

การพัฒนาเอนไซม์เพื่อวิเคราะห์หาแลคเตทดีไฮโดรจีเนส

อรรถย ตั้งวรสิทธิชัย*

สุรพล ตั้งวรสิทธิชัย*

ทวิสุข กรณวัฒน์*

บทคัดย่อ

การพัฒนาเอนไซม์เพื่อวิเคราะห์หาแลคเตทดีไฮโดรจีเนส เติร์มโดยการแยกน้ำยาออกเป็น 2 ชนิด น้ำยาชนิดที่ 1 เป็น NADH และน้ำยาชนิดที่ 2 เป็น Pyruvic acid ผลการวิเคราะห์วิธีนี้ให้ค่าความเที่ยง (Precision) ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนอยู่ในช่วง 0.78% - 2.02% ให้ค่าความถูกต้อง (Accuracy) โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความคาดหวัง (% Expectation) เฉลี่ยเป็น 99.9% ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ทำได้สูงถึง 1,500 U/L วิธีนี้ให้ความสัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ด้วยชุดน้ำยาของบริษัทบอริงเกอร์ มานไฮม์ และบริษัทโรช ด้วยเครื่องอัตโนมัติ HITACHI 705 โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์เป็น 0.999 ($p < 0.001$) และ 0.990 ($p < 0.001$) ตามลำดับ น้ำยาวิเคราะห์นี้เหมาะที่จะใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติในปัจจุบันอย่างยิ่ง

คำรหัส : แลคเตทดีไฮโดรจีเนส, ชุดน้ำยาวิเคราะห์, วิธีการกลั่น, เอ็นเอคิเอส, กรดไพรูวิก

* สถานบริการเวชศาสตร์ชั้นสูง คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Abstract : Development of diagnostic test reagents for determination of lactate dehydrogenase
Tangvarasittichai O.*, Tangvarasittichai S.* and Kanlaun T.*

The development of diagnostic test reagents for determination of lactate dehydrogenase was proposed. NADH reagent was used as reagent 1 and pyruvic acid as reagent 2 on automatic analyzer HITACHI 705. The results showed good correlation with those obtained by the two commercial kits, Boehringer Mannheim and Roche, [$r=0.999$ ($p < 0.001$), $r=0.990$ ($p < 0.001$)] respectively. The coefficient of variation (%CV) of within-run and between-run assay by our reagents were between 0.78 and 2.02%, and good accuracy with average of 99.9%

expectation. The linearity for lactate dehydrogenase determination is up to 1,500 U/L. The method by our diagnostic test reagent is suitable for using with current automation analyzer.

Keyword : Lactate dehydrogenase, Diagnostic kit, Kinetic method, NADH, Pyruvic acid

* Center of Medical Laboratory Service, Faculty of Medical Technology, Mahidol University.

บทนำ

แลคเตทไอโซโครจินเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกลับไปมาของกรดไพรูวิกและกรดแลคติก พบได้ในเนื้อเยื่อทุกชนิดของร่างกาย ซึ่งจะมีค่าความเข้มข้นสูงกว่าในซีรัม ระดับในซีรัมจึงมีประโยชน์ในการใช้ติดตามผลการทำลายของเนื้อเยื่อ ซึ่งมีเอนไซม์แลคเตทไอโซโครจินเนสสูงได้โดยใช้ร่วมกับการตรวจวัดเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เพื่อดูแลของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย พบเอนไซม์ชนิดนี้ได้ในกล้ามเนื้อหัวใจ (124 หน่วย/กรัม) ตับ (145 หน่วย/กรัม) สมองและกล้ามเนื้อ (147 หน่วย/กรัม) ในเซลล์ของเม็ดเลือดแดงจะมีความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเตทไอโซโครจินเนสสูงกว่าในซีรัมถึง 100 เท่า(1)

ระดับของเอนไซม์แลคเตทไอโซโครจินเนสในซีรัมที่สูงกว่าปกติ พบได้ในผู้ป่วยโรคหัวใจวายเฉียบพลัน, โรคเลือด, โรคโลหิตจางชนิด pernicious, ตับอักเสบเรื้อรัง, มะเร็งกล้ามเนื้อ, ตับอ่อนอักเสบ, มะเร็งตับอ่อนและต่อมลูกหมาก, มะเร็งต่อมน้ำเหลือง, โรคสมอง และ infectious mononucleosis(1,2,3)

