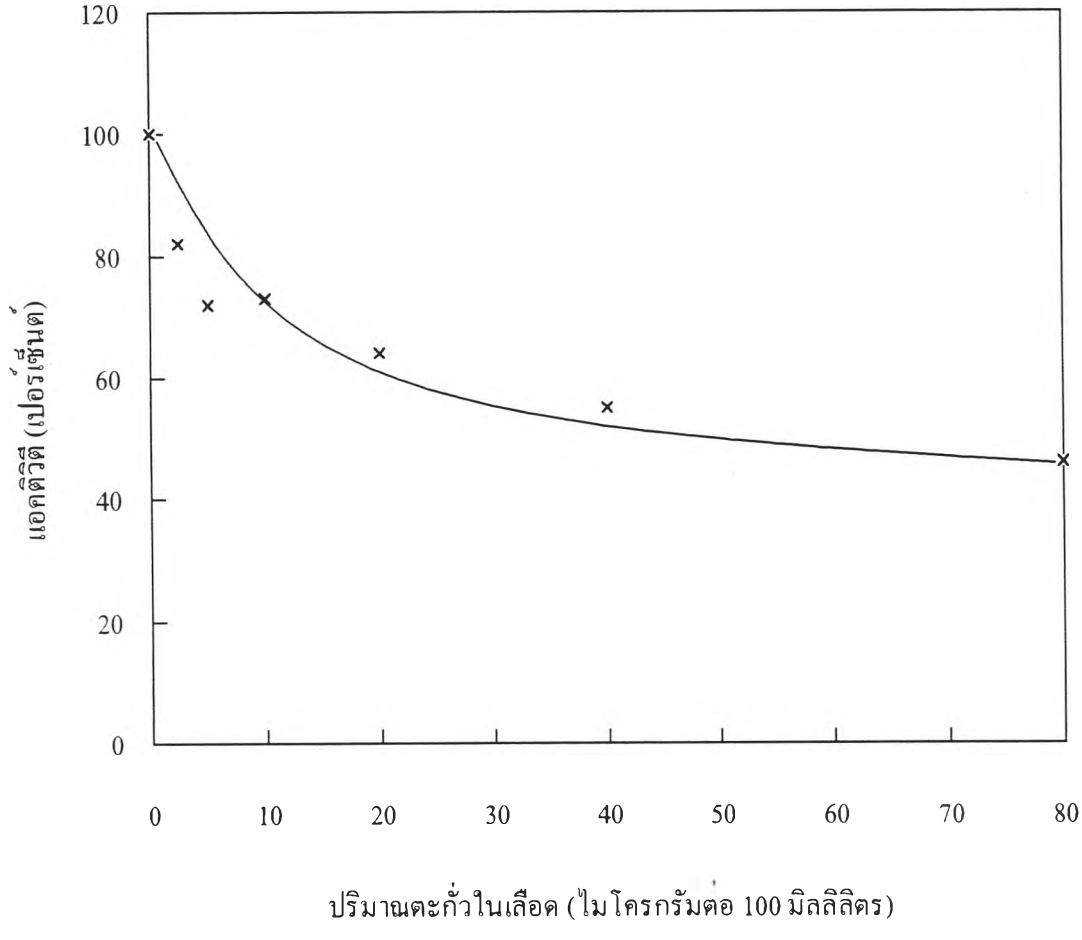
รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในซีรัมกับปริมาณตะกั่วในเลือด (ดัดแปลงจาก Cook and Manton, 1984 ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในซีรัมและในเลือดคนจำนวน 49 ตัวอย่าง)

จากรูป 4.12 จะได้สมการถดถอย $y = 0.1432e^{0.0366x}$ โดย y หมายถึงปริมาณตะกั่วในซีรัม (ไมโครโมลต่อลิตร/100) x หมายถึงปริมาณตะกั่วในเลือด (ไมโครกรัมต่อลิตร) ในงานวิจัยนี้เมื่อแทนค่าตะกั่วที่ทำอันตรายและพบได้ในคนจริงเป็น 2.5 , 5 , 10 , 20 , 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อ100 มิลลิลิตรแล้ว จะได้ค่าตะกั่วที่ต้องใช้กับเอนไซม์ 0.01 มิลลิลิตร (ในสารผสมสุดท้าย 1.04 มิลลิลิตร) เป็น 0.033 , 0.0358 , 0.049 , 0.062 , 0.129 , 0.557 ไมโครกรัม/10,000 ตามลำดับ



<u>รูปที่ 4.13</u> ผลของตะกั่วความเข้มข้นต่างๆ ต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์

วิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสตามวิธีข้อ 3.3.2 โดยใช้สารละลายเอนไซม์เซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์ ใน อะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร (0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 4 ไมโครโมลต่อลิตร) และสารละลายตะกั่วอะซิเตตในน้ำกลั่นปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณตะกั่วตามที่คำนวณได้จากรูปที่ 4.12 (สารผสมมีปริมาตรรวมสุดท้าย 1.04 มิลลิลิตร)

