

รายงานฉบับสมบูรณ์
ทุนจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ณัฐ ภูมิประวดี

ระดับกลูตาไธโอน (glutathione) ในเลือดคนไทยกลุ่มผู้ใหญ่เทียบกับกลุ่มผู้สูงอายุ
Blood Glutathione Level in Thai Adult Subjects with Different Age Groups

ผศ. ดร. พญ. รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย

รศ. ดร. วิบูลย์ รัตนพานนท์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับกลูตาไธโอน (glutathione) ในเลือดคนไทยกลุ่มผู้ใหญ่วัยเทียบกับกลุ่มผู้สูงอายุ

รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย, วิทยาลัย รัตนบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

กลูตาไธโอนเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ที่พบภายในเซลล์เม็ดเลือดแดง และเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้เป็นการวัดระดับกลูตาไธโอนในเลือดคนไทยกลุ่มผู้ใหญ่วัยเทียบกับกลุ่มผู้สูงอายุ โดยวัดในช่วงอายุ 3 ช่วงๆละ 20 คนดังนี้คือ อายุ 21-40, 41-60 และมากกว่า 60 ปี โดยวิธีนี้ใช้เอนไซม์ glyoxalase I พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับกลูตาไธโอนในช่วงอายุต่างๆเป็นดังนี้ 48.2 ± 5.5 , 47.2 ± 7.7 และ 35.6 ± 4.2 มิลลิกรัม/เดซิลิตรของเม็ดเลือดแดงตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของกลูตาไธโอนนี้มีความแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงอายุ 21-40 และมากกว่า 60 ปี ($p < 0.05$) กับในช่วงอายุ 40-60 ปีและมากกว่า 60 ปี ($p < 0.05$) สรุปได้ว่าระดับของกลูตาไธโอนมีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุเข้าสู่วัยชรา (aging) กล่าวคือมากกว่า 60 ปีขึ้นไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

Enzymatic determination of blood glutathione in normal Thai adults

Ratana Banjerdpongchai, M.D., Ph.D., Viboon Rattanapanone, Ph.D.

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

Abstract

Glutathione (GSH), an endogenous antioxidant, is a biochemical marker of oxidative stress in the organisms. This study was to determine GSH level in normal Thai adults in different age groups (n=20 each), i.e. 21-40, 41-60 and more than 60 years, by using glyoxalase I method. It was found that the mean GSH levels were 48.2 ± 5.5 , 47.2 ± 7.7 and 35.6 ± 4.2 mg/dl erythrocyte, respectively. It was significantly different between the two age ranges, i.e. 21-40 and more than 60 years ($p < 0.05$); and 41-60 and more than 60 years ($p < 0.05$).

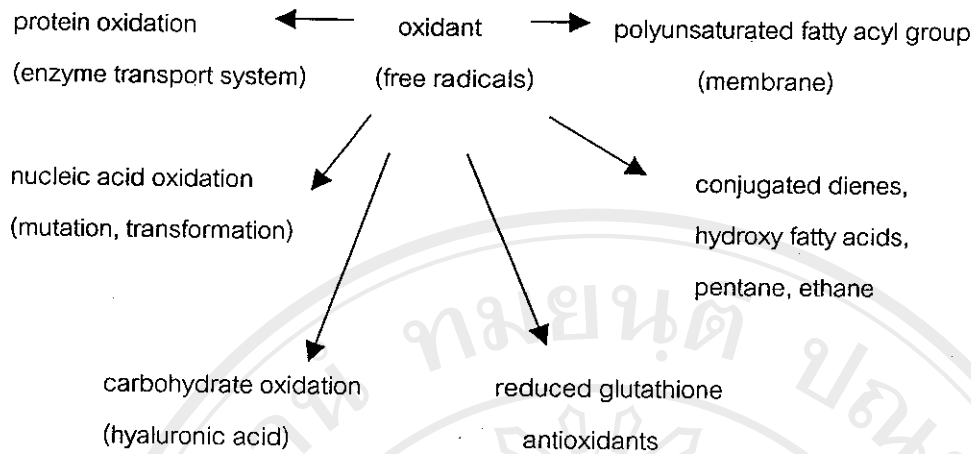
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในเชิงชีวโมเลกุล ร่างกายมนุษย์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ตามอายุ เพศ วัย เวลาในแต่ละช่วงของวัน (biological clock) การเปลี่ยนแปลงอาจเป็นในรูปการย่อยสลาย (catabolism) หรือขบวนการสังเคราะห์ (anabolism) ของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและกรดอะมิโน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก (รูปที่ 1) ยังมีสารประเภทอื่นที่เป็นรายละเอียดลงไป เช่น วิตามิน เกลือแร่ ฮอรโมน สารที่หลั่งจากเซลล์ (cytokines) ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของขบวนการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม เชื้อแบคทีเรีย หรือไวรัส และควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์อื่น ในขบวนการย่อยสลายและขบวนการสังเคราะห์ยังเกี่ยวข้องกับขบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอนจากสารชีวโมเลกุลหนึ่งไปอีกโมเลกุลหนึ่ง