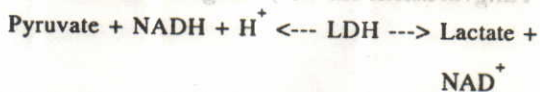
ระดับของเอนไซม์แลคเตทไอโซโครจินเนส

ในซีรัมของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจวายเฉียบพลันสูงกว่าคนปกติประมาณ 2-10 เท่า ภายใน 12 ชั่วโมง เมื่อหัวใจเริ่มมีความผิดปกติระดับเอน

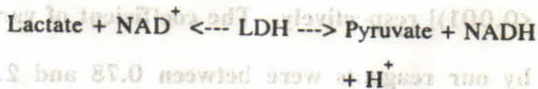
ไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นสูงสุดภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง และเพื่อให้การวินิจฉัยโรคนี้ให้ถูกต้อง มักตรวจดูระดับของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน เช่น เอนไซม์แลคเตทไอโซโครจินเนส เอนไซม์แอสปาเตอะมิโนทรานส์เฟอเรส และเอนไซม์ครีเอทีนฟอสโฟไคนเนส เพื่อทำนายอัตราการทำลายกล้ามเนื้อหัวใจ และระยะเวลาที่เกิดอาการได้ (1,4)

การวิเคราะห์หาระดับของเอนไซม์แลคเตทไอโซโครจินเนสในซีรัมมี 2 วิธี ซึ่งจะแตกต่างกันที่ใช้สับสเตรท ดังนี้(5,6,7,8)

1. การใช้ปฏิกิริยาซึ่งเปลี่ยนไพรูเวทเป็นแลคเตท ที่ pH 7.5 โดยมี NADH เป็นโคเอนไซม์ ปริมาณ NADH ที่เข้าไปในปฏิกิริยาจะแปรตามปริมาณ LDH ซึ่งมีค่าปกติเท่ากับ 150-320 U/L (ที่ 30 °ซ.) หรือ 200-420 U/L (ที่ 37 °ซ.)



2. การใช้ปฏิกิริยาซึ่งเปลี่ยนแลคเตทเป็นไพรูเวท ที่ pH 8.9-9.0 โดยโคเอนไซม์ NAD ถูกเปลี่ยนเป็น NADH ตามปริมาณ LDH ที่มีอยู่ ค่าปกติเท่ากับ 45-90 U/L ที่ 30 °ซ.



วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส คือวิธีที่เปลี่ยนไพรูเวตเป็นแลคเตท แต่เนื่องจากน้ำยาที่จำหน่ายในปัจจุบันราคาแพง และเมื่อละลายน้ำยาแล้วไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน คณะทำการวิจัยจึงได้นำวิธีดังกล่าวมาศึกษา พัฒนาน้ำยาวิเคราะห์เอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส เพื่อความสะดวกในการวิเคราะห์ และสามารถเก็บไว้ทำการวิเคราะห์ได้หลายๆ ครั้ง ทั้งยังให้ผลที่ถูกต้อง มีความเที่ยงสูง และราคาถูก

วัสดุและวิธีการ

1. สิ่งส่งตรวจ

ซีรัมจากผู้ป่วยทั่วไปที่มารับการตรวจที่โรงพยาบาลศิริราช จำนวนทั้งสิ้น 100 ราย

2. ซีรัมควบคุมคุณภาพ (Serum control)

ซีรัมควบคุมคุณภาพของบริษัท CIBA-CORNING (USA) ทั้งชนิดระดับค่าปกติ (Lot. No. 020902) และระดับค่าสูง (Lot. No. 025002)

3. สารเคมี

3.1 กรดไพรูวิก P-2256 ของบริษัทชิกม่า

3.2 NADH N-8129 ของบริษัทชิกม่า

4. เครื่องมือ

เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ HITACHI 705 ของบริษัทบอริงเกอร์ มานไฮม์ จำกัด

5. น้ำยาที่ใช้

5.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5

5.2 น้ำยาที่ 1 NADH 0.22 มิลลิโมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

5.3 น้ำยาที่ 2 กรดไพรูวิก 3.64 มิลลิโมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

วิธีการทดลอง

ทำการทดสอบความเที่ยง (Precision), ความถูกต้อง (Accuracy), ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และความคงสภาพของน้ำยาวิเคราะห์เอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสที่เตรียมขึ้นเอง นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เอ็นไซม์ชนิดนี้ในซีรัมที่ได้จากน้ำยาที่เตรียมเองกับน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัทบอริงเกอร์ มานไฮม์ และบริษัทโรช

