

การเปรียบเทียบระดับของ Protein carbonyl content และ Ischemia-modified albumin ในซีรัมของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

ฐิติภรณ์ แมรุ่งเรืองวงศ์¹, อาทิตา วนารักษ์วงศ์^{1,2}, เฉลิมพล สังข์ทอง^{1,2}, กานต์ชนา วงศ์อินทร์อยู่^{1,2},
ไชยวัฒน์ ไชยสมบูรณ์³, โทมัส กองศรี⁴, สราวุธ คำปวน^{1,3} *

Received: November 6, 2012

Revised & Accepted: January 29, 2013

บทคัดย่อ

Protein carbonyl (PC) และ ischemia modified albumin (IMA) เป็นโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกลไกของภาวะเครียดออกซิเดชัน โปรตีนทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้เป็นสารบ่งชี้เพื่อวินิจฉัยความผิดปกติของหัวใจได้ และได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการตรวจวิเคราะห์โปรตีนทั้ง 2 ชนิดในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการตรวจวิเคราะห์โปรตีนทั้งสองชนิด ในการพยากรณ์ภาวะผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับ PC content และ IMA ในซีรัมของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA) เปรียบเทียบกับผู้มีสุขภาพดีโดยวัดระดับ PC content ในซีรัมผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ I, II, III และ IV กลุ่มละ 20 ราย และซีรัมของผู้มีสุขภาพดี 20 ราย ด้วยวิธี spectrophotometric DNPH และวัดระดับความเข้มข้นของ IMA ในซีรัมโดยวิธี Albumin cobalt binding assay ผลการศึกษาพบว่า ระดับของ PC content ในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังทุกกลุ่มมีค่าสูงกว่าผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับ PC content ในผู้ป่วยแต่ละระดับความรุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของ IMA ในทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ PC content สรุปได้ว่า ระดับของ PC content ในซีรัมสามารถคัดกรองกลุ่มผู้มีสุขภาพดีออกจากกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังได้ดีกว่า IMA แต่ยังไม่มีความเหมาะสมเพียงพอที่จะใช้เป็นสารบ่งชี้ในการพยากรณ์ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

คำสำคัญ: หัวใจล้มเหลวเรื้อรัง, Protein carbonyl, Ischemia modified albumin

¹ หน่วยวิจัยชีวการแพทย์ทางด้านวิทยาศาสตร์ของหัวใจและหลอดเลือด

² ภาควิชาเทคโนโลยีหัวใจและทรวงอก ³ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

⁴ กลุ่มงานอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลพุทธชินราช

* ผู้รับผิดชอบบทความ



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

Titiporn Mekrungruangwong^{1,2}, Atita Winarukwong^{1,2}, Chalernpol Sangtong^{1,2}, Karnchana Vonginyoo^{1,2},
Chaiwat Chaisomboon³, Tomon Thongsri⁴, Sarawut Kumphune^{1,3*}

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 was significantly higher than that of healthy subjects ($P < 0.001$) and there were not significantly different between functional classes. In addition, the serum IMA level was not different in all subject groups ($P > 0.05$) 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.

Keywords: Chronic heart failure, Protein carbonyl, Ischemia modified albumin

¹Biomedical Research Unit in Cardiovascular Sciences (BRUCS),

²Department of Cardio Thoracic Technology,

³Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Naresuan University, Phitsanulok

⁴Department of Medicine, Buddhachinaraj Hospital, Phitsanulok 65000 THAILAND

* Corresponding author (e-mail: sarawutk@nu.ac.th)

บทนำ

ภาวะหัวใจล้มเหลว เป็นภาวะที่หัวใจไม่สามารถบีบตัวส่งเลือดออกไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกายได้เพียงพอ กับความต้องการของร่างกาย⁽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