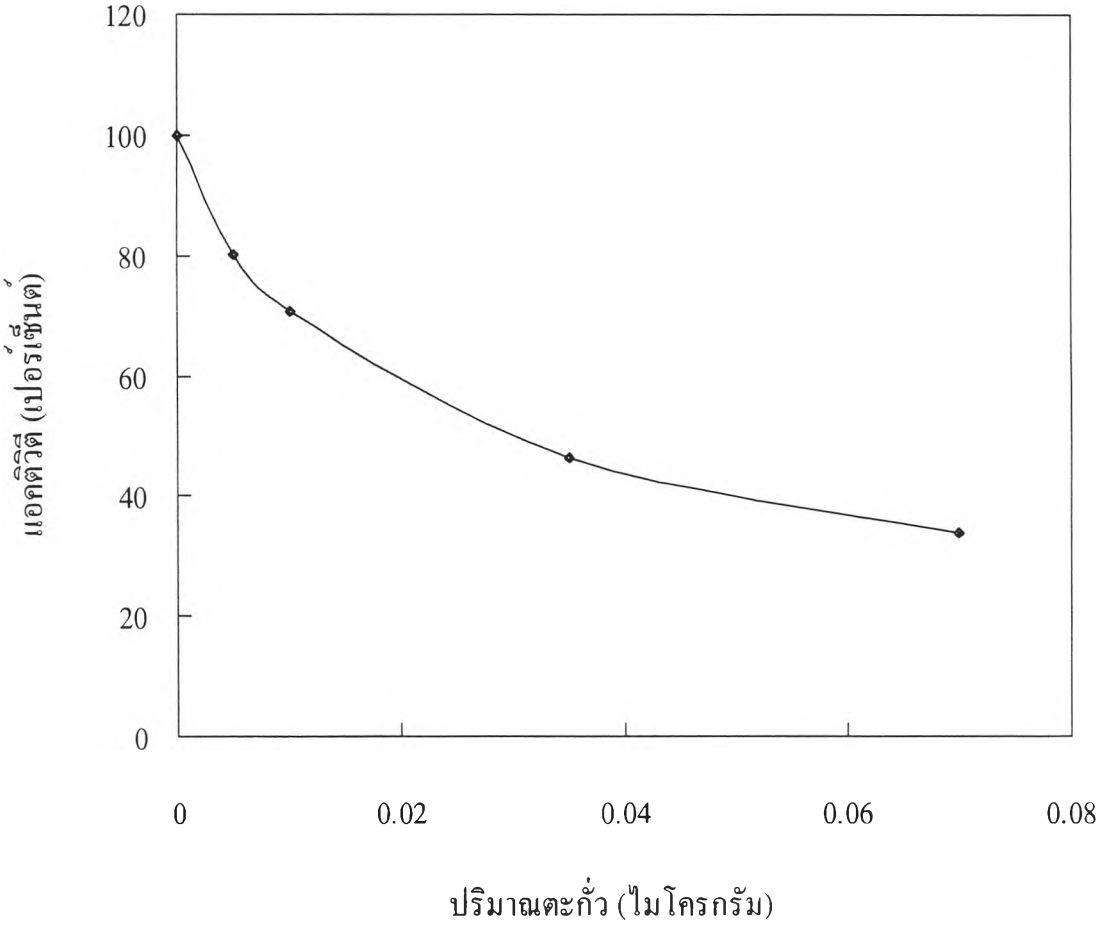


รูปที่ 4.14 การลดแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์จากตะกั่วในเลือดซึ่งคำนวณจากงานของ Cook and Manton (1984)

ปรับแกนนอนในรูปที่ 4.13 โดยแทนปริมาณตะกั่วที่ใช้จริงในการทดลองที่มีเอนไซม์ 0.01 มิลลิลิตร เป็นปริมาณตะกั่วในซีรัม (y) (ไมโครโมลต่อ 100 มิลลิลิตร/100) ซึ่งจะตรงกับปริมาณตะกั่วในเลือด (x) (ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ในสมการถดถอย $y = 0.1432e^{0.0366x}$ ของรูปที่ 4.12

4.4 ผลของตะกั่วต่อแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์

เพื่อศึกษาผลของตะกั่วต่อการวิเคราะห์แอคติวิตีในขณะที่ไม่มีปัจจัยอื่นจากเลือดเลยจึงใช้เอนไซม์อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์จากซีรัมวัว (Bovine serum) ซึ่งแสดงการลดแอคติวิตีดังรูปที่ 4.15



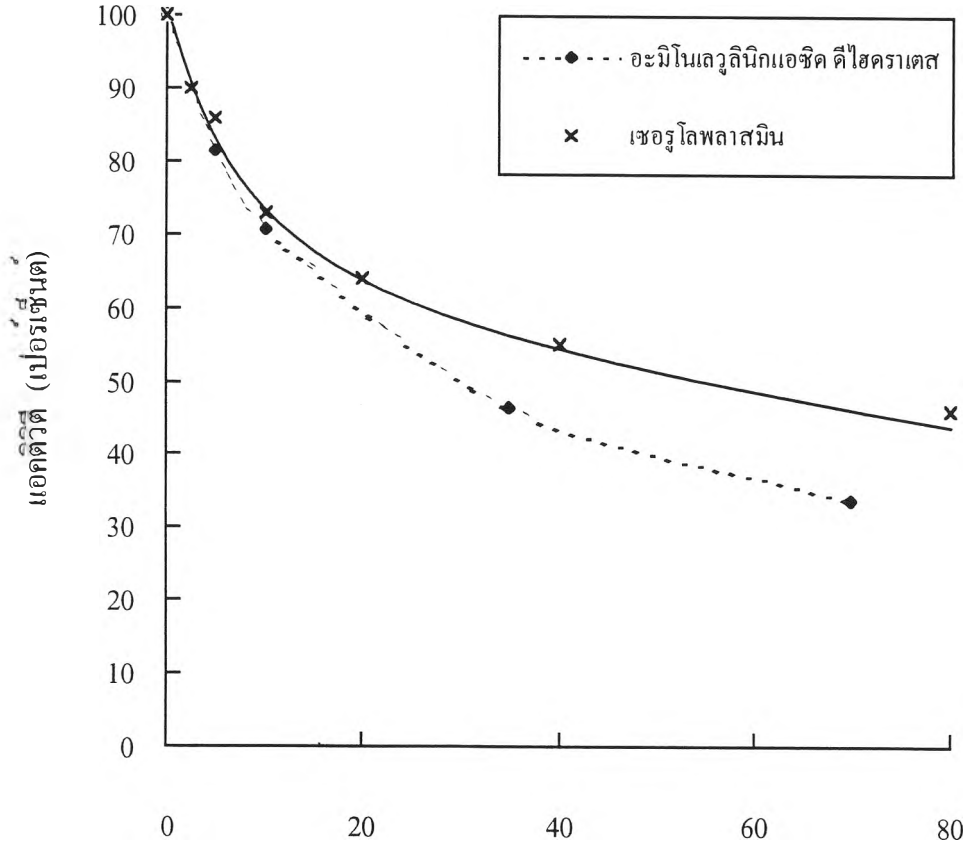
รูปที่ 4.15 ผลของตะกั่วต่อแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์จากซีรัมวัว

กระตุ้นเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตรซึ่งให้ค่าแอคติวิตีใกล้เคียงกับคนปกติให้พร้อมทำงาน (preactivated) กับเมอแคบโตเอททานอล (mercapto ethanal) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.01 โมลาร์บ่มที่ 38 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที (Granick and Mauzerall, 1958) แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสตามข้อ 3.3.2 (ปริมาตรสุดท้ายของสารผสม 2.5 มิลลิลิตร) โดยใช้เอนไซม์ที่กระตุ้นแล้ว 0.2 มิลลิลิตรผสมสารละลายตะกั่วในน้ำกลั่นที่มีปริมาณตะกั่วในสารผสมสุดท้ายเป็น 0.0005 , 0.01 , 0.035 , 0.07 ไมโครกรัม (ในเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร) ซึ่งเทียบได้กับปริมาณตะกั่วในเลือด 5 , 10 , 35 และ 70 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตามลำดับ

จากรูปที่ 4.15 พบว่าตะกั่วทำให้แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์จากซีรัมวัวลดลงแบบเอกซ์โปเนนเชียล และการยับยั้งของตะกั่วยังไม่สมบูรณ์โดยที่ความเข้มข้นของตะกั่วในเลือดเท่ากับ 70 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรแอคติวิตีลดลงประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์และมีแนวโน้มลดลงอีกเรื่อยๆ

4.5 การเปรียบเทียบผลของตะกั่วต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์ และแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์