ในการศึกษานี้ใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ HITACHI 705 ซึ่งเป็น discrete analyzer สามารถทำการวิเคราะห์ได้ครั้งละ 16 การทดสอบ คำสั่งการทำงานต่างๆ จะเก็บไว้ในแผ่นบันทึกแม่เหล็ก การวัดค่าดูดกลืนแสงเป็นแบบ bichromatic การอ่านและประมวลผลควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ และแสดงผลการวิเคราะห์ออกทางจอภาพและเครื่องพิมพ์ การวิเคราะห์นี้ใช้ซีรัม 10 ไมโครลิตร และน้ำยาวิเคราะห์ชนิดที่ 1 จำนวน 350 ไมโครลิตร น้ำยาวิเคราะห์ชนิดที่ 2 จำนวน 70 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 37°C วัดที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และ 376 นาโนเมตร (ตารางที่ 1)

ผลการทดลอง

ความเที่ยง (Precision) ของวิธีเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ซีรัมควบคุมคุณภาพทั้งชนิดระดับ

ค่าปกติและระดับค่าสูง พบว่าในการวิเคราะห์แบบ within-run assay ให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) เป็น 1.95% และ 0.78% เมื่อทำการวิเคราะห์แบบ between-run assay มีค่า

สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 3.48% และ 2.02% โดยที่ซีรัมควบคุมคุณภาพมี LDH activity อยู่ 205 และ 623 U/L ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบโปรแกรมการวิเคราะห์โดยเครื่อง HITACHI 705 เมื่อใช้น้ำยวิเคราะห์ที่เตรียมเอง บริษัทบอริงเกอร์ มานโฮล์ และบริษัทโรช

CHEMISTRY PARAMETERS	น้ำยวิเคราะห์เตรียมเอง	น้ำยาบอริงเกอร์	น้ำยาโรช
TEST CODE	LDH	LDH	LDH
ASSAY CODE	RATE-19-28	RATE-3-28	RATE-3-28
SAMPLE VOLUME (μl)	10	20	20
R1 VOL (μl)	350	350	350
R2 VOL (μl)	70-1(S)	0-0	0-0
R3			
WAVELENGTH 1	376 NM	376 NM	376 NM
WAVELENGTH 2	340 NM	340 NM	340 NM
RGT.BLK.ABS	2	5	4
RGT.BLK.CONC	0	0	0
STD.CONC	402-402-1	402-402-1	402-402-1
FACTOR			
STD.ABS.ALLOWANCE	30%	30%	30%
NORMAL RANGE L	200	200	200
NORMAL RANGE H	420	420	420
ABS. LIMIT (RATIO)	5000	5000	5000
CONTROL ID.NO.	1-2-0	1-2-0	1-2-0

ตารางที่ 2 ความเที่ยง (Precision) ของการวิเคราะห์เอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสในซีรัมควบคุมคุณภาพ
โดยใช้น้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเอง (n=20)

Within - run assay		Between - run assay	
U/L	% CV	U/L	% CV
205	1.95	207	3.48
623	0.78	624	2.02

ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีทำโดย
การวิเคราะห์ซีรัมควบคุมคุณภาพของบริษัท
CIBA-CORNING ระดับค่าปกติ (Lot. No.
036801) และระดับค่าสูง (Lot. No. 037802) พบ
ว่าได้ค่าอยู่ในช่วงที่กำหนด (assigned value)
(ตารางที่ 3)

การทดสอบความถูกต้องโดยใช้ซีรัมต่าง
ระดับ 2 ตัวอย่างผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ กัน
พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคาดหวัง (%
expectation) อยู่ในช่วง 98.6-100.7% ดังตารางที่
4

ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธี
โดยนำซีรัมที่มีค่าเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส
ที่มีระดับสูงมาเจือจางเป็นลำดับลงมาทำการวิ
เคราะห์ ได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิ
เคราะห์ (X) กับค่าคำนวณ (Y) ดังนี้ $Y = 6.036 -$
 $0.996X$ โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ $r =$
 0.999 ความชัน (Slope) = 0.996 และวิธีนี้มีความ
เป็นเส้นตรงได้น้อย 1,500 U/L ดังรูปที่ 3