นอกจากการตรวจวินิจฉัยดังที่กล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจวิเคราะห์สารบ่งชี้การทำงานของหัวใจ เพื่อช่วยในการวินิจฉัย พยากรณ์โรค และติดตามผลการรักษาโดยในปัจจุบันสารบ่งชี้การทำงานของหัวใจ ที่ใช้ในปัจจุบันคือ Brain Natriuretic Peptide (BNP) และ pro-BNP อย่างไรก็ตามการประเมินผลการวิเคราะห์สารบ่งชี้ดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ เพศ วิธีที่ใช้ตรวจ และเชื้อชาติ⁽³⁾ นอกจากนี้ยังมีราคาแพง และทำได้ในโรงพยาบาลที่มีเครื่องมือวิเคราะห์อัตโนมัติเท่านั้น จึงมีการศึกษาค้นคว้าสารบ่งชี้ชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการวินิจฉัยภาวะหัวใจล้มเหลว สามารถตรวจวิเคราะห์ และแปลผลการวิเคราะห์ได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง จากการศึกษาวิจัยพบว่า ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง⁽⁴⁾ โดยมีความสัมพันธ์กับการเสียความสามารถในการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ⁽⁵⁾ และระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง^(4,5) โดยกลไกพื้นฐานพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชันที่

เกิดขึ้นนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต และที่สำคัญทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ และนำไปสู่ความผิดปกติของการทำงานของหัวใจอนุโมลิอิสระที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชันนั้น พบว่ามีผลในการลดปริมาณของไนตริกออกไซด์ ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของหลอดเลือด และส่งเสริมการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังขึ้น^(4,5) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีผลงานวิจัยที่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดออกซิเดชันและภาวะหัวใจล้มเหลว โดยทำการศึกษาถึงระดับของสารบ่งชี้การเกิด ภาวะเครียดออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต่างๆ เช่น จากการศึกษาของ Christopher และคณะในปี ค.ศ. 2003 พบว่าระดับ NADPH oxidase activity ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้น ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว⁽⁶⁾ และ NADPH oxidase activity ที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจเป็นกลไกการเกิด กล้ามเนื้อหัวใจโตในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว⁽⁷⁾ ผลการศึกษาของ Kaul และคณะในปี ค.ศ.1993 พบว่าอนุมูลอิสระสามารถทำลายโมเลกุลของโปรตีนในกล้ามเนื้อหัวใจ⁽⁸⁾ นอกจากนี้มีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลของโปรตีนในภาวะเครียดออกซิเดชันหรือ protein oxidation ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ทำให้เกิดการเกิดการจับกันระหว่างโปรตีนและหมู่คาร์บอนิล (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 พบว่า การตรวจวิเคราะห์ระดับของ PC content และ IMA ในซีรัม สามารถใช้ในการวินิจฉัยภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้⁽¹²⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษาระดับของ PC content และ IMA ในซีรัมของผู้ป่วยในภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การศึกษาระดับของ PC content และ IMA ในซีรัมของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งแยกระดับความรุนแรง คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาระดับของ PC content และ IMA ในซีรัมผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตาม New York Heart Association (NYHA)^(1,2) เพื่อให้ทราบถึง

ประโยชน์ของการวิเคราะห์ระดับของ PC content และ IMA ในซีรัม ในการวินิจฉัย พยากรณ์ ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. การคัดเลือกตัวอย่าง

กลุ่มผู้มีสุขภาพดีจำนวน 20 รายไม่กำหนดเพศ และอายุโดยนิยามคำว่าสุขภาพดี คือ ผลการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจปกติ ไม่มีโรคประจำตัว เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูงหรือโรคหัวใจโรคมะเร็ง ไม่รับประทานอาหารเสริมหรือยาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี หรือ วิตามินอี ภายในระยะเวลา 12 เดือนก่อนเข้าร่วมการวิจัย โดยพิจารณาข้อมูลจากแบบสอบถามคัดกรองผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังจำนวน 80 ราย โดยแบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA)^(1,2) จำนวนกลุ่มละ 20 ราย ไม่กำหนดเพศ และอายุโดยเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจและรักษาในโรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก และได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยด้วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง โดยมีความสามารถในการบีบเลือดออกจากหัวใจ (ejection fraction) น้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 40 หากผู้ป่วยมีการทำงานของตับ ไต ผิดปกติ โรคเบาหวาน มะเร็งหรือได้รับการผ่าตัดภายในระยะเวลาอย่างน้อย 3 เดือน โดยพิจารณาข้อมูลจากแบบสอบถามและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการในเวชระเบียนของโรงพยาบาลอย่างน้อย 6 เดือนจะถูกคัดออกจากการศึกษา อาสาสมัครที่เข้ายินยอมเข้าร่วมงานวิจัยโดยการลงนาม การศึกษานี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยจาก คณะกรรมการวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลพุทธชินราชเลขที่ 104/54 และมหาวิทยาลัยนเรศวรเลขที่ 55 01 01 0007

