นิพนธ์ต้นฉบับ

# การตรวจวัดปริมาณกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี Dithiobisnitrobenzoic Acid Method ในกลุ่มคนไทยปกติและผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง

**วิบูลย์ รัตนาปนนท์*, รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย*, นัฏฐกาล ลีลารุ่งระยับ**, สรรเพชุดา สุภาษา*****

## บทคัดย่อ

**ความสำคัญ** กลูตาไธโอน (Glutathione) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีที่สำคัญ ในทางการแพทย์

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาปริมาณกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี DTNB ในกลุ่มคนไทยช่วงอายุ 21-40 ปี, 41-60 ปี และมากกว่า 60 ปี จำนวนกลุ่มละ 20 ราย เทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลประสาทเชียงใหม่ (ในวันที่ 2 หลังเข้ารักษา) จำนวน 20 ราย

**ผลการศึกษา** กลุ่มคนไทยในช่วงอายุ 21-40, 41-60, และมากกว่า 60 ปี มีปริมาณของ กลูตาไธโอน 72.2±10.2, 70.8±7.8 และ 65.8±7.3 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตรตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ค่าเฉลี่ยของกลุ่มปกติทั้งหมดเท่ากับ 69.6±8.8 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร ในกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองเท่ากับ 61.9±15.8 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

**สรุป** วิธี DTNB สามารถนำมาใช้ตรวจและบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองกับคนปกติได้ วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ 2544; 34: 12-21.

**คำรหัส** : GSH, DTNB, CVD

* ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2543-2544

# Abstract: Determination of Glutathione Level in Red Blood Cell with Dithio-bis-nitrobenzoic Acid Method in Normal and Cerebrovascular Disease Patients

**Ratthanapanon V*, Banjerdpongchai R*, Leelarungrayub N**, Suparsa S*****

**Rationale:** Glutathione (GSH) is an important antioxidant and a biochemical marker of oxidative stress organisms.

**Objective:** To study the level of glutathione in red blood cell determined by dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) method in Thai normal adult males, in 3 aging groups (n=20 each), 21-40, 41-60, and >60 year compared with cardiovascular disease (CVD) patients.

**Results:** It was found that the glutathione levels in Thai normal males were 72.2±10.2, 70.8±7.8, and 65.8±7.3 mg/dL erythrocyte, respectively which were not significant different among the groups ($p>0.05$), whereas that of CVD patients was 61.9±15.8 mg/dL erythrocyte. Mean of GSH levels in all normal Thai males was 69.6±8.8 mg/dL erythroyte which was significantly different ($p<0.05$) to the mean GSH level of CVD patients.

**Conclusion:** Simple DTNB-method can be used to determine and detect the different GSH levels between CVD and normal subjects. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2001; 34: 12-21.**

**Key words:** GSH, DTNB, CVD

* Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

** Physical Therapy Department, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

*** 4th Year Student, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, 2000-2001.

## บทนำ

**อนุมูลอิสระ (Free radical)**[1]

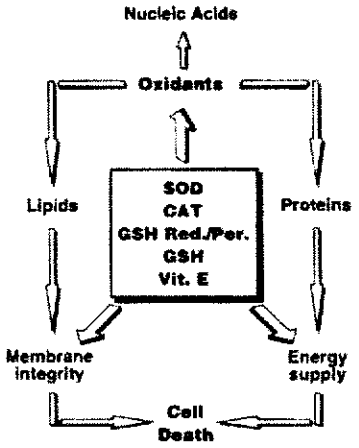
อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (Singlet or unpaired electrons) ในภาวะปกติอะตอมหรือโมเลกุลจะเสถียรเมื่อมีอิเล็กตรอนครบคู่ ดังนั้นการที่อะตอมหรือโมเลกุลมีอิเล็กตรอนเดี่ยว จะมีคุณสมบัติไม่คงตัวมีฤทธิ์ว่องไวขึ้น จึงพยายามหาอิเล็กตรอนอีกตัวหนึ่งมา