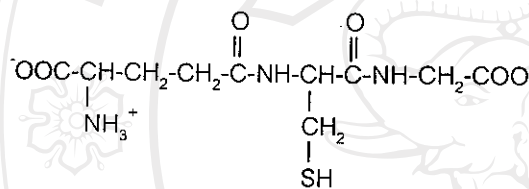
ปกติการทำงานของอวัยวะภายในร่างกาย ต้องอาศัยออกซิเจนและเอ็นไซม์ต่างๆ ออกซิเจนและน้ำ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญให้เกิดพลังงานในการดำรงชีวิตของเซลล์ นอกเหนือจากสารประกอบอื่นๆภายในร่างกาย การถ่ายทอดอิเล็กตรอนภายในเซลล์ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (singlet oxygen) ได้ง่ายในปฏิกิริยาต่างๆ แต่ในร่างกายก็มีสารที่เป็นตัวต้านต่อสารอนุมูลอิสระเหล่านั้น ทั้งที่เป็นสารชีวโมเลกุล (เช่น วิตามินซี, วิตามินอี, beta-carotene, ubiquinone, zinc, selenium, copper, magnesium, uric acid และ glutathione) และเอ็นไซม์ (เช่น glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase)(2)

$$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$$

oxidized glutathione reduced glutathione



รูปที่ 1 แสดงโมเลกุลเป้าหมายของภาวะ oxidative stress



รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของกลูตาไธโอน

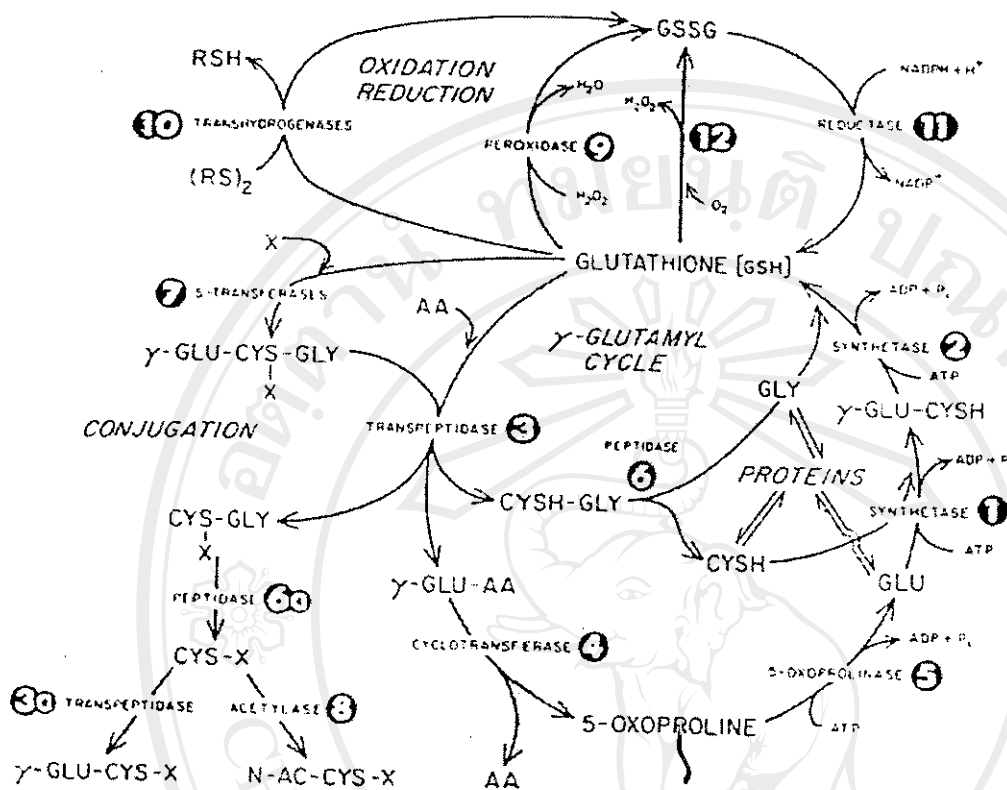
บางคนขาดเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD deficiency) ทำให้ไม่สามารถสร้าง NADPH ให้แก่เซลล์เม็ดเลือดแดงได้ เซลล์เม็ดเลือดแดงเหล่านี้มักจะแตกง่ายและโลหิตจาง (hemolytic anemia) นอกจากนี้ยังไวต่อยาบางอย่าง เช่น พวงกดชา ยาแก้ไอ ยาแก้มาลาเรีย และถั่วบางชนิด (3)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อเกิดความไม่สมดุลของอนุมูลอิสระและสารแอนติออกซิแดนท์ การเกิดสารอนุมูลอิสระอาจเกิดจากเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ขบวนการ phagocytosis การหายใจในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiration) การทำลายสารพิษ (xenobiotic detoxification) สารอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับไขมัน กรดนิวคลีอิก และโปรตีน แต่ในเซลล์มีเอนไซม์ ที่คอยกำจัดสารอนุมูลอิสระ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส กำจัดซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) เป็นต้น (4)