2. การเก็บตัวอย่างซีรัม

ซีรัมได้จากเลือดของผู้มีสุขภาพดีที่แบ่งเก็บด้วย ปริมาตร 3 มล. จากผู้มีสุขภาพดีจำนวน 20 ราย เก็บแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ ซีรัมของผู้ป่วยจำนวน 80 ราย ที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ที่เหลือจากการส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก เก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

3. การตรวจวัดระดับ PC content ในซีรัม

ตรวจวิเคราะห์ระดับ PC content ด้วยวิธี spectrophotometric DNPH assay โดยหลักการ คือ PC ในซีรัมจะทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) และเกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360-385 นาโนเมตร โดยนำซีรัมปริมาตร 200 ไมโครลิตรเติมลงในหลอดทดลอง 2 หลอด (หลอดที่ 1 สำหรับสิ่งส่งตรวจที่จะวิเคราะห์ หลอดที่ 2 สำหรับปฏิกิริยาควบคุม) จากนั้นเติม DNPH ปริมาตร 800 ไมโครลิตรลงในหลอดที่ 1 และเติม 2.5 M HCl ในหลอดควบคุม อุณหภูมิห้องในหลอดที่ 1 และ 2 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าผสมทุกๆ 15 นาที เติม 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 1 มล. ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน นำทั้งสองหลอดแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนบนทิ้ง และละลายตะกอนด้วย 10 % TCA ปริมาตร 1 มล. แช่หลอดทดลองในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาทีแล้วจึงปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนบนทิ้ง และละลายตะกอนด้วย (1:1) ethanol/ethyl acetate ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำซ้ำกันเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้าย ให้ละลายตะกอนด้วย guanidine hydrochloride ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วจึงปั่นเหวี่ยงปฏิกิริยาที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายโอนส่วนบน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 375 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ protein carbonyl สามารถคำนวณได้จากการหาค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของ sample ซึ่งหักลบจากค่าการดูดกลืนแสงของหลอดปฏิกิริยาควบคุม จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างตรวจมาคำนวณหาระดับความเข้มข้นของ protein carbonyl (nmol/ml) จากสูตร

$$\text{Protein carbonyl concentration (nmol/ml)} = \text{OD}_{375 \text{ nm}} \times 45.45$$

จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ

โปรตีนจากสูตรซึ่งได้จากการทำกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรด้วย bovine serum albumin

$$\text{Protein concentration (mg/ml)} = [\text{OD}_{280 \text{ nm}} - \text{Y intercept}] \times 2.5 / \text{Slope}$$

จากนั้นคำนวณหาปริมาณ PC content โดยใช้สูตร

$$\text{PC content (nmol/mg)} = \text{PC concentration (nmol/ml)} / \text{protein concentration (mg/ml)}$$

4. การวิเคราะห์ระดับ IMA ในซีรัม

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนอัลบูมินทางด้านปลาย (N-terminus) ทำให้ความสามารถในการจับกับ metal ion ของโปรตีนอัลบูมินลดลง การวัดความเข้มข้นของ IMA โดยวิธี albumin cobalt binding test (ACB test) ทำได้โดยผสม 0.1% (w/v) cobalt chloride (Sigma, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรกับ ซีรัม 200 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม dithiothreitol (DTT) 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 นาโนเมตรโดยใช้ serum-cobalt blank ที่ไม่มีการเติม DTT เป็นค่าอ้างอิงในการวัดค่าการดูดกลืนแสงและรายงานผลเป็นค่า absorbance unit (ABSU)⁽¹⁸⁾

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลด้วย Shapiro – Wilk test แสดงผลของข้อมูลเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD) หรือ ค่ามัธยฐาน (median) และช่วงความเชื่อมั่น (95% confidence interval หรือ 99 % confidence interval) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลอายุระหว่างผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย ทั้ง 4 ระดับด้วยสถิติ analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Tukey's multiple comparison test เปรียบเทียบความแตกต่างของค่ามัธยฐานระหว่างระดับของ PC content