เป็นคู่ โดยการแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาไว้บนตัวมัน หรือรวมกับโมเลกุลอื่นด้วย

สัญญลักษณ์ของอนุมูลอิสระคือ $R^{\bullet}$ ใช้ได้ทั้งเป็นอะตอมและโมเลกุล การเขียนอนุมูลอิสระจะตามด้วยจุด (•) เสมอซึ่งเป็นเครื่องหมายแทนอิเล็กตรอนเดี่ยว ในบางกรณีอาจเติมเครื่องหมาย (-) ติดอยู่ข้างบนสัญลักษณ์ เช่น $O^{\bullet}_2{}^-$ หรือ $O_2^-$ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide, Hydrogen peroxide, Hydroxyl radical, Peroxyl radical, Singlet oxygen หรือ Ozone เป็นต้น หากมีปริมาณของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์มากเกินไปจะส่งผลต่อองค์ประกอบภายในเซลล์ต่างๆได้แก่ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลิอิก คุณสมบัติดังกล่าวนี้ทำให้อนุมูลอิสระเป็นอันตรายต่อเซลล์ในร่างกาย เช่นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอะตอมเซลล์เสียความมั่นคง และส่งผลให้การทำงานของเซลล์นั้นเสียไป พยาธิสภาพต่างๆ เช่นอาการบวม, โรคมะเร็ง, ความแก่, ไขมันอุดตันในเส้นเลือด เป็นต้น

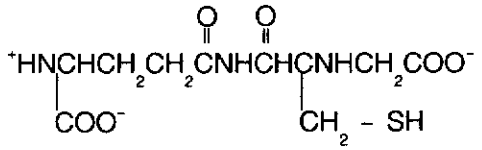
**สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)[2]**

สารต่อต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ในการทำลายหรือเปลี่ยนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ให้กลายเป็นสารที่ไม่มีอันตรายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ โดยที่ธรรมชาติแบ่งออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular antioxidant) ได้แก่กลุ่มเอนไซม์ต่างๆ เช่น Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), Glutathione reductase, Glutathione-S-transferase (GST), หรือ Reduced Glutathione (GSH), Histone เป็นต้น และกลุ่มที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular antioxidant) ได้แก่สารโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ Ascorbic acid, Uric acid, bilirubin, Alpha-tocopherol, หรือ Carotenoids เป็นต้น ความสัมพันธ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับไขมัน โปรตีน กรดนิวคลิอิก และผนังเซลล์ ดังรูปข้างล่าง

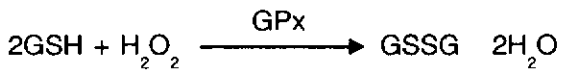



**กลูตาไธโอน (Glutathione)[3,4]**

เป็นไตรเปปไทด์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ Glutamic acid, Cysteine, Glycine มีสูตรโครงสร้างเคมีดังนี้



หน้าที่ของสารกลูตาไธโอนในสภาพ Reduced GSH คือการลดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่สำคัญคือ Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) ได้เป็นโมเลกุลของน้ำแล้ว GSH จะกลายเป็น Oxidized form (GSSG) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ GSH peroxidase (GPx) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ทุกเซลล์ภายในร่างกาย ดังสมการ



นอกจากกลูตาไธโอนจะช่วยลดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์แล้ว ยังมีส่วนช่วยขนถ่ายกรด

อะมิโนในกระบวนการ γ-Glutamyl cycle ในเซลล์ยังช่วยป้องกันการเกิด Auto-oxidation ของไขมันในร่างกาย และที่สำคัญพบว่ามีส่วนสำคัญในการรักษาสภาพความแข็งแรงของผนังเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะพบว่าเม็ดเลือดแดง จะมีปริมาณกลูตาไธโอนค่อนข้างมาก ซึ่งจะปรากฏอยู่ในรูป Reduced GSH เป็นส่วนใหญ่ โดยเมื่อเทียบเป็นปริมาณของ Thiol group ในเม็ดเลือดแดงทั้งหมดแล้ว มีถึง ร้อยละ 10-15[5]

**โรคหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular Disease)**

คือกลุ่มอาการที่เกิดขึ้นทันทีทันใด หรือมีอาการแสดงอยู่นานกว่า 24 ชั่วโมง สาเหตุเกิดจากความผิดปกติของหลอดเลือดสมอง ในความหมายนี้จะเห็นว่าไม่รวมสาเหตุที่ทำให้หลอดเลือดของสมองอุดตันหรือแตกที่เกิดจากภาวะต่างๆ เช่น Trauma, Infection เป็นต้น แต่จะหมายถึงความผิดปกติของเส้นเลือดสมองที่เกิดขึ้นเองในรูป เส้นเลือดอุดตันหรือแตกเท่านั้น มีผลให้เกิดการอ่อนแรงของร่างกายซีกใดซีกหนึ่งหรืออาจเกิดขึ้นทั้งสองซีกของร่างกาย แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. **Occlusive disease** โรคที่เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงในสมอง มี 2 ชนิด คือ

1.1 Thrombosis หลอดเลือดตีบ ส่วนใหญ่เกิดจากผนังของหลอดเลือดหนาและแข็ง (Atherosclerosis) หรือจากการเสื่อม (Degeneration) ของหลอดเลือดแดง ส่วนน้อยเกิดจากความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและส่วนประกอบอื่นๆ ภายในเลือด เช่น มีเกร็ดเลือดเพิ่มขึ้น (Polycythemia) เป็นต้น ถ้าพยาธิสภาพเป็นมากขึ้น ไม่ว่าจะเกิดจากสาเหตุใด หลอดเลือดก็จะอุดตันได้ในที่สุด

1.2 Embolism หลอดเลือดอุดตันจาก Emboli อาจเกิดจากโรคของหัวใจหรือโรคของหลอดเลือดเองได้ Embolism ที่เกิดจากโรคหัวใจ เช่น โรคลิ้นหัวใจ (Valvular heart diseases) หรือหัวใจเต้นผิดปกติ เช่น Atrial fibrillation ส่วน Embolism ที่เกิดจากหลอดเลือด เช่น มีการแตกของ Atherosclerotic plaque ของหลอดเลือดแดง Carotid ทำให้เกิด Emboli ซึ่งมักจะเป็นก้อนของเกร็ดเลือดหลุดไปอุดหลอดเลือดแดงในสมอง

2. **Hemorrhagic diseases** คือโรคที่เกิดจากการแตกของหลอดเลือดแดงในสมอง แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

2.1 Intracerebral hemorrhage มีเลือดออกในสมอง มักเกิดจากความดันโลหิตสูง

2.2 Primary subaracchnoid hemorrhage มีเลือดใน Subaracchnoid โดยตรง มักเกิดจากการแตกของหลอดเลือดโป่ง

**พยาธิสภาพของสมองในการเกิด CVD**

เกิดได้หลายประการด้วยกันเช่น สมองขาดเลือดไปเลี้ยงแต่เนื้อสมองยังไม่ตาย หรือสมองขาดเลือด แล้วเกิดภาวะสมองตาย หรือเลือดออกในสมองหรือมีก้อนเลือดในเนื้อสมอง

**ความสัมพันธ์ของกลูตาไธโอนกับภาวะและโรคหลอดเลือดสมอง**

สมองเป็นอวัยวะที่มีเมตาโบลิสมสูง หนัก 2-3% ของน้ำหนักร่างกาย ต้องการเลือดไปเลี้ยงประมาณ 20-30 % ของ Cardiac output ต้องการออกซิเจนมากกว่า 20 % ของความต้องการออกซิเจนของร่างกายทั้งหมด ใน 24 ชั่วโมง สมองที่หนัก 1,400 กรัม ต้องการเลือดไปเลี้ยง 1,000 ลิตร ออกซิเจน 71 ลิตร และกลูโคส 100 กรัมและปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ 71 ลิตรและกรดแลคติก 7 กรัม[7] เนื้อเยื่อสมองประกอบไปด้วย Polyunsaturated fatty acid side chain จำนวนมาก ทำให้สมองมีการสร้างสารอนุมูลอิสระได้มากทั้ง Oxygen radical และ Lipid peroxide อย่างต่อเนื่อง ดังปฏิกิริยา