ในสภาพที่เนื้อเยื่อเกิด oxidative stress เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร่างกายมีการแก้ไขสภาพเป็นพิษจากสารอนุมูลอิสระ โดยกลูตาไธโอน (GSH) ทำการสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำ (H_2O) โดยเอนไซม์ glutathione peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้สภาพร่างกายอยู่ในภาวะ oxidative stress ลดลงหรือลงมากอยู่ในภาวะสมดุล และ oxidized GSH จะถูกรีดิวซ์จาก GSSG เป็น GSH โดยอาศัย NADPH และเอนไซม์ glutathione reductase (2)

กลูตาไธโอน ยังทำหน้าที่รักษาสภาพของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งมีเหล็ก (ferrous ion) เป็นแกนกลางของโมเลกุลทำให้เป็นการรักษาสภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ร่วมกับ glutathione peroxidase

ลดภาวะ oxidative stress ที่เกิดจากการที่อีโมโกลบินขนส่งออกซิเจนและการเกิดอนุมูลอิสระได้ง่ายในเซลล์เม็ดเลือดแดง



รูปที่ 3 แสดงเมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน: ปฏิกิริยาที่ 1 เอนไซม์ γ -glutamyl-cystein synthetase; ปฏิกิริยาที่ 2 เอนไซม์ GSH synthetase; ปฏิกิริยาที่ 3 และ 3a เอนไซม์ glutamyl transpeptidase; ปฏิกิริยาที่ 4 เอนไซม์ γ -glutamyl cyclotransferase; ปฏิกิริยาที่ 5 5-oxoprolinase; ปฏิกิริยาที่ 6 และ 6a dipeptidase; ปฏิกิริยาที่ 7 GSH S-transferase; ปฏิกิริยาที่ 8 N-acetylase; ปฏิกิริยาที่ 9 GSH peroxidase; ปฏิกิริยาที่ 10 transhydrogenase; ปฏิกิริยาที่ 11 GSSS reductase; ปฏิกิริยาที่ 12 การเปลี่ยน GSH เป็น GSSG

ผลการศึกษาล้วนใหญ่ พบว่าในหนูหรือหนูทดลองที่มีอายุมากจะมีปริมาณของกลูตาไธโอนทั้งในเม็ดเลือดแดง พลาสมา (5) และเซลล์เนื้อเยื่อสมองน้อยกว่าสัตว์ทดลองที่มีอายุน้อยกว่า ซึ่งตรงกันข้ามกับปริมาณของกลูตาไธโอนไดซัลไฟด์ จะมีค่าเพิ่มขึ้นในสัตว์ทดลองที่มีอายุมากกว่า

ภาวะสูงอายุพบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีหลายทฤษฎีที่อธิบายถึงกลไกการเกิดภาวะชราหรือสูงอายุ เช่น (1) programmed aging หรือ (2) error catastrophe theory หรือ (3) ทฤษฎีอนุมูลอิสระ การเกิดอนุมูลอิสระทำให้เกิดความไม่สมดุล ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในทางที่เลวลง (deleterious) ภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ทำให้การทำงานของอวัยวะต่างๆเสื่อมลง นำไปสู่ภาวะสูงอายุ (6)

สำหรับในคนสูงอายุแล้วมีการศึกษาน้อยมากเกี่ยวกับระดับกลูตาไธโอน ซึ่งเกี่ยวกับเอนไซม์ glutathione S transferase, glutathione reductase, glutathione oxidase หรือ glutathione peroxidase แต่มีรายงานว่าระดับเอนไซม์ superoxide dismutase ในพลาสมาและเม็ดเลือดแดงจะต่ำในคนสูงอายุเทียบกับคนหนุ่มสาว (7)

การศึกษาระดับกลูตาไธโอนในคนหนุ่มสาว (adult) กับผู้สูงอายุ (aging people) ในคนไทย จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาบำบัด รักษาผู้ป่วย หรือการรักษาด้วยสารอาหารที่จะทำให้ระดับกลูตาไธโอนสูงอยู่ได้ เพราะกลูตาไธโอนเป็น superantioxidant ภายในเซลล์และในกระแสเลือด เพื่อยืดระยะเวลาของการเสื่อมของเซลล์ในร่างกาย โดยเฉพาะเซลล์สมองและระบบประสาทซึ่งเป็นอวัยวะที่สำคัญในการเกิดพยาธิสภาพในผู้สูงอายุ ป้องกันภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นสาเหตุของ aging

ตอนที่ 2. วัตถุประสงค์การศึกษา

เพื่อศึกษาระดับกลูตาไธโอนในกลุ่มผู้ใหญ่กับผู้สูงอายุ

ตอนที่ 3. วิธีทำการทดลอง

การเตรียม blood samples ใช้ ACD เป็น anticoagulant

I. ได้ทดสอบหาภาวะซีดในกลุ่มตัวอย่างโดย

-ดู red blood cell morphology ในทุกคน จะดำเนินการตรวจหากลูตาไธโอนเฉพาะผู้ที่มี normochromic normocytic erythrocytes เท่านั้น

-หาค่าฮีมาโตคริต (% hematocrit) ในทุกคน และจะดำเนินการตรวจหากลูตาไธโอนเฉพาะคนที่มีค่า hematocrit อยู่ในเกณฑ์ปกติ

-หาภาวะพร่องเอนไซม์ glucose 6-phosphate dehydrogenase (G-6PD) โดยใช้วิธี methemoglobin reduction test จะทำการตรวจหากลูตาไธโอนเฉพาะผู้ที่มีผลของการทดสอบนี้ปกติ กล่าวคือ ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ G-6PD

II. หลังจาก screen ภาวะต่างๆดังกล่าวแล้วจึงนำเลือดที่จากคนปกติแล้วนั้นมาทำการทดสอบดังนี้ (8)

1. นำเลือด 0.4 ml รวมกับน้ำกลั่น 1.6 ml
2. ตกตะกอนด้วย precipitating solution จำนวน 3 ml
3. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
4. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1
5. นำ filtrate ที่ได้มาทำการทดสอบดังตาราง

	Blank	Unknown
Buffer (ml)	1.1	1.0
Filtrate (μl)	-	100
Glyoxalase I (50 u/ml) (μl)	20	20
	mix เบบๆ	
2.2 mM Methylglyoxal (μl)	20	20

6. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 nm
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ standard GSH (Sigma)
8. การคำนวณค่า GSH เป็นดังสมการ

reduced GSH (mg/dl erythrocyte) = $\frac{\text{mmol / ml GSH} \times 12.5 \times 307.3}{\text{Hct (\%)} \times 10}$

