



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยาทางสัตว)

ปริญญา

สัตววิทยาทางสัตว

สัตววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในการเก็บรักษาเม็ดเลือดแดงของสุนัข

Oxidative Stress in Canine Red Blood Cells Storage

นามผู้วิจัย นายธนาธิร สิงกันยา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หม่อมหลวงสุนทรานี ทองใหญ่, Dr.3e Cycle.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชนินทร์ ตีรวัฒนวานิช, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ จีงสมานญาติ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์อภัสสร ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในการเก็บรักษาเม็ดเลือดแดงของสุนัข

Oxidative Stress in Canine Red Blood Cells Storage

โดย

นายชานินทร์ สิงกันยา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชานินทร์ สิงกันยา 2553: ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในการเก็บรักษาเมล็ดเลือดแดงของสุนัข
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว) สาขาสรีรวิทยาทางสัตว ภาควิชาสรีรวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หม่อมหลวงสุนทรานี ทองใหญ่, Dr.3rd Cycle.
86 หน้า

ปัญหาที่สำคัญในการเก็บรักษาเลือดในธนาคารเลือด คือภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเม็ดเลือดแดงซึ่งมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในธนาคารเลือดของคน แต่ในการเก็บรักษาเลือดสุนัขยังไม่ปรากฏข้อมูล จึงได้ทำการศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลในการใช้เลือดสุนัขอย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้เลือดที่บริจาคจากสุนัขสุขภาพดี 7 ตัว และเก็บรักษาสภาพเลือดโดยใช้ถุงเลือดมาตรฐานที่บรรจุสารรักษาสภาพเซลล์ (CPDA) แบ่งการวิเคราะห์เป็น 5 ระดับ คือ C: เลือดที่เก็บก่อนใส่ในถุงเลือดมาตรฐานที่มีสาร CPDA 0: เลือดที่เก็บในถุงเลือดที่บรรจุสาร CPDA นาน 3 ชั่วโมง 14: เลือดที่เก็บในถุงเลือดที่บรรจุสาร CPDA 14 วัน 28: เลือดที่เก็บในถุงเลือดที่บรรจุสาร CPDA 28 วัน และ 42: เลือดที่เก็บในถุงเลือดที่บรรจุสาร CPDA 42 วัน จากนั้นทำการทดลองเพื่อยืนยันความเสียหายที่เกิดจากภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของ กลูตาไธโอน ซึ่งบ่งบอกถึงสถานะการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ประเมินความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (TAC) ในพลาสมา และความเข้มข้นของ malondialdehyde (MDA) และปริมาณคาร์บอนิลโปรตีน ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้การเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน และออกซิเดชันของโปรตีน ตามลำดับ ตลอดจนทำการศึกษาลักษณะของต่อความอยู่รอดของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการวัดค่าความเปราะ (MCF) และปริมาตรอัดแน่นของเม็ดเลือดแดง (Hct)

ผลการศึกษาพบว่าระดับกลูตาไธโอนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาเลือดนานถึง 14 วัน แต่การลดลงของกลูตาไธโอนหลังจาก 14 ถึง 42 วัน ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงนี้อาจมีผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลง เกิดภาวะเสียสมดุลของเซลล์ และเป็นจุดเริ่มต้นของการทำลายเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน การลดลงของ TAC ในพลาสมาของเลือดที่เก็บรักษานาน 3 ชั่วโมง (0) เมื่อเทียบกับ C แสดงถึงการทำงานที่ลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมาด้วย อนึ่ง เมื่อเก็บรักษาเลือดนานถึง 14 28 และ 42 วัน พบว่า TAC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากการเคลื่อนออกของสารต้านอนุมูลอิสระสู่พลาสมา เมื่อพิจารณาพร้อมกับค่า MCF ที่เพิ่มขึ้น จากการที่การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระส่งผลเพิ่มทั้งออกซิเดชันของไขมัน (MDA) และโปรตีน (ปริมาณคาร์บอนิลโปรตีน) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเมื่อพิจารณาพร้อมกับค่า MCF ที่เพิ่มขึ้น และ Hct ที่ลดลง อย่างมีนัยสำคัญที่ 28 และ 42 วัน เป็นการยืนยันถึงความเสียหายจากภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันระหว่างการเก็บรักษาเลือด ที่มีผลต่อโมเลกุลไขมันและโปรตีนของเซลล์ ส่งผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ นำไปสู่การทำลายเซลล์ ดังนั้น การเก็บเลือดสุนัขนานถึง 28 วันอาจไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาตัวป่วย