Initiation $LH + {}^{\bullet}OH \longrightarrow L^{\bullet} + H_2O$

$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$

Chain propagation

$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$

Oxygen radical ที่เกิดขึ้นนี้จะมีผลต่อเนื้อเยื่อ Parenchyma และผนังหลอดเลือดในระบบประสาทส่วนกลาง[8] ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ GSH redox status ในการป้องกันเซลล์ประสาทและเนื้อเยื่อสมอง

$^{\bullet}OH + GSH \longrightarrow H_2O + GS^{\bullet}$

$LO^{\bullet} + GSH \longrightarrow LOH + GS^{\bullet}$

$LOO^{\bullet} + GSH \longrightarrow LOOH + GS^{\bullet}$

**หมายเหตุ** $LO^{\bullet}$, $LOO^{\bullet}$ (Lipid peroxide), $GS^{\bullet}$ (Glutathione thiyl), OH (Hydroxyl radical)

และยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)[5] อื่นๆในร่างกายได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี ในเนื้อเยื่อสมองยังมีปริมาณลดลงอย่างมากเช่นกัน

**วิธีการตรวจหาปริมาณกลูตาไธโอน**[10,14]
**(Glutathione determination)**

วิธีที่นิยมคือ GSSG reductase-DTNB assay แต่เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องใช้ GSSG reductase และ NADPH ซึ่งมีราคาสูง มีรายงานที่เสนอแนะการตรวจหาปริมาณกลูตาไธโอนโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์และสารดังกล่าว ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว คือวิธี Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB method) มีหลักการเป็นการให้ Sulfhydryl groups (-SH) ในโมเลกุลของสารที่เราต้องการจะตรวจ ทำปฏิกิริยากับ DTNB ทำให้เกิดสีของสาร TNB เป็นสีเหลือง ซึ่งจะแปรตามปริมาณของกลูตาไธโอนที่มีอยู่ สามารถตรวจวัดได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับภาวะร่างกายที่มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นหรือมีสารต้านอนุมูลอิสระต่ำลงอย่างกว้างขวางในผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคปอด รวมทั้งโรคหลอดเลือดสมองด้วย การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจตรวจหาปริมาณกลูตาไธโอนด้วยวิธี DTNB ในกลุ่มคนไทยปกติในช่วงอายุ 21-40, 41-60, และมากกว่า 60 ปี และนำวิธีนี้มาตรวจเพื่อเปรียบเทียบปริมาณกลูตาไธโอนในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง กับคนปกติด้วย

## ขั้นตอนและวิธีการศึกษา

ทำการเจาะเลือดดำจำนวน 1.0 มล.ในหลอดเก็บเลือดขนาด 1.3 มล.ที่มีสารกันเลือดแข็งตัว (Acid citrate dextrose, ACD) จำนวน 0.2 มล. นำมาหาปริมาณของฮีมาโตคริท (Hematocrit, Hct), G-6-PD, กลูตาไธโอน จากตัวอย่าง 2 กลุ่มคือ

ก. กลุ่มคนไทยปกติ ช่วงอายุ 21-40 ปี, 41-60 ปี และมากกว่า 60 ปี ไม่มีประวัติโรคหรือมีโรคประจำตัวต่างๆ เช่น โรคหัวใจ, โรคระบบทางเดินหายใจ และไม่มีประวัติโรคทางพันธุกรรมเกี่ยวกับโรคเลือด เช่น Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency หรือ Thalassemia เป็นต้น

ข. กลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular disease, CVD) เป็นผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลประสาทเชียงใหม่ ทุกรายจะถูกเจาะเลือดในวันที่ 2 ของการรักษาตัวในโรงพยาบาล และต้องไม่มีประวัติโรคอื่นๆ เช่น โรคหัวใจ, โรคระบบทางเดินหายใจ, โรคเบาหวานเป็นต้นมาก่อน