Hct (%) X 10

โดยที่ 12.5 = dilution factor

307.3 = มวลโมเลกุลของ GSH

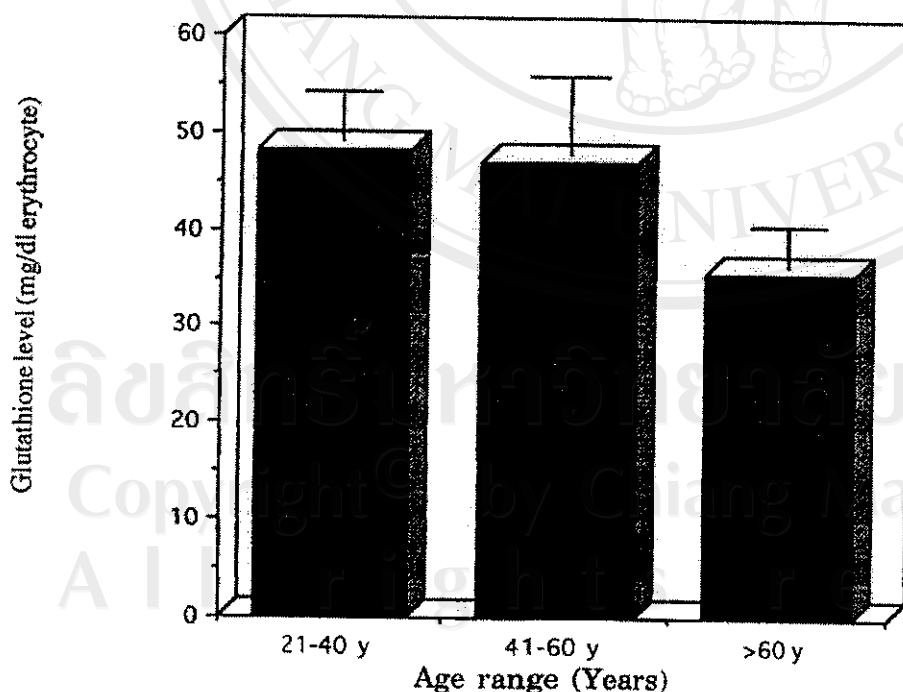
ตอนที่ 4. ผลการทดลอง

จากการตรวจปริมาณกลูตาไธโอน ในคนไทยผู้ใหญ่ในช่วงอายุ 21-40, 41- 60 ปี โดยใช้วิธี enzymatic (glyoxalase I) ได้ค่า reduced GSH ดังแสดงในตารางที่ 1, 2, และ 3

ปริมาณกลูตาไธโอนเฉลี่ยในแต่ละช่วงอายุเป็นดังนี้ คือ ในช่วงอายุ 21-40 ปี 41-60 ปี และมากกว่า 60 ปี ได้เท่ากับ 48.2 ± 5.0 mg/dl erythrocyte, 47.2 ± 7.7 mg/dl erythrocyte และ 35.6 ± 4.2 mg/dl erythrocyte ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ Student t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างอายุ 21-40 ปี และ 41-60 ปี แต่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระดับกลูตาไธโอนระหว่างช่วงอายุ 21-40 ปี กับช่วงอายุมากกว่า 60 ปี และช่วงอายุ 41-60 ปี กับช่วงอายุมากกว่า 60 ปี ($p < 0.05$)

ตอนที่ 5. วิเคราะห์ผลการทดลอง

การหาปริมาณกลูตาไธโอนโดยวิธีเอนไซม์เป็นวิธีหนึ่งที่มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจหา reduced glutathione ค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์มีราคาแพง (ซึ่งเป็นข้อเสีย) การศึกษานี้ เป็นการพัฒนาใช้วิธีหาปริมาณกลูตาไธโอนโดยใช้เอนไซม์ glyoxalase I



รูปที่ 4 กราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยของระดับกลูตาไธโอนในคนไทยผู้ใหญ่ในช่วงอายุต่างๆกัน

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณกลูตาไธโอนในกลุ่มคนไทยในช่วงอายุ 21-40 ปี

อายุ	Hct (%)	GSH (mg/dl erythrocyte)
22	42	50
21	41	41
21	45	49
31	41	41
20	46	56
21	42	50
22	40	55
27	42	55
22	43	53
23	41	44
23	41	41
25	40	48
30	45	44
27	41	56
33	42	48
34	48	44
39	46	48
30	42	43
23	46	50
25	45	47