Thanin Singkanya 2010: Oxidative Stress in Canine Red Blood Cells Storage. Master of Science (Animal Physiology), Major Field: Animal Physiology, Department of Physiology.

Thesis Advisor: Assistant Professor ML. Soontaranee Tongyai, Dr.3e Cycle. 86 pages.

Oxidative stress of red blood cells was a major problem in blood storage which has been extensively studied in human blood bank but not in canine banked red blood cells. The present study was conducted to obtain the information for effective use of canine blood. Blood collected from 7 healthy donor dogs and stored in a standard blood storage bag containing citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) was sampled in 5 successive durations: fresh whole blood before storage in CPDA (C), 3 hours after storage in CPDA (0), 14 days (14), 28 days (28) and 42 days (42) of storage. To confirm the oxidative damage of cells, analyses were conducted on glutathione (GSH) concentration as indicator of cellular antioxidant status, the activity of total antioxidant capacity (TAC) in the plasma, malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl content as indicators of lipid peroxidation and protein oxidation, respectively. Moreover, effects on red cells survival were measured using of Mean Corpuscular Fragility (MCF) and Hematocrit (Hct) levels.

The results revealed that GSH decreased significantly when stored up to 14 days. However the continuing reduction of glutathione after 14 days until 42 days was not significant. This change might have resulted from oxidative modification of stored red blood cell causing a decline in antioxidant defense system thus leading to cellular imbalance and initiation of oxidative cell damage. TAC reduction in plasma at 0 when compared to C also demonstrated reduced plasma antioxidant function. However, when stored blood from 14, 28 to 42 days, plasma TAC increased significantly which could be due to the leakage of antioxidants to plasma taking into consideration of the elevation of the MCF. The declination of antioxidant activity significantly elevated both oxidative indicators of lipid (MDA) and protein (carbonyl protein content). Thus, when considered with the significant elevation of MCF and reduction of Hct ($P < 0.05$) at 28 and 42 days of storage confirmed the occurrence of oxidative stress under prolong storage leading to the damage of lipid and protein of red blood cell and consequently to the membrane lipid structure and function of the cells, eventually causing cell deterioration. Therefore, canine red blood cells storage up to 28 days may not provide maximal effective treatment.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถเสร็จลุล่วงไปได้ ด้วยการสนับสนุน และช่วยเหลือของ คณาจารย์ในภาควิชาสรีรวิทยาที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาการศึกษาต่างๆ ให้แก่ตัวข้าพเจ้าจนสามารถทำงาน ได้อย่างราบรื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์หม่อมหลวงสุนทรานี ทองใหญ่ ประธาน กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และแนะนำไปในทางที่ถูกต้องใน ระหว่างการดำเนินงานวิจัยมาโดยตลอด ตลอดจนการตรวจตราแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ ขอ กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชินันท์ ศิริวัฒนวานิช ที่ให้คำแนะนำในการวางแผนการ วิจัย และการวิเคราะห์ผลวิจัยทำให้ผลงานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ รอง ศาสตราจารย์ณรงค์ จึงสมานญาติ ที่คอยให้คำแนะนำด้านเนื้อหางานวิจัยตลอดจนการเลือกใช้ เทคนิคในการวิจัยที่สามารถตอบโจทย์ปัญหาในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์อภัสสรา ชูเทศะ ประธานหน่วยธนาคารเลือด โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และบุคลากรในหน่วยธนาคารเลือดที่คอย ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ตลอดจนสุนัขที่ให้เลือดและเจ้าของสุนัข ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือด สุนัข ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินไปได้อย่างราบรื่น

ขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินกิจกรรมด้านงานวิจัย ทั้งด้านห้องวิจัย และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยสนับสนุนทั้งกำลังใจ และ ทุนการศึกษาให้กับข้าพเจ้า ให้สามารถบรรลุอุปสรรคต่างๆ ตลอดจนสามารถแก้ไขปัญหาที่ เกิดขึ้นระหว่างดำเนินงานวิจัยจนผ่านไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ เล่มนี้ขอมอบแด่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะมี ประโยชน์ต่องานพัฒนาคุณภาพเลือดที่เก็บในธนาคารเลือด เพื่อนำไปสู่การวิจัยเพื่อต่อยอดองค์ ความรู้ด้านการพัฒนางานวิจัย และการประยุกต์ใช้ทางอายุรศาสตร์การถ่ายเลือดในสัตว์ต่อไป

ธานินทร์ สิงกันยา

มกราคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	33
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	52
สรุป	52
ข้อเสนอแนะ	54
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	55
ภาคผนวก	71
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แสดงชนิดโปรตีนที่เชื่อมเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน วิเคราะห์โดยวิธี Gel Electrophoresis 5
2	แสดงผลการตรวจสุขภาพของสุนัขที่ใช้ในการศึกษา 39
3	การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของกลูตาไธโอน (Glutathione concentration) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA 41
4	ค่าความเข้มข้นของกลูตาไธโอน (Glutathione concentration) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด 41
5	การเปรียบเทียบค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity: TAC)) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA 43
6	ค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity: TAC) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด 43
7	การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของ Malondialdehyde (MDA)) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA 44
8	ค่าความเข้มข้นของ Malondialdehyde (MDA) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด 45
9	การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของคาร์บอนิลโปรตีน ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA 47
10	ค่าความเข้มข้นของคาร์บอนิลโปรตีน ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด 47
11	การเปรียบเทียบค่าความเปราะของเม็ดเลือดแดง (Mean Corpuscular Fragility; MCF) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA 49
12	ค่าความเปราะของเม็ดเลือดแดง (Mean Corpuscular Fragility; MCF) 49
13	การเปรียบเทียบค่าปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit; Hct) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA 50
14	ค่าปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit; Hct) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด 51

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แบบจำลองโครงสร้างของโปรตีนที่เชื่อมเซลล์เม็ดเลือดแดง	6
2 การสร้างอนุมูลอิสระ และการป้องกันของร่างกาย	9
3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Malondialdehyde (MDA) และ Hydroxynonenal (HNE) จากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation)	11
4 กระบวนการเกิดคาร์บอนิลโปรตีน ที่ได้จากออกซิเดชันของโปรตีน	13
5 การเปลี่ยนแปลงของเบสควีนิน จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน	14
6 กระบวนการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากอนุมูลอิสระ	18
7 ภาพแสดงกระบวนการสร้างและบทบาทกลูตาไธโอน (GSH) ในการป้องกันภาวะ ออกซิเดชัน	20
8 กลไกการเกิดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และกลไกการป้องกันของเซลล์ เม็ดเลือดแดง	22
9 กระบวนการทำลายเซลล์เซลล์เม็ดเลือดแดงจากโปรตีนในพลาสมา	24
10 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์กลูตาไธโอน (GSH) ด้วยวิธี enzymatic recycling method	35
11 ปฏิกิริยาระหว่าง TPTZ กับ Fe^{2+}	36
12 ปฏิกิริยาระหว่าง TBA และ MDA	37
13 ปฏิกิริยาระหว่าง DNPH กับคาร์บอนิลโปรตีน	38
14 กราฟแสดงค่า % Hemolysis ของเลือดก่อนเข้าถุงเลือด (C) หลังเข้าถุงเลือด 3 ชั่วโมง (0) 14 28 และ 42 ตามลำดับ	50
15 แสดงกลไกการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงในระหว่างการเก็บรักษาเลือด	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 ปฏิบัติการวิเคราะห์ GSH ด้วยวิธี enzymatic recycling method.	72
2 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของกลูตาไธโอน (GSH)	75
3 ปฏิบัติการระหว่าง TPTZ กับ Fe^{2+}	76
4 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของเหล็กเฟอร์ริก	78
5 ปฏิบัติการระหว่าง TBA และ MDA	79
6 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้น malondialdehyde (MDA)	81

ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเก็บรักษาเม็ดเลือดแดงของสุนัข

Oxidative Stress in Canine Red Blood Cells Storage

คำนำ

การเก็บรักษาเลือดของคนมักประสบปัญหาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงตามระยะเวลาการเก็บรักษา ส่งผลต่อความอยู่รอดของเซลล์เม็ดเลือดแดง แม้จะมีสาร Citrate Phosphate Dextrose Adenine (CPDA) ในการเก็บรักษาสภาพเซลล์ แต่เมื่อถึงระยะเวลาหนึ่งเซลล์จะสูญเสียการทำงาน (Dumaswala *et al.*, 1996) จากการศึกษาความเสียหายของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บในธนาคารเลือดของคนแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาเลือด โดยมีสาเหตุหลักมาจากความเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) (Kriebardis *et al.*, 2006)

ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นเรื่องที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง จากผลที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งมีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (free radical) เข้าทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ทั้งโปรตีน และไขมัน (Dorge, 2002) เป็นเหตุทำให้เซลล์ทำหน้าที่ผิดปกติไป และนำไปสู่การตายของเซลล์ (Buttke and Sandstorm, 1994)

เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นกลุ่มเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส (nucleus) ไมโทคอนเดรีย และ ออร์แกเนลล์ อื่นๆ ภายในเซลล์ (Ozben, 1998) จึงไม่สามารถสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมัน อีกทั้งยังใช้วิถีไกลโคไลซิสเป็นวิถีเดียวในการผลิตพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ (Hamasaki and Yamamoto, 2000) เซลล์เม็ดเลือดแดงจะสัมผัสกับอนุมูลอิสระทั้งภายในและภายนอกเซลล์ จึงมีการพัฒนาระบบป้องกันเพื่อคงความอยู่รอดของเซลล์ (Ozben, 1998) โดยภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีสารต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สำคัญ คือ กลูตาไธโอน (glutathione; GSH) ที่มีคุณสมบัติในการทำงานเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เพื่อรักษาสมดุลการทำงานของเซลล์ (Anderson, 1998)

เซลล์เม็ดเลือดแดงมีบทบาทสำคัญในการขนส่งออกซิเจนไปให้เนื้อเยื่อ แต่การทำงานดังกล่าวจะเสื่อมสภาพลงในระหว่างการเก็บรักษาเซลล์ในธนาคารเลือด แม้จะมีการใช้สารช่วย

รักษาสภาพเซลล์ (liquid preservation) ซึ่งช่วยให้สามารถเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงได้นานขึ้น แต่อัตราการอยู่รอดของเซลล์หลังจากการให้เลือด และความสามารถในการขนส่งออกซิเจนจะลดลง (Hamasaki and Yamamoto, 2000) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane protein) และทางพยาธิวิทยาในระหว่างการเก็บรักษาเซลล์ (Dumaswala *et al.*, 1996) อีกทั้งโปรตีนที่อยู่ในพลาสมาที่มีส่วนในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ยังส่งผลต่อการเพิ่มระดับความเสียหายมากขึ้น สภาวะดังกล่าวก่อความเครียดต่อเซลล์ (cellular stress) (Geldwerth *et al.*, 1993) โดยระดับความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันใช้บ่งถึงความรุนแรง และความเสียหายในระยะต่างๆ ของการเก็บรักษาเลือด เพื่อให้ทราบถึงความเหมาะสมของการใช้เลือดในการรักษาผู้ป่วย ความอยู่รอดของเซลล์เม็ดเลือดแดงหลังการให้เลือดที่ต่ำลง อาจทำให้การขนส่งออกซิเจนหลังการให้เลือดด้อยประสิทธิภาพ และส่งผลกระทบต่อการรักษาและฟื้นฟูสุขภาพ