การทดสอบความคงสภาพของน้ำยา ภาย
หลังจากละลาย NADH ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใน

ปริมาณที่พอใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อหนึ่ง
สปีดาร์ พบว่าสามารถใช้ทำการวิเคราะห์ได้นาน
อย่างน้อย 1 สปีดาร์ เนื่องจากผลการวิเคราะห์
control serum ของบริษัท CIBA-CORNING ทั้ง
ระดับค่าปกติ ($LDH = 204.8 \pm 6.013$ U/L) และ
ระดับค่าสูง ($LDH = 620 \pm 10.102$ U/L) ยังมีค่า
อยู่ในช่วงที่กำหนด

ผลการวิเคราะห์เอนไซม์แลคเตทดี
ไฮโดรจีเนสที่ได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราช
โดยวิธีที่ใช้น้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเองนี้เปรียบ
เทียบกับน้ำยาวิเคราะห์ของบริษัทบอริงเกอร์ มัน
ไฮม์ และบริษัทโรช พบว่ามีความสัมพันธ์กันดี
มาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ $r =$
 0.999 ($p < 0.001$) และ $r = 0.990$ ($p < 0.001$) ตาม
ลำดับ (รูปที่ 1 และ 2)

วิจารณ์

จากการศึกษาพัฒนาน้ำยาวิเคราะห์หา
เอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสนี้ พบว่ามีวิธี
การเตรียมที่ง่ายมากไม่สลับซับซ้อน อีกทั้งสาร
เคมีสามารถเก็บไว้ได้นาน ไม่เสื่อมง่าย และมี

ราคาไม่แพงมาก แต่เนื่องจากการเตรียมสารเคมี ทั้ง 2 ชนิดนี้ใช้ในปริมาณที่น้อยมาก ต้องใช้เครื่องชั่งอย่างละเอียด (อ่านทศนิยมได้ 4 ตำแหน่ง) สิ่งที่ต้องระวังคือ ปริมาณ NADH เริ่มต้นจะต้องถูกต้องแน่นอนเพราะเป็นการวัด ปริมาณที่ลดลง

จะเห็นว่าน้ำยาวิเคราะห์สามารถเตรียมได้ตามต้องการ เพียงชั่งสาร NADH ตามปริมาณ ที่ต้องการใช้จะทำให้ไม่เกิดการสูญเสียยา โดย

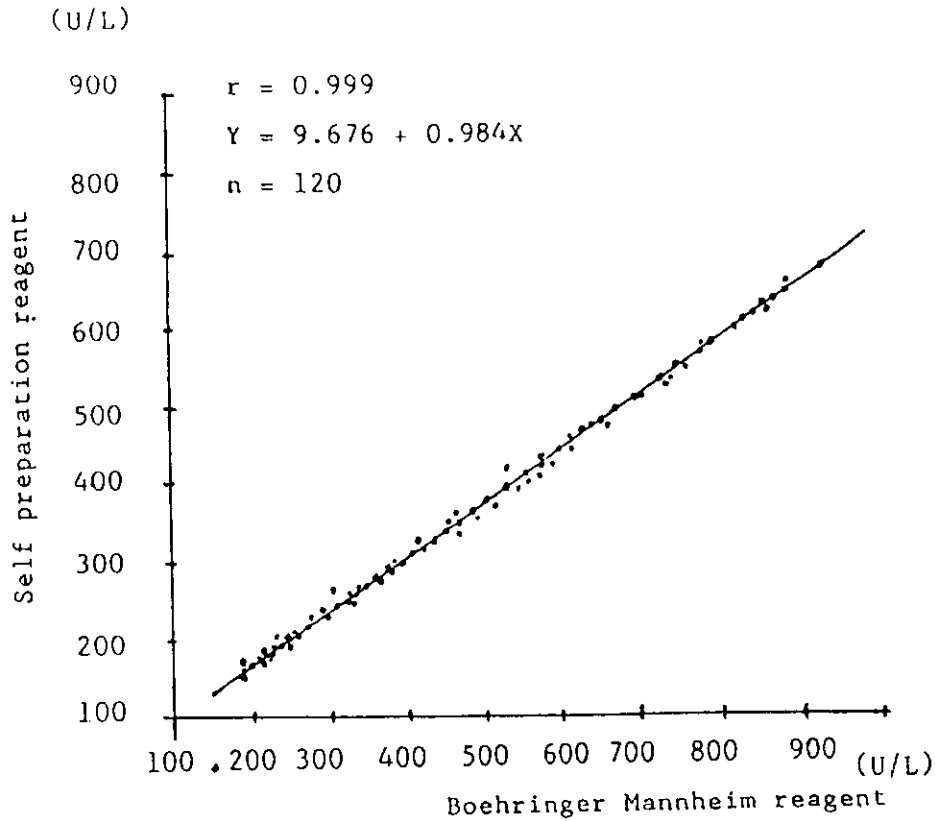
คำนวณให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์ได้นาน 1 สัปดาห์ ส่วนน้ำยาชนิดที่ 2 คือ ไพรูเวตนั้น สามารถชั่งและละลายในบัฟเฟอร์ได้โดยไม่เสื่อมคุณภาพ อีกทั้งวิธีนี้มีความเป็นเส้นตรงได้อย่างน้อย 1,500 U/L ซึ่งครอบคลุมค่าที่พบในผู้ป่วยโรคตับ และโรคหัวใจได้ ดังนั้นน้ำยานี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะกับเครื่องอัตโนมัติแบบต่างๆ ที่สามารถโปรแกรมเพื่อใช้น้ำยา คราวละ 2 ชนิดได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 3 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์เอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส โดยน้ำยาวิเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเอง (n=10)