เมื่อเปรียบเทียบผลของตะกั่วต่อเอนไซม์บริสุทธิ์ทั้งสองดังรูปที่ 4.16 เห็นได้ว่าตะกั่วทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงใกล้เคียงกันในช่วงแรกที่ความเข้มข้นของตะกั่วไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อตะกั่วเข้มข้นมากขึ้นแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส มีการลดลงมากกว่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินโดยที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร การลดแอคติวิตีต่างกันประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ จากความคล้ายคลึงกันดังกล่าวแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินน่าจะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพของพิษตะกั่วได้เช่นเดียวกันกับแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิดดีไฮดราเตส

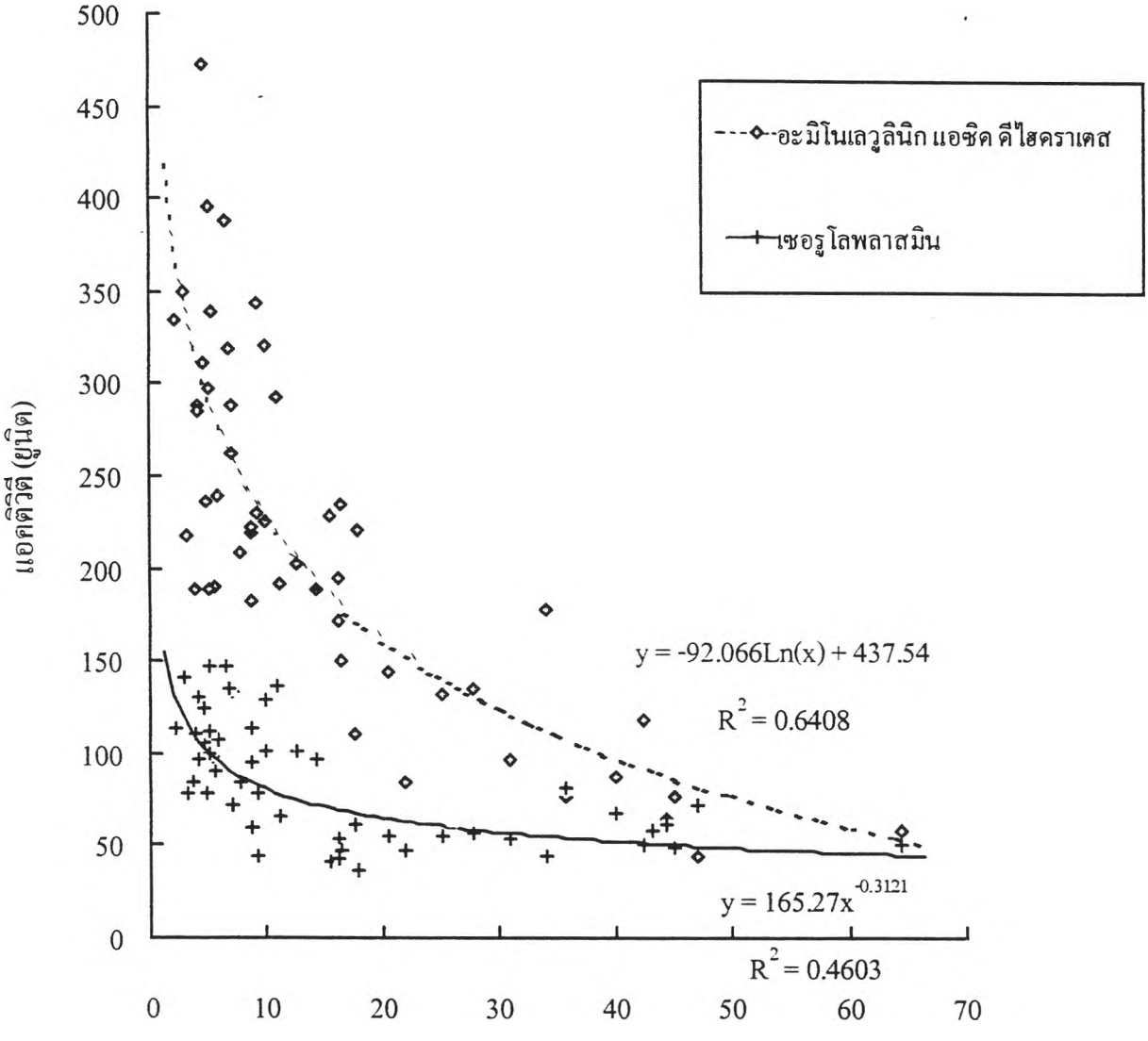


รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบผลของตะกั่วต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์กับแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์ (จากการเปรียบเทียบรูป 4.14 กับ 4.15)

4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส จากเลือดคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี จากตัวอย่างเลือดทั้งหมด (53 ตัวอย่าง)

เนื่องจากผลการศึกษาความเสถียรของแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสในข้อ 4.2.4 พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีการลดแอคติวิตีลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 วัน ดังนั้นจึงกำหนดให้วิเคราะห์แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสภายใน 15 ชั่วโมง และวิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเก็บตัวอย่างได้ครั้งละ 20 ตัวอย่างเท่านั้น

เก็บตัวอย่างเลือดตามข้อ 3.3.1 วิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส และปริมาณตะกั่วในเลือดดังวิธีข้อ 3.3.2 , 3.3.3 , 3.3.4 ตามลำดับ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 พารามิเตอร์มาเขียนภาพขจาย (scatter diagram) ดูแนวโน้มความสัมพันธ์ โดยให้ปริมาณตะกั่วเป็นแกน x และแอคติวิตีเป็นแกน y ได้ดังรูปที่ 4.17 (ข้อมูลดิบแสดงในภาคผนวก ง) จากนั้นใช้สถิติวิเคราะห์ระดับความสัมพันธ์โดยสหสัมพันธ์ (correlation) และหาสมการที่ใช้ประมาณค่าตะกั่วในเลือดโดยการวิเคราะห์การถดถอย (regression)



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส จากเลือดคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี จำนวน 53 ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดตามข้อ 3.3.1 วิเคราะห์แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสและปริมาณตะกั่วในเลือดตามข้อ 3.3.2 , 3.3.3 , 3.3.4 ตามลำดับ (ข้อมูลอยู่ในภาคผนวก ง)