การให้เลือดมีจุดประสงค์หลายประการ และสามารถผลิตภัณฑ์จากการแยกส่วนประกอบของเลือดได้หลายชนิด งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์เลือดชนิดโลหิตครบส่วน (whole blood) ในธนาคารเลือดของสุนัข (1) เพื่อศึกษาผลการเกิดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษาเลือด โดยใช้ดัชนีชี้วัดระดับความเครียดของเซลล์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน คือ ระดับความเข้มข้นของกลูตาไธโอน (GSH) และความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity; TAC) (2) เพื่อศึกษาระบบการป้องกันของเซลล์เม็ดเลือดแดงในระหว่างการเก็บรักษาเลือด แล้วตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษาเลือด โดยใช้ผลผลิตสุดท้ายจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (malondialdehyde; MDA) และออกซิเดชันของโปรตีน (คาร์บอนิลโปรตีน) ในพลาสมา ในการบ่งบอกถึงความเสียหายต่อโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ และต่อเซลล์โดยรวม ตลอดจน (3) ทำการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติเยื่อหุ้มเซลล์ที่แสดงออกในลักษณะระดับความเปราะแตกง่าย (Mean Corpuscular Fragility; MCF) และตรวจสอบปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) เพื่อแสดงถึงความอยู่รอดของเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานให้ทราบถึงระยะเวลาและปัญหาที่เกิดกับเลือดสุนัขที่เก็บรักษาในธนาคารเลือด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้เลือดให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเกิดภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงสุนัข
2. เพื่อศึกษาผลของภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต่อเลือดที่ถูกเก็บรักษาในธนาคารเลือด และประเมินความเสียหายของเลือดที่เก็บรักษาเป็นระยะ
3. เพื่อศึกษาการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระของเซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อที่จะนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการรักษาสภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น
4. เพื่อศึกษาคุณภาพของเลือดในแต่ละช่วงเวลากการเก็บรักษาที่ยังคงมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการถ่ายโอนให้ผู้รับ
5. เพื่อประเมินความเสียหายของเม็ดเลือดแดงในช่วงเวลาต่างๆที่เก็บรักษาในสาร Citrate Phosphate Dextrose Adenine (CPDA)

การตรวจเอกสาร

เม็ดเลือดแดงและปัญหาการเก็บรักษาในธนาคารเลือด

เลือดที่เก็บรักษาในธนาคารเลือดมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางชีวเคมี พยาธิวิทยา และโครงสร้าง ถึงจะมีสารช่วยรักษาสภาพเซลล์ เมื่อถึงระยะเวลาหนึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงจะลดการทำงาน ส่งผลต่อการใช้เลือดที่ไม่มีประสิทธิภาพกับผู้รับเลือด (Dumaswala *et al.*, 1996; Kriebardis *et al.*, 2006) ปัญหาเหล่านี้มีการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาในธนาคารเลือดของคน โดยการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างที่เก็บรักษาเลือดมีสาเหตุหลักมาจากภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative stress) (Kriebardis *et al.*, 2006)

เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงเป็นเป้าหมายแรกที่จะเกิดความเสียหายภายใต้อิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเลือด จึงเป็นตัวบ่งชี้สำคัญถึงผลกระทบต่อการเก็บรักษาต่อการใช้ในการรักษาทางคลินิก การเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดแดงเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบและการทำงานของโปรตีนโครงสร้าง (cytoskeletal proteins) ที่ยึดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) และต้องอาศัยพลังงานซึ่งมักลดลงในสภาวะการเก็บรักษา การสูญเสียคุณสมบัติความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะทำให้การลำเลียงออกซิเจนในเลือดฝอยลดลงภายหลังการให้เลือด (Ho, *et al.*, 2003) ผลกระทบนี้อาจเป็นกุญแจสำคัญในการศึกษาหาแนวทางแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงในธนาคารเลือดตลอดจนนำไปสู่การเพิ่มคุณภาพเซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อให้มีอัตราการอยู่รอดสูงที่สุด และมีประสิทธิภาพมากที่สุดหลังจากให้เลือดกับตัวรับ

จากการศึกษาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาในธนาคารเลือด พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงได้รับความเสียหายนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงทั้งทางชีวเคมี (Dumaswala *et al.*, 1996) พยาธิวิทยา (Kriebardis *et al.*, 2006) และ โครงสร้างเซลล์ (ภาพที่ 1) ในระหว่างการเก็บรักษาเซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดการสูญเสียโมเลกุลไขมันที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารผ่านเยื่อเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงของฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ชนิด ฟอสฟาติดีล เซอริน (phosphatidylserine) ฟอสฟาติดีล เอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) และฟอสฟาติดีล คอไลน์ (phosphatidylcholine) (Geldwerth *et al.*, 1993; Trotter and Rumsby, 1981) พร้อมทั้งมีการทำลายโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ชนิดต่างๆ (ตารางที่ 1) (Dumaswala *et al.*, 1996 ; Dumaswala *et al.*, 1997) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) (Jarolim *et al.*, 1990 ; Kriebardis *et al.*, 2006) และยังส่งผลต่อโปรตีนที่ช่วยเสริมการทำงานของ

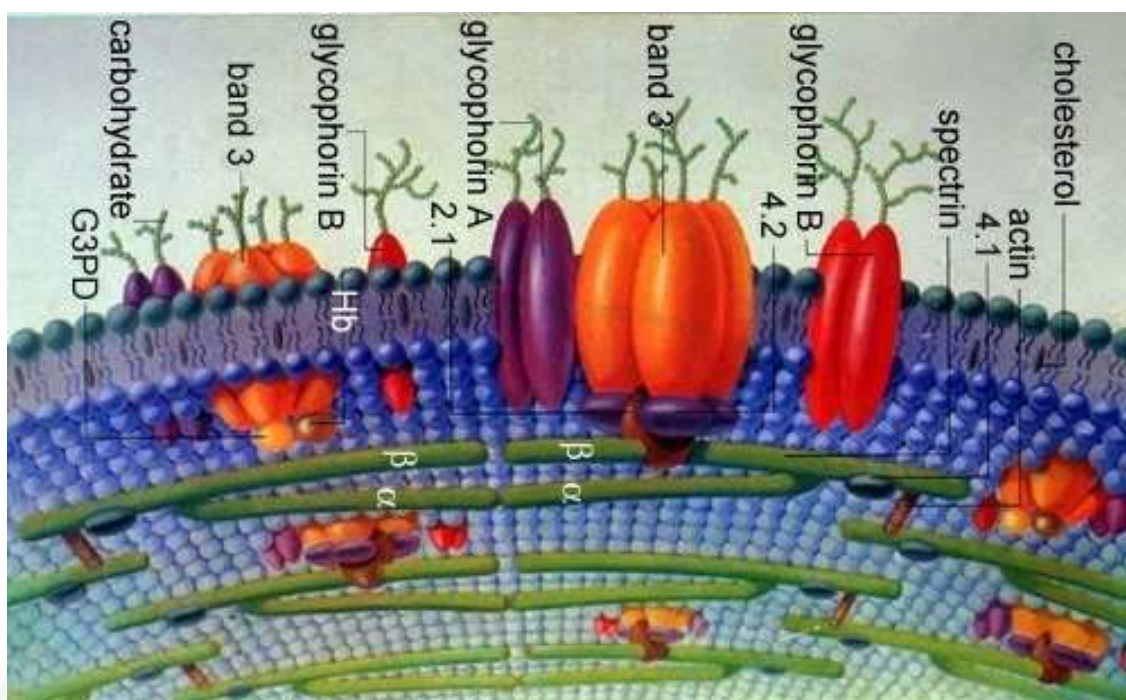
เยื่อหุ้มเซลล์ (adaptor proteins) เช่น ankyrin (band 2.1) P55, adducin, tropomyosin, myosin และ tropomodulin (Liu and Derick, 1992) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเหล่านี้จะนำไปสู่การสูญเสียโครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาเป็นผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างที่ผิดปกติไปส่งผลต่อความอยู่รอดของเซลล์ในขณะที่อยู่ในสาร CPDA (Dumaswala *et al.*, 1996)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน วิเคราะห์โดยวิธี Gel