**การหาค่าฮีมาโตคริท (Hematocrit, Hct)**[11]

โดยใช้ Plain microcapillary tube ปั่นเลือดด้วยอัตราความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น คิดเป็นร้อยละต่อปริมาตรของเลือดที่อยู่ในหลอดทั้งหมด

**การตรวจหาภาวะพร่องเอนไซม์ G-6-PD**[12]

ด้วยวิธี Methemoglobin reduction screening test โดยใช้เลือดจำนวน 0.25 มล. ผสมกับ Glucose/$NO_2$ จำนวน 0.01 มล. จากนั้นเติมสารละลาย Methylene blue จำนวน 0.01 มล. ผสมให้เข้ากันดี ปิดปากหลอดแก้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มล. สังเกตสีของสารละลายโดยเทียบกับหลอดที่ควบคุมและในหลอดที่มีเลือดผู้ที่มีภาวะพร่อง G-6-PD โดยหากพบว่าหลอดที่ทดสอบ เกิดสีน้ำตาลเหมือนในหลอดที่มีเลือดผู้ที่มีภาวะพร่อง G-6-PD แสดงว่ามีภาวะบกพร่องของ G-6-PD แต่หากมีสีก้ำกึ่งระหว่างหลอดควบคุมกับหลอดที่มีเลือดผู้ที่มีภาวะ G-6-PD เช่น แดงปนน้ำตาล รายงานว่า Partial deficiency

**การตรวจหาปริมาณกลูตาไธโอน**[10]

วิธีการ DTNB method โดยการใช้เลือดจำนวน 0.4 มล. ใส่ลงในน้ำกลั่นจำนวน 1.6 มล. เติมน้ำยาตกตะกอนจำนวน 3 มล. ทำการกรองตะกอนทิ้ง แล้วนำส่วนใส จำนวน 1 มล. มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DTNB 0.5 มล.ในบัฟเฟอร์ จำนวน 4 มล. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลูตาไธโอน (Sigma Chemical Co.) จากนั้นนำปริมาณกลูตาไธโอน ที่ได้ไปเทียบกับปริมาณฮีมาโตคริทจะได้เป็นหน่วย มก.ต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร (mg/dL of erythrocyte)

## ผลการศึกษา

กลุ่มคนปกติที่นำมาศึกษา แบ่งออกเป็น 3 ช่วงอายุคือ 21-40, 41-60 และมากกว่า 60 ปี กลุ่มละ 20 คน แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้คนปกติ ที่ได้ตรวจจริง คือช่วงอายุ 20-38, (ชาย 17 หญิง 3 คน) 41-53 (ชาย 13 หญิง 10 คน) และ 61-69 (ชาย 18 หญิง 2 คน) ปีตามลำดับ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มช่วงอายุเป็น 27.2±6.4, 45.9±3.8 และ 63.4±2.6 ปี ตามลำดับ

จากช่วงอายุ 3 ช่วงดังกล่าว ปริมาณกลูตาไธโอนในเลือด พบว่ามีค่าเป็น 72.2±10.02, 70.8±7.8 และ 65.8±7.3 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร และค่าเฉลี่ยในทุกช่วงอายุมีปริมาณกลูตาไธโอนเท่ากับ 69.6±8.8 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร ดังตารางที่ 1 และจากปริมาณเฉลี่ยเมื่อเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณสารกลูตาไธโอน 3 ช่วงอายุ พบว่าจะมีค่าลดลงตามช่วงอายุที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 1** ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูตาไธโอนของคนไทยในช่วงอายุต่างๆ