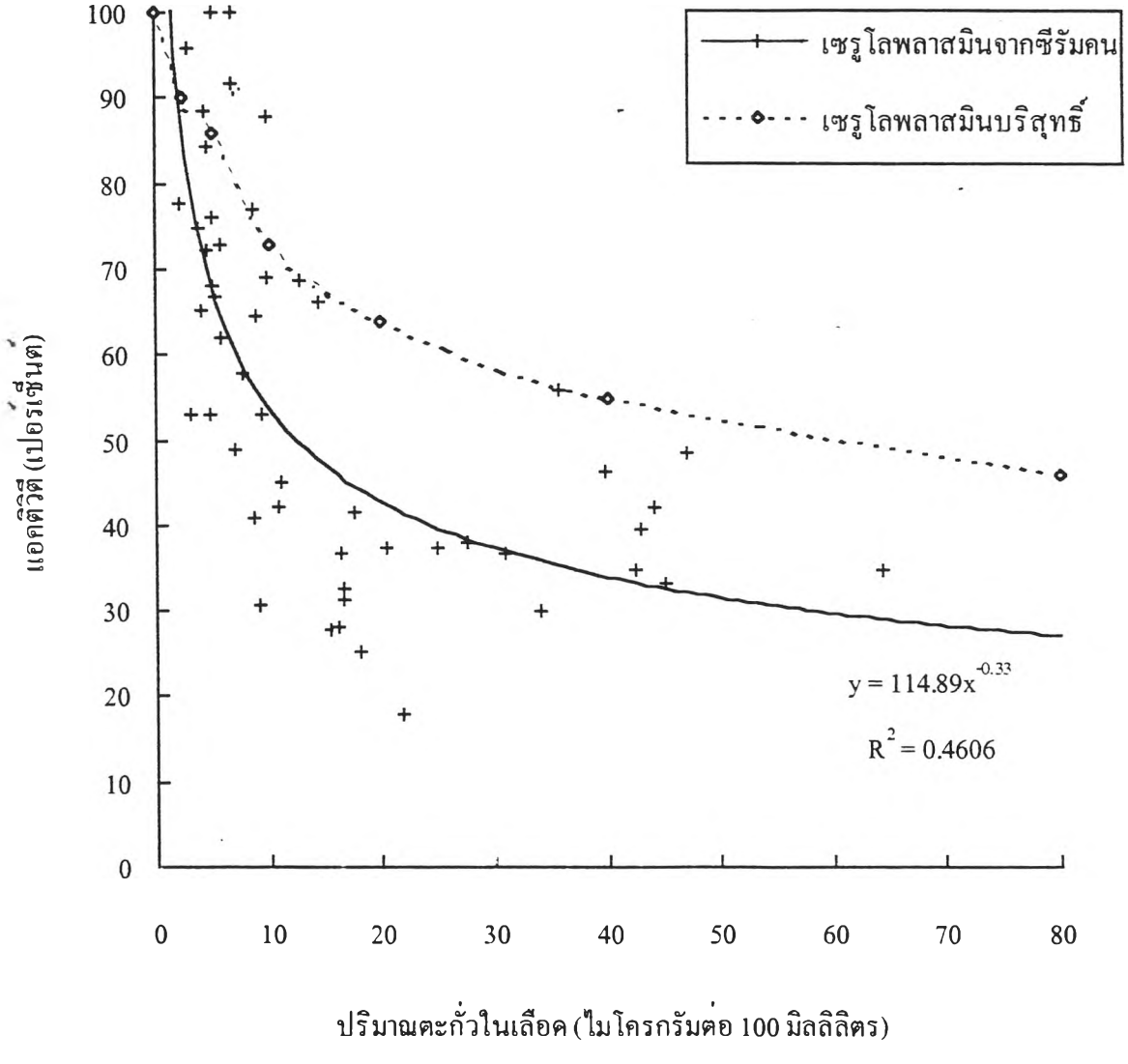
4.6.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินของตัวอย่างเลือดทั้งหมด

พิจารณาเส้นแนวโน้มจากรูปที่ 4.17 พบว่าความสัมพันธ์ของปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินเป็นแบบผกผัน คือแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินลดลงตามปริมาณตะกั่วที่เพิ่มขึ้น โดยอัตราการลดลงเกิดอย่างรวดเร็วในช่วงแรกที่ตะกั่วในเลือด 0 – 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วค่อนข้างคงตัวในช่วงหลัง สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ซึ่งคำนวณได้จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดยการปรับค่าให้แกน x เป็น log ปริมาณตะกั่วในเลือด และแกน y เป็น log แอคติวิตีของออกซิเดส แล้วได้ค่า r = -0.6785 หมายถึงมีความสัมพันธ์ระดับปานกลางค่อนไปทางดี เมื่อทดสอบสมมติฐานโดยเปรียบเทียบกับตารางค่าวิกฤตของสหสัมพันธ์แบบเพียร์สันในภาคผนวก ค แล้วพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างแท้จริง แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน (y) (ยูนิต) สามารถประมาณค่าตะกั่วในเลือด (x) (ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)ได้ถูกต้อง 0.6785^{2} x 100 = **46 เปอร์เซ็นต์** จากภาพขยายสามารถลากเส้นถดถอย และหาสมการถดถอยได้ดังนี้

$$y = 165.27\ x^{-0.3121}$$

ค่าปกติของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินเมื่อกำหนดระดับตะกั่วในเลือดที่ยอมรับได้ในประเทศไทยเป็น 40 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรจะได้ค่าแอคติวิตีของออกซิเดสที่ปลอดภัยคือไม่ต่ำกว่า 52 ยูนิต อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อกำหนดค่าปกติ (referent value) เพราะการกำหนดค่าปกติในทางการแพทย์ทำได้ยากเนื่องจากต้องเป็นค่าที่ได้จากตัวอย่างคนสุขภาพดี และร่างกายไม่อยู่ในสภาวะใดๆ ที่อาจจะมีผลต่อแอคติวิตีของออกซิเดสเลย

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษากับเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์ในข้อ 4.3 แล้วได้ผลดังรูปที่ 4.18 พบว่าตะกั่วสามารถลดแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในซีรัมคนมากกว่าเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน่าจะเกิดจากในซีรัมคนมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการลดแอคติวิตีของออกซิเดสหรืออาจเกิดจากระยะเวลาในการสัมผัสตะกั่วในคนจริงยาวนานกว่าในหลอดทดลองฉะนั้นตะกั่วไม่เพียงลดแอคติวิตีหรือประสิทธิภาพของเซอรูโลพลาสมินเท่านั้นแต่อาจลดปริมาณเซอรูโลพลาสมินด้วยก็เป็นได้ ผลการศึกษาดังกล่าวเป็นการดีในแง่ของความเป็นไปได้ที่จะใช้เซอรูโลพลาสมินเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพของพิษตะกั่ว เพราะในซีรัมคนจริงๆ มีการลดแอคติวิตีอย่างเห็นได้ชัดและมากกว่าในหลอดทดลอง นอกจากนี้แอคติวิตีของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงคล้ายคลึงกันคือลดอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และค่อนข้างคงตัวเมื่อตะกั่วมากขึ้น



รูปที่ 4.18 การเปรียบเทียบผลของตะกั่วต่อแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินในซีรัมคนกับเซอรูโลพลาสมินบริสุทธิ์เป็นเปอร์เซ็นต์ (จากรูป 4.14 และ 4.20)