Electrophoresis

Numerical designation of bands in SDS-PAGE	Classification of proteins		Molecular weights
	Integral	peripheral	
1		Spectrin 1	250,000
2		Spectrin 2	222,000
3	Band 3 proteins		118,000-98,000
(3)	glycophorin		30,000 (monomer)
4.1		Band 4.1 protein	88,000
4.2		Band 4.2 protein	80,000
5		actin	47,000
6		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39,500
7		Band 7 protein	32,000

ที่มา: ดัดแปลงจาก Marchesi *et al.* (1976)



ภาพที่ 1 แบบจำลองโครงสร้างทางเคมีของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ประกอบด้วยลิปิดและโปรตีน

ที่มา : Butterfield (1996)

ผลกระทบทางเคมีจากอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ส่งผลต่อโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ โดย Reactive Oxygen Species (ROS) สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกลุ่มกันของโปรตีน เกิดการเปลี่ยนแปลงแขนงข้างของสายโปรตีน (side chain) โดยมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ กับกรดอะมิโนของโปรตีนข้างเคียง รวมทั้งธาตุโลหะที่ถูกสลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนจะจับกับหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ของไลซีน อาร์จินีน โพรลีน และ ทรีโอนีน ที่ถูกออกซิไดซ์ในตำแหน่งจำเพาะ นำไปสู่การสร้างสารอนุมูลอิสระที่มีความรุนแรง (Amici *et al.*, 1989)

โดยปกติเลือดที่เก็บรักษาในธนาคารเลือดจะผสมสารละลาย CDPA ซึ่งมีสารที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (citrate) และสารหล่อเลี้ยงให้พลังงาน (dextrose phosphate adenine) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาให้นานขึ้น แต่ถึงแม้จะมีสารที่ช่วยรักษาสภาพของเซลล์ (CPDA) เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เม็ดเลือดแดงก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลง และลดความอยู่รอดของเซลล์ลง ทำให้โอกาสที่เซลล์เม็ดเลือดแดงจะอยู่รอดหลังการให้เลือดลดน้อยลง (Dumaswala *et al.*, 1999) ในระหว่างการเก็บเลือด มีองค์ประกอบหลายอย่างที่สามารถนำไปสู่กระบวนการออกซิเดชันของเซลล์ และการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical ($OH^\cdot$)

(Dumaswala *et al.*, 1996) และภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระมากกว่าระบบการป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) มีผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ตามมา โดยระบบเอนไซม์ที่ใช้ต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant enzyme systems) ตัวหลักๆ ในเซลล์เม็ดเลือดแดง คือ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), และ catalase ซึ่งมีหน้าที่หลักในการกำจัดอนุมูลอิสระ และป้องกันการสร้างเมตฮีโมโกลบิน (methemoglobin) (Lynch *et al.*, 1977) เมตฮีโมโกลบินต่างจากฮีโมโกลบินตรงที่ธาตุเหล็กในโมเลกุลของฮีโมโกลบินอยู่ในรูปออกซิไดซ์ คือ Fe^{3+} ซึ่งไม่สามารถจับกับออกซิเจนได้ (Duncan *et al.*, 1994) จึงนำไปสู่การเสื่อมสภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดง และเกิดความล้มเหลวในการขนส่งออกซิเจนหลังการให้เลือด ตลอดจนเกิดผลเสียอื่นๆ ตามมา (Lynch *et al.*, 1977)