และ IMA ในซีรัมผู้มีสุขภาพดีและกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย 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 อาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 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 จากข้อมูลพื้นฐานพบว่าเพศชายอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังประมาณร้อยละ 70 เมื่อทำการเปรียบเทียบอายุของทั้ง 5 กลุ่ม ไม่พบความแตกต่างของอายุระหว่างกลุ่มสุขภาพดี และ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I แต่พบความแตกต่างของอายุระหว่างกลุ่มสุขภาพดี กับ ผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ II, III และ IV อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

	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 $\pm$ SD)	47.6 $\pm$ 15.3	54.7 $\pm$ 15.9	62.8 $\pm$ 15.2*	64.4 $\pm$ 16.7*	63.05 $\pm$ 11.2*

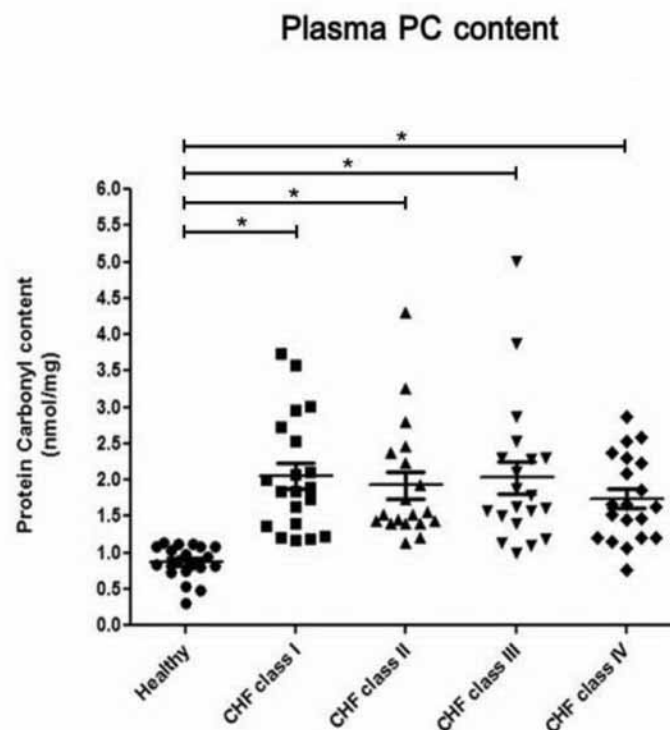
Analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test

* เปรียบเทียบกับกลุ่มสุขภาพดี กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

2. ระดับของ PC content และ IMA ในซีรัม

ระดับของ PC content ในซีรัมของที่วัดได้ในผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ 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 เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าระดับของ PC content ในซีรัมของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ I-IV มีค่าสูงกว่ากลุ่มสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของระดับของ PC content ระหว่างผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังทั้ง 4 ระดับ (รูปที่ 1)