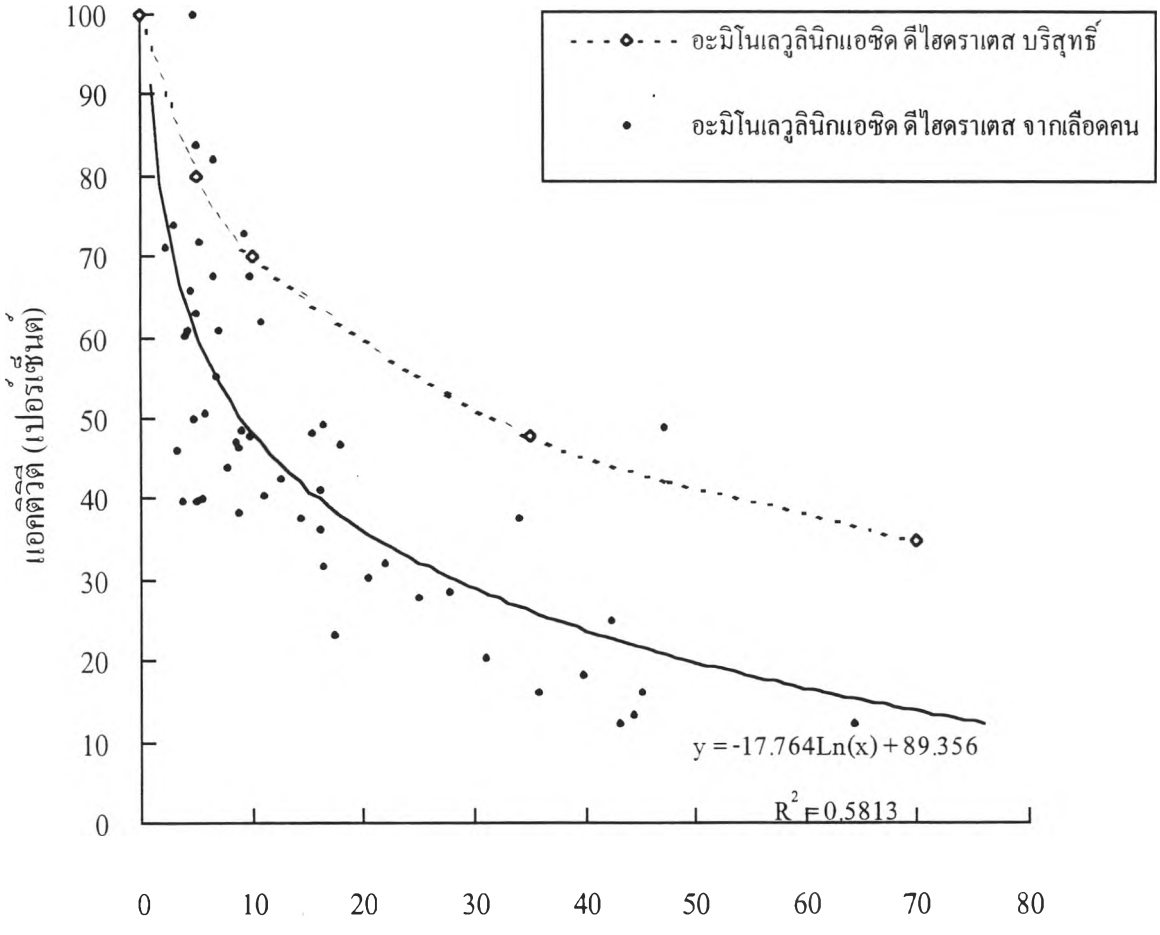
4.6.2 ความสัมพันธ์ของปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ของตัวอย่างทั้งหมด

จากรูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือด กับแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส เป็นแบบเอกซ์โปเนนเชียล (exponential) แบบผกผัน เมื่อปรับแกน y เป็น log แอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส และแกน x เป็นปริมาณตะกั่วจะได้เส้นตรงซึ่งมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ซึ่งคำนวนจากข้อมูลดิบในภาคผนวก ง r = -0.8643 ใกล้เคียงกับงานของ Hernberg *et al.* (1970a) (r = -0.9) และงานของ Abdulla, Fristedt and Haeger–Aronson (1971) (r = -0.83) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ของงานวิจัยนี้ (r = -0.8643) หมายถึงมีระดับความสัมพันธ์อยู่ในเกณฑ์ดี เมื่อทดสอบกับตารางค่าวิกฤต สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันดังภาคผนวก ค พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างแท้จริง และ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส (y) (ยูนิต) สามารถประมาณค่าตะกั่วในเลือด (x) (ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ได้ถูกต้อง ประมาณ $-0.8643^2 \times 100 =$ **74 เปอร์เซ็นต์** จากภาพขจายสามารถหาสมการเส้นถดถอยได้ดังนี้

$$y = -92.066 \ln(x) + 437.54$$

ค่าปกติของแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ซึ่งคำนวณจากค่ามาตรฐานปริมาณตะกั่ว ในเลือดที่ยอมรับได้ในประเทศไทย 40 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แทนในสมการถดถอยจะได้ค่าแอคติวิตีที่ปลอดภัยเป็น 98 ยูนิต ซึ่งใกล้เคียงกับงานของ Burch and Siegle (1971) ซึ่งศึกษาในชายสุขภาพดี 18 คนด้วยสภาวะการวิเคราะห์เดียวกันได้ค่า 108 ยูนิต อย่างไรก็ตามการกำหนดค่าปกติในทางการแพทย์ควรได้จากตัวอย่างคนสุขภาพดีที่ไม่มีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อแอคติวิตีเลย

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาใน อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์จากซีรัมวัวได้ผลดังรูปที่ 4.19 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตะกั่วมีผลทำให้แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสจากเลือดคนลดลงมากกว่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน่าจะเกิดจากในเลือดคนมีปัจจัยอื่นที่ทำให้แอคติวิตีลดลง หรืออาจเกิดจากระยะเวลาที่ยาวนานในการสัมผัสตะกั่วของคนจริงๆ มากกว่าในหลอดทดลองฉะนั้นตะกั่วไม่เพียงแต่ทำให้แอคติวิตีลดลงเท่านั้นแต่อาจทำให้ปริมาณเอนไซม์ลดลงด้วย อย่างไรก็ตามเอนไซม์ทั้งสองลดลงแบบเอกซ์โปเนนเชียลไปในทางเดียวกันและมีแนวโน้มจะลดลงอีกเมื่อตะกั่วเข้มข้นขึ้น (มากกว่า 80 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) นอกจากนี้การลดลงมิได้เกิดจากปัจจัยของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เพราะจากการศึกษาสหสัมพันธ์ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือดกับเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีความสัมพันธ์กับแอคติวิตีต่ำมากจนเกือบไม่มีผลต่อกัน (r = -0.307 ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์)