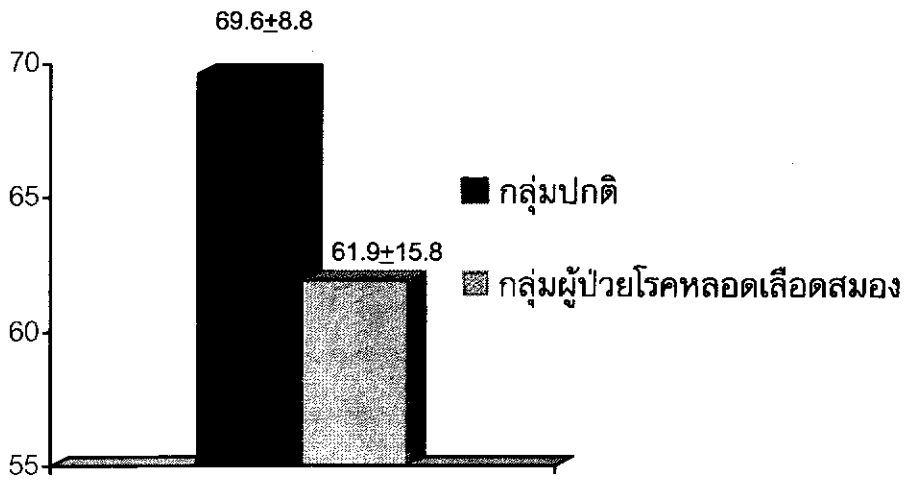
| ช่วงอายุ ปี | ปริมาณกลูตาไธโอน (มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร) | |
|---|---|---|
| | ช่วง | ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
| 21-40 | 58.0-93.0 | 72.2±10.2 |
| 41-60 | 54.0-88.0 | 70.8±7.8 |
| มากกว่า 60 | 42.0-75.0 | 65.8±7.3 |
| รวมทุกช่วงอายุ | 42.0-93.0 | 69.6±8.8 |

การตรวจปริมาณกลูตาไธโอนในเลือดของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองจำนวน 20 ราย เป็นเพศชาย 10 รายและหญิง 10 ราย และมีช่วงอายุ 40-75 ปี เฉลี่ย 63.9 ±11.1 ปี (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ข้อมูลผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง

| | | |
|---|---|---|
| จำนวน | เพศหญิง(คน) | 10 |
| | เพศชาย(คน) | 10 |
| อายุ | ช่วง(ปี) | 40-75 |
| | เฉลี่ย(ปี) | 63.9±11.1 |
| พยาธิสภาพ | ร่างกายซีกขวา(คน) | 6 |
| | ร่างกายซีกซ้าย(คน) | 5 |
| | ทั้งสองข้าง(คน) | 9 |

ปริมาณกลูตาไธโอนในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง จำนวน 20 ราย ดังกล่าว พบว่ามีค่าต่ำกว่ากลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังรูปที่ 1




**รูปที่ 1** ปริมาณกลูตาไธโอน (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เป็นมิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร

## บทวิจารณ์

ก่อนการตรวจหาปริมาณกลูตาไธโอนในคนปกติเราจะมีการตรวจกรองโรคบางอย่างเช่น Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency เนื่องจากผู้ป่วยโรคนี้ จะไม่สามารถใช้กลูโคสผ่าน Pentose Phosphate Shunt[13] จึงไม่สร้าง NADPH ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยน Oxidized glutathione ให้กลับเป็น Reduced glutathione ดังนั้นจะพบปริมาณกลูตาไธโอนต่ำกว่าคนปกติ เนื่องจากวิธีที่เราใช้ในการวัดนั้นจะเป็นการวัดกลูตาไธโอนในรูป Reduced