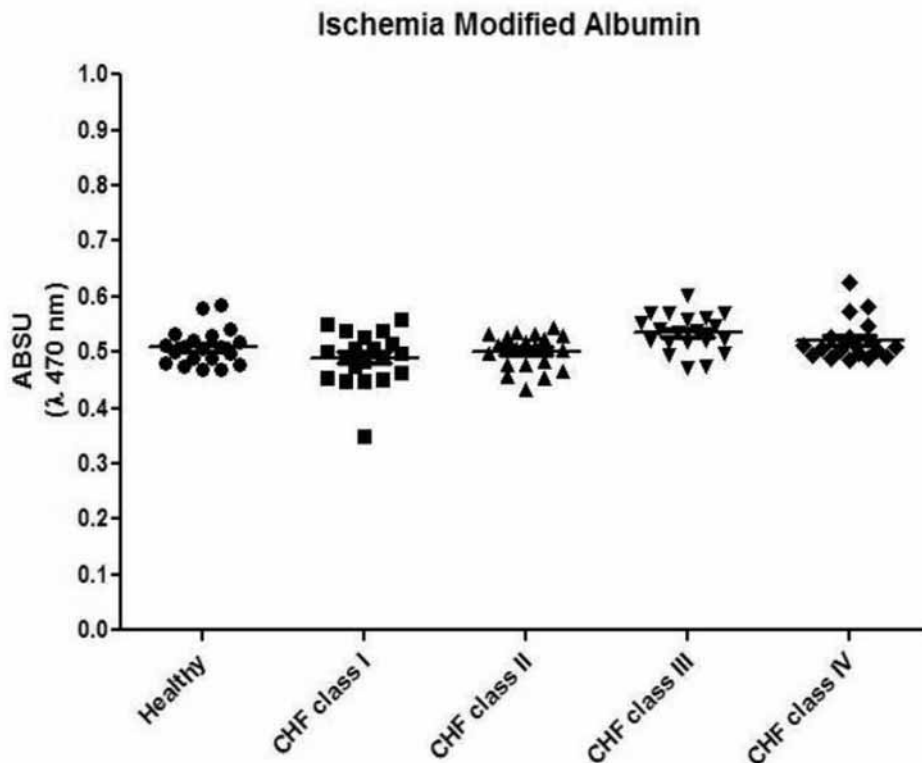


* เปรียบเทียบกับกลุ่มสุขภาพดี ที่ $P < 0.001$

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

การศึกษาพบว่าระดับ IMA ในซีรัมผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ 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) และ 0.511 (95% CI,

0.504-0.537) ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มผู้มีสุขภาพดีเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังทั้ง 4 ระดับ ($P > 0.05$) (รูปที่ 2)