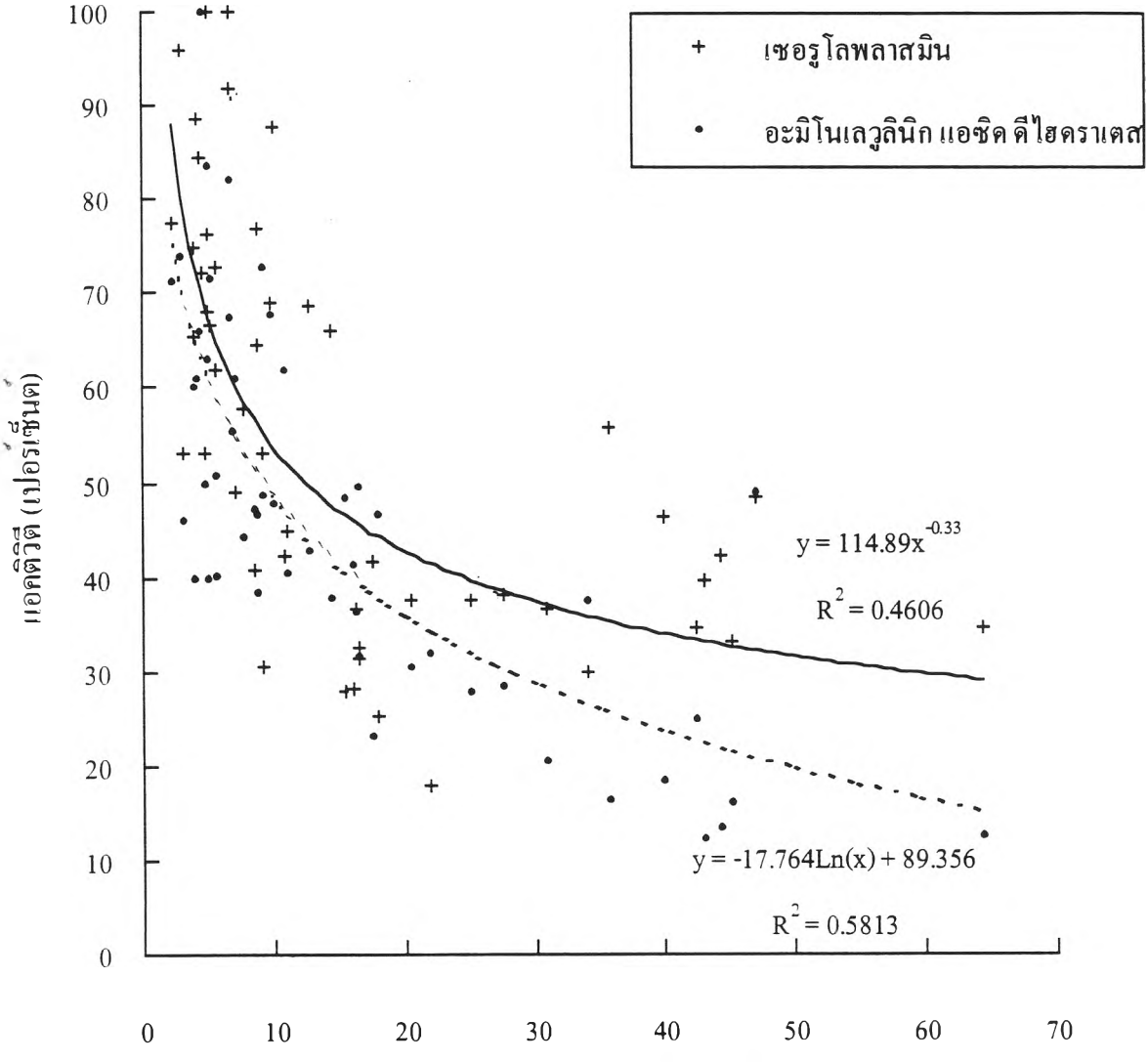
รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบผลของตะกั่วต่อแอคติวิตีของ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสจากเลือดคน และ อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสบริสุทธิ์จากซีรัมวัว (จากรูปที่ 4.15 และ 4.20)

4.6.3 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ของตัวอย่างทั้งหมด

จากตัวอย่างเลือดทั้งหมดพบว่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส มีความสัมพันธ์กับปริมาณตะกั่วในเลือด ($r = -0.8643$) มากกว่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน ($r = -0.6785$) โดยแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสประมาณค่าตะกั่วในเลือดได้ถูกต้อง 74.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินประมาณค่าได้ถูกต้อง 46.0 เปอร์เซ็นต์ทั้งนี้เนื่องจากแนวโน้มความสัมพันธ์ของแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกที่มีตะกั่วปริมาณต่ำ (ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) แล้วคงตัวเมื่อปริมาณตะกั่วเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงควรแยกพิจารณาเฉพาะในช่วงที่ปริมาณตะกั่วไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรด้วย