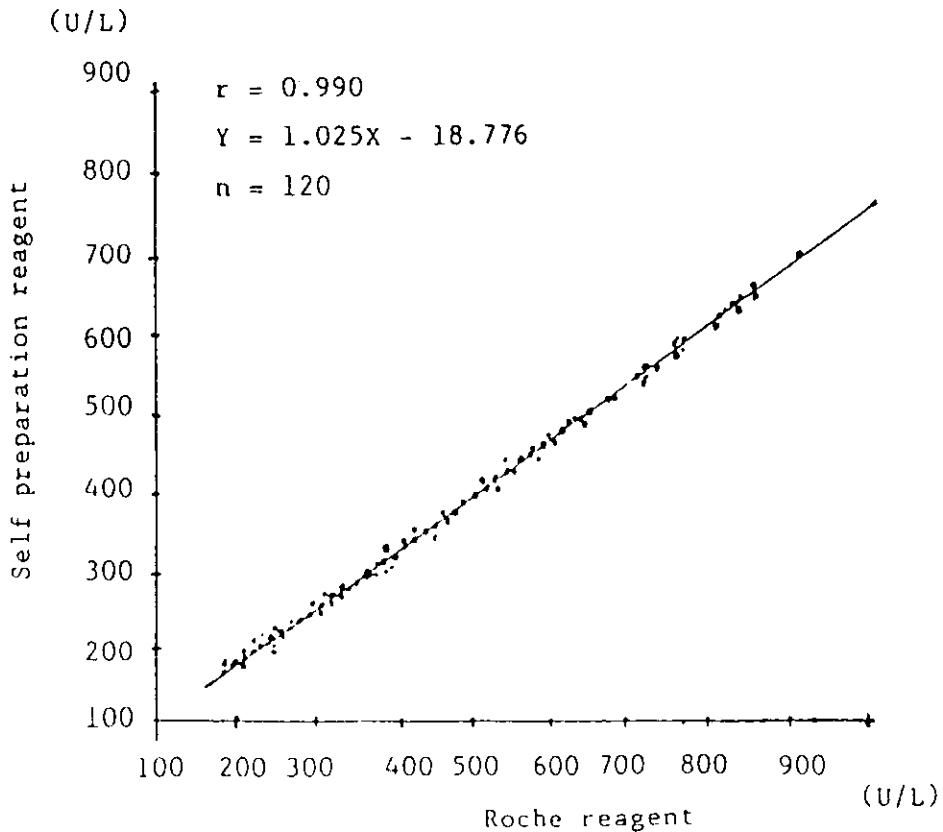
Control	Assigned value(U/L)		Assayed value(U/L)	
	$\bar{X}$	Range	$\bar{X}$	SD
CIBA-CORNING Lot. No.036801 (normal)	205	164-246	205	3.81
CIBA-CORNING Lot. No.037802 (Abnormal)	591	473-709	620	4.20

ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์ความคาดหวัง (% expectation) ของน้ำยาที่เตรียมขึ้นเอง