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การนำวิธีการตรวจด้วยด้วย DTNB-method[10] ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายโดยวิธีการตรวจนี้อาจเรียกว่า Modification of sulfhydryl group with DTNB assay[14] เป็นการจับกันระหว่างสาร DTNB กับ GSH ทำให้เกิดการแตกตัวของ DTNB ได้เป็น TNB สีเหลือง ตรวจวัดได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร เป็นวิธีที่ประหยัด รวดเร็ว มีความเที่ยงในระดับหนึ่ง โดยค่าความเที่ยงเมื่อทำไปพร้อมกัน เท่ากับ 3.45% และเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณความเข้มข้นของกลูตาไธโอนมาตรฐาน พบว่ากราฟเป็นเส้นตรงดีในช่วง 10 ถึง 50 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร (ไม่ได้แสดงกราฟ) แต่มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ระยะเวลาในการทดสอบควรทำการทดสอบภายใน 5 นาที ปริมาณกลูตาไธโอนที่ต่ำที่สุด ที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีนี้คือ 10 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตรและที่สำคัญ การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ เป็นการตรวจหาปริมาณสารที่มีหมู่ Sulfhydryl group ในเลือดหรือเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ซึ่งอาจรวมไปถึง Hemoglobin หรือ โปรตีนอื่นๆ ซึ่งทำให้จากการตรวจนี้ไม่จำเพาะต่อกลูตาไธโอนเพียงอย่างเดียว

ปริมาณกลูตาไธโอนที่ตรวจได้ในคนปกติพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 42 ถึง 93 เฉลี่ยเท่ากับ 69.6± 8.8 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกันกับค่าที่อ้างอิงที่ใช้วิธีการและสารเคมีแบบเดียวกับที่เคยมีรายงาน คือ 47 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร[10] และเมื่อสังเกตค่ากลูตาไธโอน ในแต่ละช่วงอายุที่ทำการศึกษา จะพบว่า เมื่ออายุเพิ่มขึ้น กลูตาไธโอนจะมีปริมาณลดต่ำลง เนื่องมาจากเมื่อมีอายุมากขึ้นร่างกายก็จะอ่อนแอมีโอกาสเจ็บป่วยได้มากกว่าคนหนุ่มสาวและยังมีปัญหาที่หลากหลายในด้านโภชนาการซึ่งมีผลมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ภาวะซึมเศร้า โรคเรื้อรัง หรือได้รับยารักษา รวมไปถึงการทำงานของร่างกายลดลง[15,16] จากภาวะต่างๆ ที่เกิดขึ้นทำให้ร่างกายอยู่ในภาวะ Oxidative stress ซึ่งจะมีการสร้างสารพวกอนุมูลอิสระมากขึ้น และทำให้ร่างกายต้องกำจัดสารอนุมูลอิสระอยู่ตลอดเวลามีผลทำให้พวกสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมีปริมาณลดต่ำลงได้

ส่วนในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองนั้นมีปริมาณกลูตาไธโอนลดต่ำลงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 1) น่าจะมีสาเหตุจากอนุมูลอิสระที่เกิดจาก Lipid peroxidation หรือสารพวกไขมัน Lipid peroxide ทำให้เม็ดเลือดแดงใช้กลไกป้องกันตัวเอง ดังนั้นภายในเม็ดเลือดแดงจึงมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ซึ่งรวมไปถึงระดับของกลูตาไธโอนด้วยสอดคล้องกับรายงานของ Juurlink[17] และ Juurlink กับ Sweeney[18] ซึ่งพบว่า กลูตาไธโอนและกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส จะเป็นตัวสำคัญในการลดปริมาณเปอร์ออกไซด์ในเซลล์สมองและเซลล์อื่นๆ ในร่างกายได้

โดยทั่วไปแล้วการวัดระดับกลูตาไธโอนในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง เดิมต้องตรวจในเนื้อเยื่อสมองที่ได้รับบาดเจ็บโดยตรง เพื่อดูระดับ

ความรุนแรง หรือการดำเนินโรค แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวัดระดับกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดง พบว่าสามารถบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างคนปกติและผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองได้ ซึ่งการวัดระดับกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงนี้ในอนาคต ถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้นอาจนำไปใช้ไปเป็น Biochemical marker ตัวหนึ่งที่ใช้ในการพยากรณ์ความรุนแรง หรือการดำเนินโรคเพิ่มเติมมาจากวิธีปัจจุบันที่ใช้กันอยู่