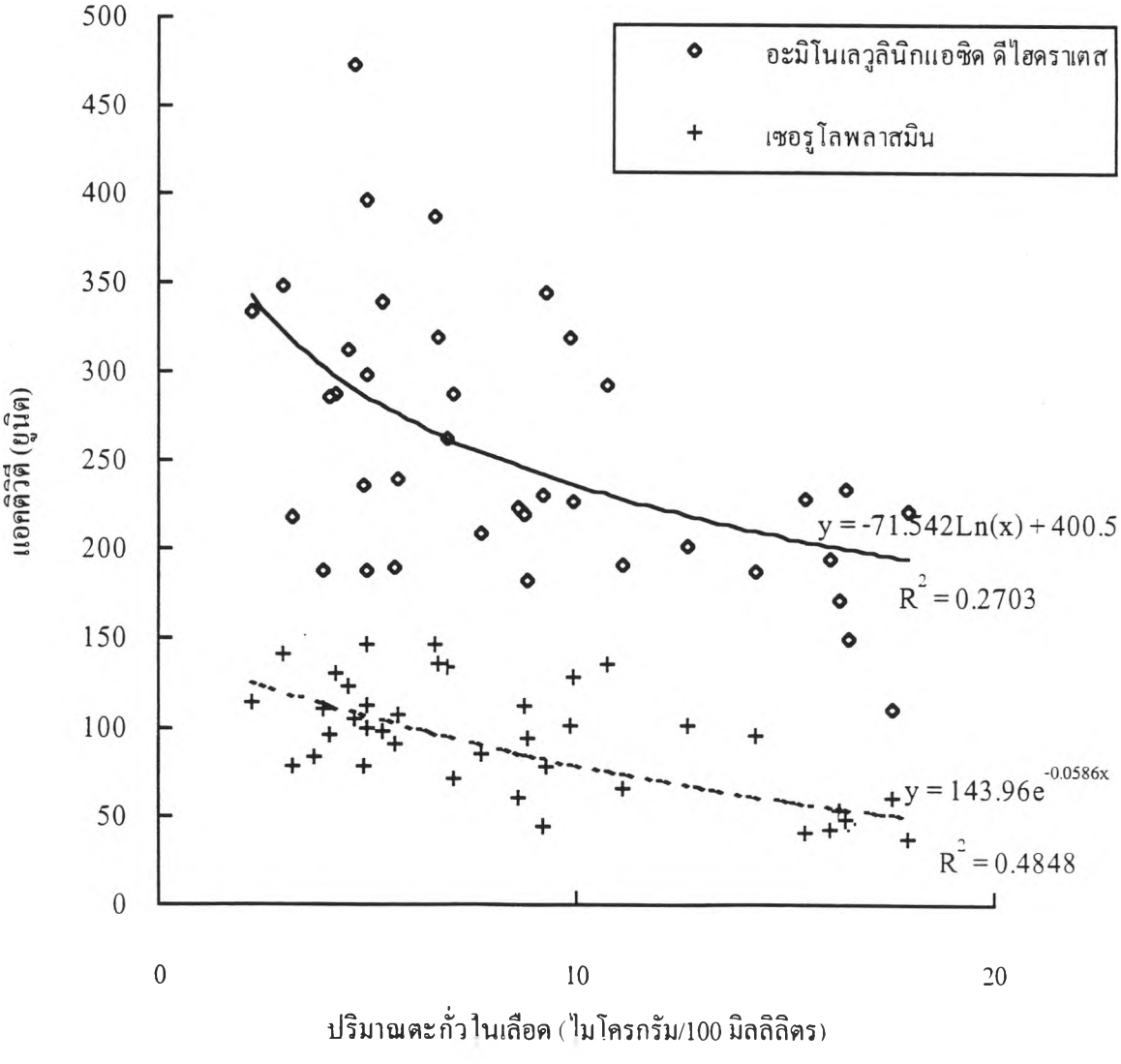
อย่างไรก็ตามเพื่อให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบจึงปรับกราฟของความสัมพันธ์แบบข้อมูลดิบจากรูปที่ 4.17 ให้แกน y เป็นแอคติวิตีแบบเปอร์เซ็นต์ ได้ดังรูปที่ 4.20 ซึ่งพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองพบว่าไม่ต่างกันนัก (ไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์) ในช่วงแรกที่ตะกั่วไม่เกิน 15 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แต่ช่วงหลังเมื่อความเข้มข้นของตะกั่วมากขึ้นแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิดดีไฮดราเตสลดลงมากกว่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (80 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และยังคงมีแนวโน้มว่าจะลดลงอีกในขณะที่แอคติวิตีของออกซิเดสค่อนข้างคงตัวเมื่อปริมาณตะกั่วในเลือดมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงควรแยกพิจารณาความสัมพันธ์ที่ปริมาณตะกั่ว 0–20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรด้วย

พิจารณาความไวของเอนไซม์ต่อการยับยั้งด้วยตะกั่ว (Threshold) ที่ 50 เปอร์เซ็นต์พบว่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อปริมาณตะกั่วในเลือด 12.5 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในขณะที่แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสถูกยับยั้งได้เร็วกว่านั้นเล็กน้อยคือที่ 10 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.20 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือดกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสเป็นเปอร์เซ็นต์ จากเลือดคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี จำนวน 53 ตัวอย่าง (ดัดแปลงจากรูปที่ 4.17)

4.7 ความสัมพันธ์ของปริมาณตะกั่วในเลือด 0-20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส จากเลือดคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี (39 ตัวอย่าง)



รูปที่ 4.21 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณตะกั่วในเลือด 0-20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรกับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส จากเลือดคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี จำนวน 39 ตัวอย่าง (จากรูปที่ 4.17)

จากรูปที่ 4.21 พบว่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินลดลงตามความเข้มข้นของตะกั่วในเลือดที่เพิ่มขึ้น ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่คำนวนจากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดยปรับแกน x เป็น log ปริมาณตะกั่วในเลือดและแกน y เป็น log แอคติวิตีจะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีค่า r = - 0.6963 และมีความสัมพันธ์กันอย่างแท้จริงที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์นี้แสดงว่าแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน (y) (ยูนิต) สามารถประมาณค่าตะกั่วในเลือด (x) (ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)ได้ถูกต้องเท่ากับ -0.6963^2 x 100 = **48.5 เปอร์เซ็นต์** สมการถดถอยคือ