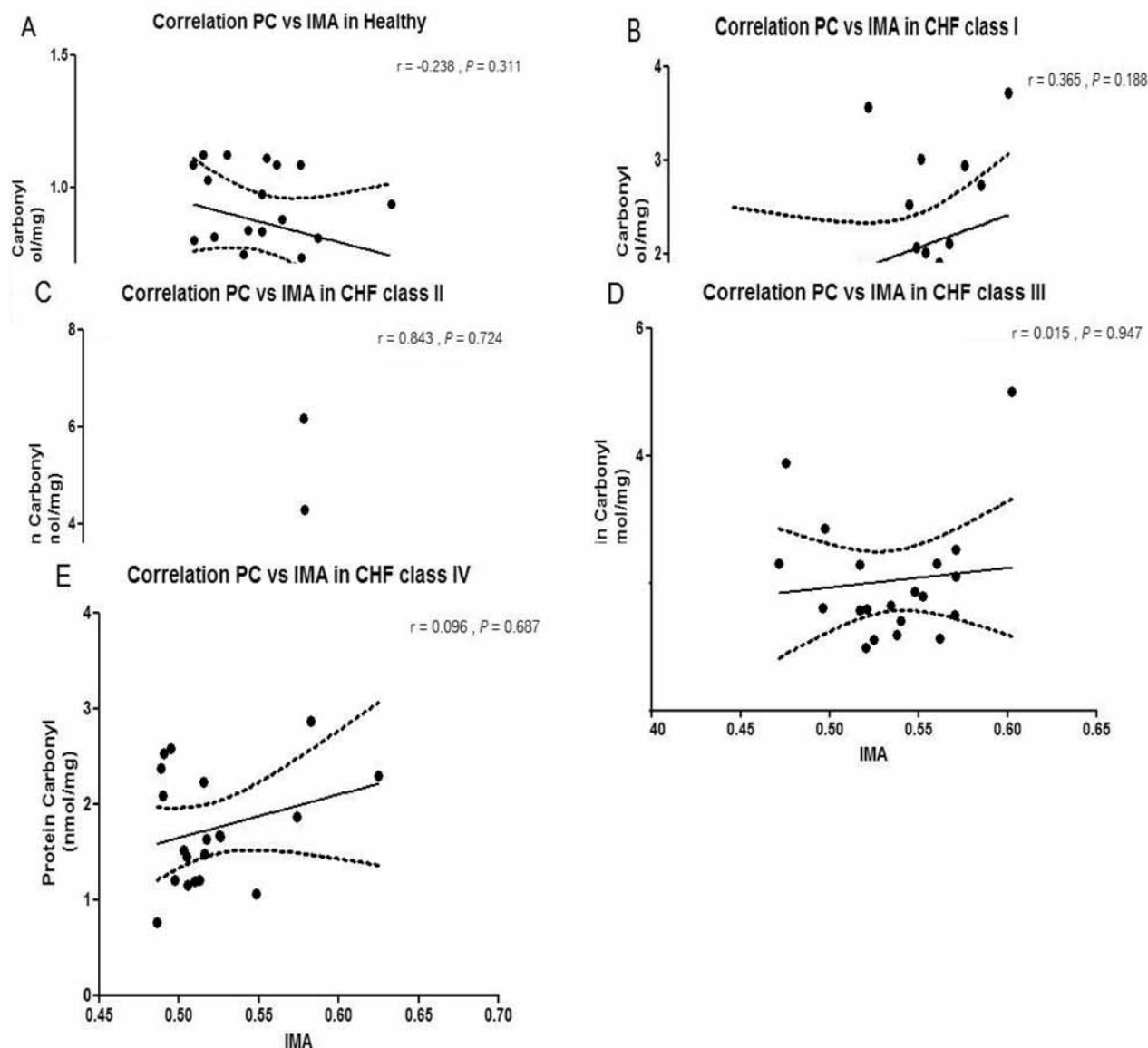


รูปที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบระดับ ischemia modified albumin ของกลุ่มสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ระดับ I-IV โดยมีค่า $P = 1.616$, 1.080, 2.402 และ 1.513 ตามลำดับ

3. ความสัมพันธ์ของระดับ PC content และ IMA ในซีรัมของผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ระดับ I-IV

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของ PC content และ IMA ในซีรัมของผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ I-IV พบว่าไม่มีความสัมพันธ์

ของระดับของ PC content และ IMA ในกลุ่มผู้มีสุขภาพดี ($r = -0.238$, $P = 0.311$) และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังระดับ 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)



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

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ภาวะเครียดออกซิเดชั่น หมายถึง ภาวะที่มีความไม่สมดุลของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระเป็นผลเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระหรือการที่มีสารต้านอนุมูลอิสระลดลงทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในร่างกายส่งผลให้เซลล์ภายในร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลาย⁽⁴⁾ อนุมูลอิสระ จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลของสารชีวโมเลกุลบางชนิด เช่น ไขมัน โปรตีน และกรด

นิวคลีอิก โดยกระบวนการที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน จะทำให้เกิดหมู่ functional group ใหม่ เช่น กลุ่ม hydroxyl และ กลุ่ม carbonyl⁽¹³⁻¹⁶⁾ ซึ่งเป็นผลจากกระบวนการหลายกระบวนการแตกต่างกันออกไป และสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุลดังกล่าว ผลจากการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุลที่กล่าวมาข้างต้นนั้นคือเกิดการแตกเป็นสายสั้น การผสานแขนง หรือ การคล้อยออกของโมเลกุล

ของโปรตีน⁽¹²⁾ ซึ่งกระบวนการทั้งหลายเหล่านี้ จะสอดคล้องกับระดับความรุนแรงของการปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุลโดยอนุมูลอิสระ โปรตีน IMA และ PC เป็นโปรตีนที่พบว่าถูกเปลี่ยนแปลงในโมเลกุลโดยอนุมูลอิสระ ซึ่งพบได้ในหลายพยาธิสภาพ เช่น กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ภาวะไตขาดเลือด เป็นต้น^(11,17-21) ทำให้มีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการเป็นสารบ่งชี้ที่มีความไวในการบ่งชี้การทำงานของอวัยวะ⁽¹²⁾ ผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบระดับของ PC content และ IMA ในซีรัมผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังที่แบ่งระดับความรุนแรงตามความสามารถในการทำหน้าที่ของร่างกาย New York Heart Association (NYHA) ระดับ I-IV เพื่อศึกษาถึงประโยชน์ของการวิเคราะห์ระดับของ PC content และ IMA ในซีรัมในการวินิจฉัย พยากรณ์ ภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังผลการศึกษาพบว่าระดับของ PC content ในซีรัม เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเมื่อเทียบกับผู้มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) แม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างของระดับของ PC content ในแต่ละระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังนอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของ IMA ในซีรัมผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับผู้มีสุขภาพดี และในแต่ละระดับความรุนแรงของภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง ($P > 0.05$) ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ระดับของ PC content ในซีรัมของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังมีความไวเชิงวิธีวิเคราะห์ (method sensitivity) สูงกว่าการวิเคราะห์ระดับ IMA ในซีรัมซึ่งการมีความไวเชิงวิธีวิเคราะห์ ของ PC content ที่สูงกว่า IMA นั้นไม่เพียงแต่พบในการศึกษาในภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังเท่านั้น แต่ยังพบในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดด้วย ดังรายงานการศึกษาของกฤษณ์ 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 มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังสอดคล้องกับการศึกษาของ Radovanovic และคณะที่พบว่า reactive carbonyl derivatives จะมีระดับเพิ่มสูงขึ้นในซีรัมผู้ป่วยภาวะหัวใจ