และปริมาณกลูตาไธโอนที่ตรวจวัดได้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นค่าในกลุ่มคนไทย สามารถนำไปใช้เป็นค่าเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆได้ และควรจะมีการวัดปริมาณในคนตามภูมิภาคต่างๆ และเพิ่มจำนวนของกลุ่มคนที่ใช้ในการทดสอบขึ้นอีก เพื่อให้ค่าที่ได้มีความน่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้น

## สรุป

โดยวิธี DTNB สามารถตรวจหาปริมาณกลูตาไธโอนในกลุ่มคนไทยในช่วงอายุต่างๆ คือ 21-40, 41-60 และมากกว่า 60 ปี ได้ค่าเท่ากับ 72.2±10.2, 70.8±7.8 และ 65.8±7.3 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร ตามลำดับ แต่ละช่วงกลุ่มอายุ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ค่าเฉลี่ยโดยรวมเท่ากับ 69.6±8.8 มิลลิกรัมต่อเม็ดเลือดแดง 1 เดซิลิตร จากปริมาณที่ตรวจพบได้พบว่าปริมาณของกลูตาไธโอนจะมีแนวโน้มที่ลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น

ในผู้ป่วยหลอดเลือดสมอง จำนวน 20 ราย มีประวัติเป็นโรคหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular disease: CVD) พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

## บรรณานุกรม


1. Asmus KD, Bonifacic M. Free redical chemistry, In: Sen CK, Packer L, Hanninen OOP, (eds), Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Tokyo: Elsevier Science BV, 2000; 3-54.
2. Sciuto AM. Antioxidant Properties of Glutathione and Its Tissue Protection, In: Baskin SI, Salem H (eds), Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals. Washington: Tayler&Francis, 1997; 171.
3. Anderson ME. Glutathione and Glutathione Delivery Compounds, In: Sies H (ed), Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. Toronto: Academic Press, 1997; 38: 65-78.
4. Sciuto AM. Antioxidant properties of SH and its role in tissue production, In: Baskin SI and Salem H (eds), Oxidants, Antioxidants and Free Radicals. Toronto: Taylor & Francis, 1997: 171-86.
5. Stocker R, Freki B. Endogenous Antioxidant Defenses in Human Blood Plasma, In: Sie H (ed), Oxidative Stress. Tonronto: Academic Press, 1991; 234.
6. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. Ischemia and Hypoxia, In; Basic Neurochemistry, 5th ed. New York: Raven Press, 1994; 877-83.
7. Muller R, Lehrach F. Heamorheology and cerebrovascular disease: multifunctional approch with pentoxifylline. Curr Med Res Opin 1981; 7: 253-36.
8. Kontos H. Oxygen radicals in CNS damage. Chem Biol Interact 1989; 72: 229-55.

9. Slivka A, Mytilineou C, Cohen G. Histochemical evalution of glutathione in brain. Brain Res 1987; 409: 275-84.
10. Beutler E, Duron O, Kelly B. Improved method for the determination of blood glutathione. Lab Clin Med 1963; 61: 882.
11. Dacie JV, Lewis SM. Practical Hematology, 6th ed. London: Churchill Livingstone, 1984; 32-4.
12. Dacie JV, Lewis SM. Practical Hematology, 6th ed, London: Churchill Livingstone, 1968: 140.
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection Against Oxidants in Biological Systems; the Superoxide Theory of Oxygen Toxicity. Oxford: Clarendon Press, 1989; 92-8.
14. Tawjik DS. Modification of Sulfhydryl Groups with DTNB, In: Walker JM (ed), The Protein Protocols Handbook. Human Press 1996; 367-8.
15. Lipschitz DA. Malnutrition in the elderly, Sem Dermatol, 1991; 10: 273-81.
16. Bray TM, Taylor CG. Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. Can J Physiol Pharmacol 1993; 71: 746-51.
17. Juurlink BHJ. Central role of glutathione in governing the response of astroglial and oligodiendroglial cells to ischemia-related insults. Recent Res Devel Neurochem 1996; 1: 179-92.
18. Juurlink BHJ, Sweeney MI. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. Neurosci Biobehav Rev 1997; 21: 121-8.