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

ตารางที่ 2 ปริมาณกลูตาไธโอนของคนไทยในกลุ่มอายุ 41-60 ปี

อายุ	Hct (%)	GSH (mg/dl erythrocyte)
41	40	38
41	46	37
46	39	51
46	38	39
46	44	43
53	46	50
46	39	59
53	36	61
50	46	48
41	46	41
43	41	49
49	42	43
44	37	49
42	39	51
50	38	55
45	37	40
48	39	54
51	42	43
44	37	47
43	43	35

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ตารางที่ 3 ปริมาณกลูตาไธโอนของคนไทยในช่วงอายุ มากกว่า 60 ปี

อายุ	Hct (%)	GSH (mg/dl erythrocyte)
63	45	31
61	42	36
64	45	36
63	43	40
63	41	36
65	44	31
64	45	40
61	43	36
66	42	38
63	41	31
63	41	31
66	43	38
65	45	44
65	46	33
64	45	31
61	43	42
65	45	40
65	46	36
63	42	31
64	41	31

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

รายงานนี้เป็นการทดสอบหาระดับกลูตาไธโอนในคนไทย วัยผู้ใหญ่ ตั้งแต่ 21 ปี จนถึงมากกว่า 60 ปี กำหนดไว้ช่วงอายุละ 20 คนเป็นอย่างต่ำ ค่าเฉลี่ยของกลูตาไธโอนในช่วงอายุ 21-40 ปี และ ช่วงอายุ 41-60 ปี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ไม่เห็นความแตกต่างของระดับกลูตาไธโอนระหว่างวัยหนุ่มสาวและวัยกลางคน แต่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับในคนสูงอายุ กล่าวคือมากกว่า 60 ปีขึ้นไป แต่เมื่อเปรียบเทียบกับทั้งช่วงอายุ 21-40 ปี (วัยหนุ่มสาว) และวัยกลางคน (41-60 ปี) กับวัยสูงอายุ (มากกว่า 60 ปี) การที่ในวัยสูงอายุมีระดับกลูตาไธโอนต่ำอย่างชัดเจน สามารถอธิบายได้ว่าในวัยนี้ มีภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มขึ้น (9) เป็นภาวะที่เกิดจากมีระดับอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) เพิ่มขึ้น เป็นภาวะเสื่อมของวัยสูงอายุ (aging) โดยเฉพาะในสมองซึ่งมีความต้องการพลังงานสูง มีความเข้มข้นของเหล็กสูง และมีสารต้านอนุมูลอิสระน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือกลูตาไธโอน (10)

ตอนที่ 6. สรุปผลการทดลอง

ระดับกลูตาไธโอนในคนไทยช่วงอายุ 21-40 ปีและ 41-60 ปีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างเมื่อเทียบช่วงอายุ 21-40 ปีกับในคนสูงอายุ กล่าวคือมากกว่า 60 ปีขึ้นไป ($p<0.05$) และช่วงอายุ 41-60 ปีกับช่วงอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป ($p<0.05$)

ตอนที่ 8. เอกสารอ้างอิง

1. Richter C, Godvazde V, Laffranchi R, Schlapbach, Schweizer M, Suterr M, Walter P and Yaffee. Oxidants in mitochondria: from physiology to disease. *Biochem Biophysic Acta* 1995; 1271: 67-74.
2. Voet D, Voet GJ. *Biochemistry*. (2nd ed.) Singapore: John Wiley & Sons, Inc, 1995.
3. Mayers PA. *Harper's Review of Biochemistry*. (18th ed.) California: Lange Medical Publications, 1981.
4. Laval J. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Patho Biol (Paris)*. 1996;44:14-24.
5. Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Mills BJ, Lineman RD. Low blood glutathione levels in healthy aging adults. *J Lab Clin Med*. 1992;120:720-5.
6. Robert L. Vascular aging. Role of elastin receptor. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1995;189:959-66.
7. Congy F. Study of the oxidative stress in the elderly. *Press Medicine*. 1995;24:1115-8.
8. Akerboom T, Stes H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 1981;77:373-82.
9. Parke DV. Nutrition antioxidants and disease prevention: mechanism of action. In: Basu TK, Temple NJ, Garg ML, eds. *Antioxidants in health and disease*. Alberta: Athabasca University, 1999.
10. Rodriguez-Capote K, Cespedes E, Arencibia R, Gonzalez-Hoyuela M. Indicators of oxidative stress in aging rat brain. The effect of nerve growth factor. *Rev Neurol*. 1998;27:494-500.