ล้มเหลวเรื้อรังแต่จะไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง⁽²³⁾ ซึ่งคณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่า ระดับของ PC content ในซีรัม ที่ไม่แตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังในการศึกษานี้เป็นผลจากการปรับตัวของร่างกายโดยผู้ที่อยู่ในสภาพของหัวใจล้มเหลวเรื้อรังร่างกายมีกระบวนการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงในร่างกายประกอบกับภาวะเครียดออกซิเดชันในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังอาจจะมียกระดับความเครียดสูงอยู่ก่อนแล้วเป็นพื้นฐาน ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของโปรตีนไปแล้ว ทำให้ระดับของโปรตีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยภาวะเครียดออกซิเดชัน มีปริมาณในซีรัมสูง ดังนั้นเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจึงไม่เห็นความแตกต่างเพราะอาจเกิดกระบวนการ oxidatively modified protein ที่มีมากอยู่แล้ว ดังนั้นทั้งระดับของ PC content หรือ IMA อาจไม่เหมาะสมในการแยกแยะระดับความรุนแรงในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังได้ แต่อาจใช้ระดับของ PC content ในการแยกผู้มีสุขภาพดีและผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังได้เท่านั้น ซึ่งเมื่อระดับความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น อาจต้องใช้การตรวจวิเคราะห์ระดับ oxidative stress marker อื่นๆ อาทิ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็น lipid peroxidation หรือ สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น glutathione เพื่อใช้ในการพิจารณาาร่วมด้วย⁽²²⁾

ข้อจำกัดของการศึกษาค้นคว้านี้ได้แก่ การไม่ได้ตรวจวิเคราะห์ระดับ 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 ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของกฤษณ์และคณะ พบว่าอายุไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของ PC content⁽¹²⁾

สรุปผลการศึกษา พบว่าระดับของ PC content ในซีรัมของผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง มีค่าสูงกว่าในผู้มีสุขภาพดี และไม่พบความแตกต่างนี้ในการวิเคราะห์ IMA ในซีรัมของทุกกลุ่มทดลอง นอกจากนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ PC content และ IMA ในซีรัมทั้งในผู้มีสุขภาพดี และผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรัง

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร รหัสโครงการ R2554C053 ขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการศึกษาครั้งนี้ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิเคราะห์ผล โรงพยาบาลพุทธชินราช จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. ผ่องพรรณ อรุณแสง. แนวคิดเกี่ยวกับโรคหัวใจและหลอดเลือดที่สำคัญสำหรับพยาบาล : ภาวะหัวใจล้มเหลว. ใน การพยาบาลผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด. พิมพ์ครั้งที่ 6. ขอนแก่น : โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา 2551; 111-166.
2. วรรณวรงค์ วงศ์เจริญ. Clinical assessment of heart failure. ใน อภิชาติ สุคนธทรัพย์ รังสฤษฏ์กาญจนะวณิชย์ บรรณาธิการ. Heart failure. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: โอเอมออร์เกไนเซอร์แอนด์แอ็ดเวอร์ไทซิง 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: 745-51.
4. Grieve DJ, Shah AM. Oxidative stress in heart failure more than just damage. *Eur Heart J* 2003; 24: 2161-3.
5. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 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 Cardiol* 2003; 18: 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: 477-84.
8. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK. Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 30: 55-67.
9. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003; 9: 169-76.
10. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 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 Radic Biol Med* 1999; 27: 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 Clin Biochem* 2011; 26: 389-95.
13. Marx G, Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals: reaction with copper(II) and ascorbate. *Biochem J* 1986; 236: 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; 42: 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; 92: 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; 19: 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: 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: 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: 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: 335-40.
 21. Melanson SF, Tanasijevic MJ. Laboratory diagnosis of acute myocardial injury. Cardiovasc Pathol 2005; 14: 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: 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: 493-501.