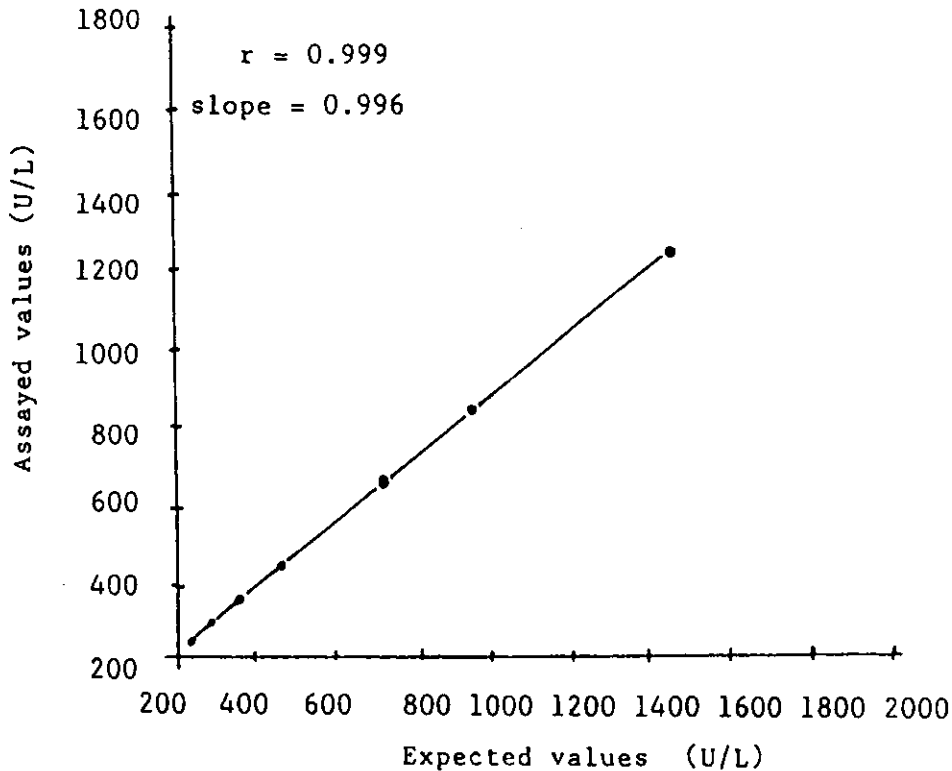
Ratio of LDH 184 : 864 U/L	Calculated values (U/L)	Assayed values (U/L)	% Expectation
1 : 1	524.00	528	100.7
2 : 1	410.66	405	98.6
1 : 2	637.33	640	100.4
			$\bar{X} = 99.9$



รูปที่ 1 Correlation of LDH determined by self preparation reagent and Boehringer Mannheim reagent



รูปที่ 2 Correlation of LDH determined by self preparation reagent and Roche reagent



รูปที่ 3 Correlation between expected and assayed values using self preparation reagents

กิจกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยมหิดลในโครงการการวิจัยประเภท ก.

เอกสารอ้างอิง

1. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia : WB. Saunders, 1982; 697-9.
2. Lott JA, Stang JM. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. Clin Chem 1980; 26: 1241-50.
3. Vassault A, Wahlefeld AW, Denelee U. Lactate dehydrogenase. In : Bergmeyer JB, Grassl M, editors. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd rev ed. Weinheim: Verlag-Chemie, 1983; 118-38.
4. Cabaud PG, Wroblewski F. Colorimetric measurement of lactate dehydrogenase activity of body fluids. Am J Clin Path 1958; 30:234-6.

5. Howell BF, Mc Clure S, Schaffer R. Lactate-to-pyruvate or pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: re-examination. Clin Chem 1979; 25: 269-72.
6. Spiegel HE, Syming JA, Hordynsky WE. Babson AL. Colorimetric determination of lactate dehydrogenase (L-lactate :NAD oxidoreductase) activity. In Standard Medhods in Clinical Chemistry, New York : Academic Press, 1972; 43-6.
7. Keiding R, Horder M, Gerhardt W, et al. Recommended methods for determination of four enzymes in blood. Scand J Clin Lab Invest 1974; 33: 291-306.
8. Buhl SN, Jackson KY. Optimal conditions and comparison of lactate dehydrogenase catalysis of the lactate-to-pyruvate and pyruvate-to-lactate reactions in human serum at 25⁰, 30⁰ and 37⁰ C Clin Chem 1978; 24: 828-31.