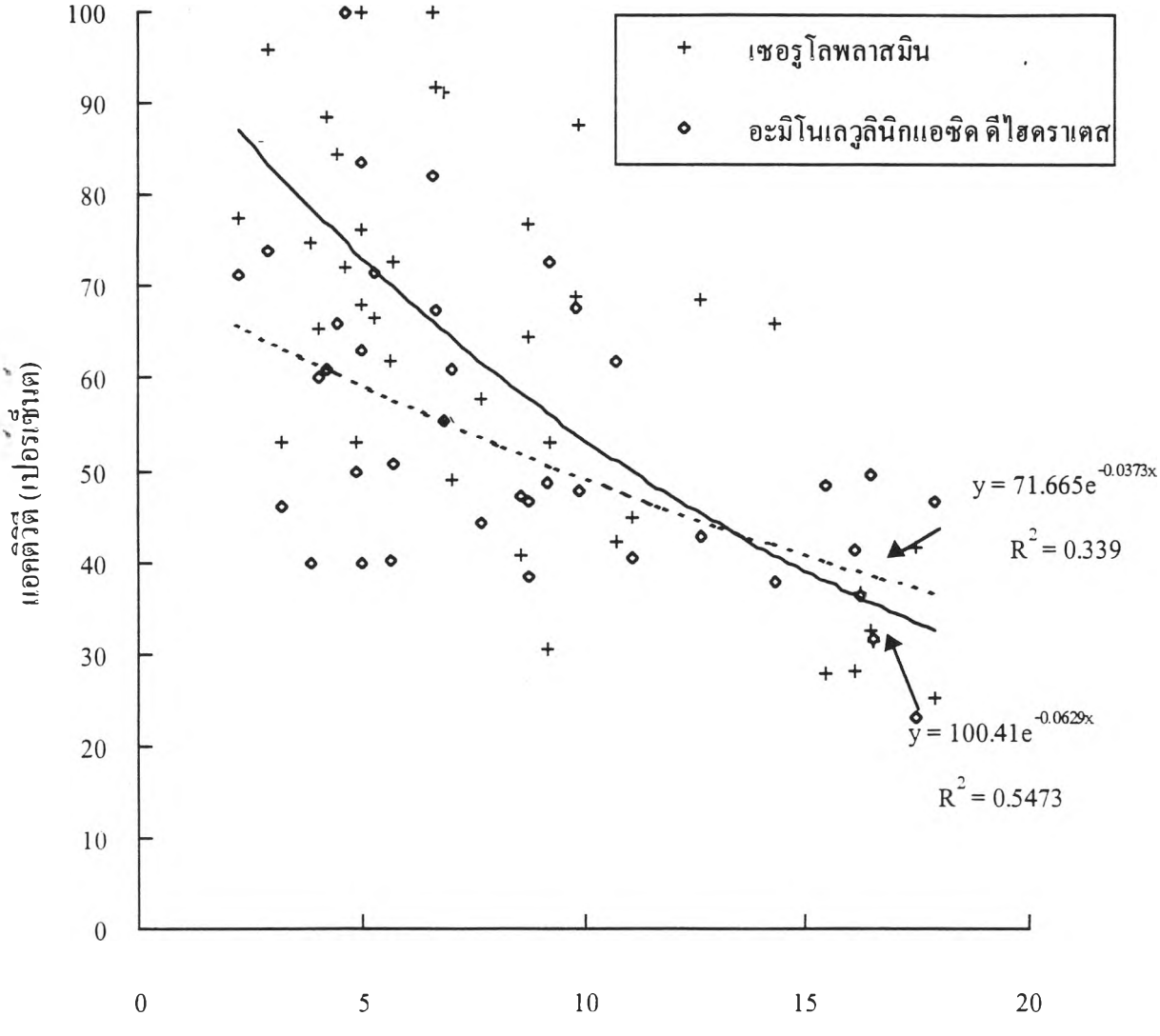
$$y = 143.96e^{-0.0586x}$$

แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสมีการลดลงแบบเอกซ์โปเนนเชียล โดยปรับแกน y เป็น log แอคติวิตีจะได้กราฟเส้นตรงซึ่งคำนวณตามโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ได้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r = -0.5785 แสดงว่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส (y) (ยูนิต) ประมาณค่าตะกั่วในเลือด (x) (ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ได้ถูกต้องเท่ากับ -0.5785^2 x 100 = **33.5 เปอร์เซ็นต์** สมการถดถอยคือ

$$y = -71.542\ln(x) + 400.5$$

สรุปว่าเมื่อพิจารณาเฉพาะตัวอย่างที่ตะกั่วในเลือดไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินมีความสัมพันธ์กับปริมาณตะกั่วในเลือด (r = - 0.6963) มากกว่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส (r = - 0.5785) โดยเอนไซม์ทั้งสองสามารถประมาณค่าตะกั่วในเลือดได้ถูกต้อง 48.5 และ 33.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เพื่อความสะดวกในการเปรียบเทียบจึงปรับให้การลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสอง (แกน y) เป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังรูปที่ 4.22 จะเห็นได้ว่าที่ระดับตะกั่วในเลือด 20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินลดลงมากกว่าแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ความไวของเอนไซม์ต่อการยับยั้งด้วยตะกั่ว (Threshold) ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลใกล้เคียงกับกราฟที่ได้จากตัวอย่างทั้งหมดในหัวข้อ 4.6.3 คือ แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินจะถูกยับยั้งที่ 12.5 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรส่วนแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสถูกยับยั้งที่ 10 ไมโครกรัมต่อ100 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.22 ความสัมพันธ์ของปริมาณตะกั่วในเลือด 0- 20 ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร กับแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินและแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตสเป็นเปอร์เซ็นต์จากเลือดคนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี จำนวน 39 ตัวอย่าง

4.8 ความแตกต่างของปริมาณตะกั่วในเลือด แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ของกลุ่มตัวอย่าง (คนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรี)

ใช้วิธีวิเคราะห์ทางสถิติแบบวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA, Analysis of Variance)

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณตะกั่วในเลือด แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน และแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวนคน (n)	ค่าเฉลี่ย (Mean)	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error)
ตะกั่วในเลือด			
คนปกติ	21	5.66	0.60
คนงานโรงพิมพ์	12	11.84	2.74
คนงานโรงงานแบตเตอรี	20	30.14	3.16
อะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส			
คนปกติ	21	300.6	28.15
คนงานโรงพิมพ์	12	228.9	23.93
คนงานโรงงานแบตเตอรี	20	129.45	13.38
เซอรูโลพลาสมิน			
คนปกติ	21	109.9	4.23
คนงานโรงพิมพ์	12	83.3	8.31
คนงานโรงงานแบตเตอรี	20	52.6	1.98

1 ปริมาณตะกั่วในเลือด

ไม่พบความแตกต่างของปริมาณตะกั่วในเลือดอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างคนปกติกับคนงานโรงพิมพ์ในขณะที่ 2 กลุ่มตัวอย่างดังกล่าวมีความแตกต่างกับคนงานโรงงานแบตเตอรี โดยค่าเฉลี่ยปริมาณตะกั่วในเลือดจากน้อยไปมากคือ คนปกติ คนงานโรงพิมพ์ และคนงานโรงงานแบตเตอรีซึ่งคนงานโรงงานแบตเตอรีมีปริมาณตะกั่วในเลือดโดยเฉลี่ยสูงถึง 30 ไมโครกรัมต่อเลือด 100 มิลลิลิตร

2 แอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิด ดีไฮดราเตส

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าไม่มีความแตกต่างของแอคติวิตีของอะมิโนเลวูลินิกแอซิดดีไฮดราเตสอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างคนปกติกับคนงานโรงพิมพ์ ในขณะที่ 2 กลุ่มตัวอย่างดังกล่าวมีความแตกต่างกับคนงานโรงงานแบตเตอรี (ผลการวิเคราะห์คล้ายคลึงกับปริมาณตะกั่วในเลือด) ค่าเฉลี่ยของแอคติวิตีจากน้อยไปมากได้แก่ คนงานโรงงานแบตเตอรี คนงานโรงพิมพ์ และคนปกติ ผกผันกับปริมาณตะกั่วในเลือดซึ่งสอดคล้องกับการลดแอคติวิตีตามปริมาณตะกั่วที่เพิ่มขึ้น

3 แอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมิน

ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่างมีแอคติวิตีของออกซิเดสของเซอรูโลพลาสมินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่าเฉลี่ยจากน้อยไปมากคือคนงานโรงงานแบตเตอรี คนงานโรงพิมพ์และคนปกติ ผกผันกับปริมาณตะกั่วในเลือดซึ่งสอดคล้องกับการลดแอคติวิตีของออกซิเดสตามปริมาณตะกั่วที่เพิ่มขึ้น ความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นข้อดีในการเป็นตัวบ่งชี้ความเป็นพิษของตะกั่วของเซอรูโลพลาสมินที่สามารถแยกแยะกลุ่มตัวอย่างได้มากกว่าอีก 2 พารามิเตอร์ก็เป็นได้