การเกิดอนุมูลอิสระ

Free radical หรือ "อนุมูลอิสระ" หมายถึงโมเลกุลของสารใดๆ ที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวในวงนอกสุด (unpaired electron) (Karlsson, 1997; Bahorun *et al.*, 2006) อิเล็กตรอนเดี่ยวที่มีพลังงานสะสมอยู่จะไม่เสถียรและมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาสูง ฉะนั้นอนุมูลอิสระจึงพยายามที่จะเสาะแสวงหาอิเล็กตรอนมาจับคู่ โดยการดึงอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ และส่วนใหญ่มักจะแย่งได้จากออกซิเจน แม้ว่ากระบวนการดังกล่าวทำให้ได้สารที่มีความคงตัวขึ้นมาใหม่หนึ่งชนิด แต่ในเวลาเดียวกันสารที่ถูกแย่งอิเล็กตรอนก็กลับกลายเป็นสารที่ไม่เสถียร สูญเสียความคงตัว และต้องพยายามดึงอิเล็กตรอนจากสารตัวอื่นต่อไป ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ และนำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย (Goldfarb, 1999)

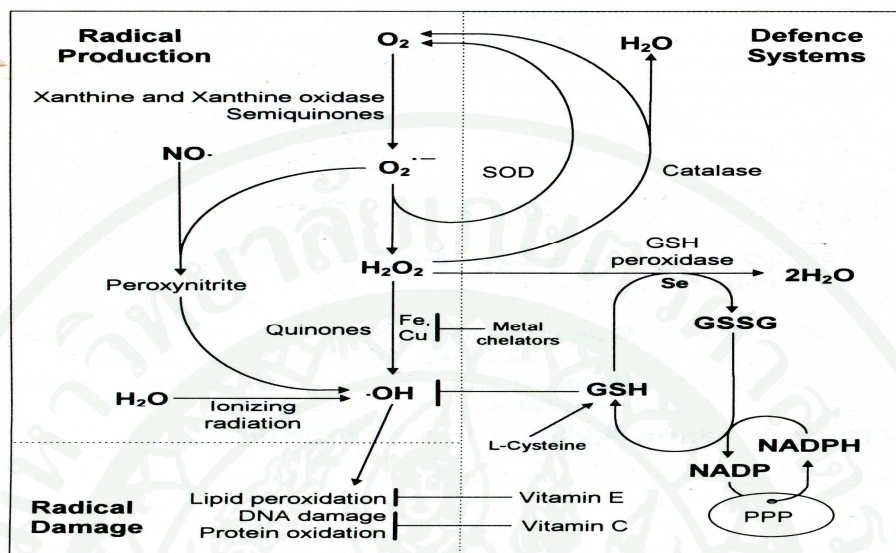
คน และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ สามารถทนต่อออกซิเจน (O_2) เนื่องจากอวัยวะต่างๆ ต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการห่วงโซ่การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chains) และระบบการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดก็ต้องการออกซิเจนในการทำงาน (Bahorun *et al.*, 2006) ระบบป้องกันของสารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยต้านพิษของออกซิเจนโดยจะเกิดขึ้นควบคู่กันไป Reactive oxygen species / Reactive nitrogen species (ROS/RNS) จะถูกสร้างอย่างคงที่ในตัวสิ่งมีชีวิต โดยมีกระบวนการ 2 ชนิดหลักๆ คือ ROS และ RNS ที่สามารถเกิดขึ้นจากการสร้างโดยไม่ได้ตั้งใจ เช่น การรั่วไหลของอิเล็กตรอนไปยังออกซิเจน จากกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial electron transport chains) เยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) และ endoplasmic reticulum (xenobiotic metabolism) การสังเคราะห์ prostaglandin เซลล์ตับ (hepatocytes) และ cytochrome P-450 ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระตามมา (Yu, 1994) โดยกระบวนการหลักที่

นำไปสู่การสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) คือ กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องกับ ubiquinone-cytochrome *b* ใน mitochondrial membrane ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สำคัญที่สุดของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ มีการประเมินว่า ประมาณ 1-3% ของการหายใจจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Karlsson, 1997) โดยจะมีการเพิ่มขึ้นในช่วงที่มีการสร้างพลังงานเพิ่มขึ้น ซึ่งเซลล์ที่จับกินเชื้อโรค (phagocytic cells) เช่น neutrophils, monocytes, macrophages, eosinophils จะสร้างได้เช่นกัน ทำให้แบคทีเรีย และไวรัสไม่สามารถทำงานได้ ซึ่ง phagocytic cells จะต้องใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างมากเพื่อที่จะกำจัดสิ่งแปลกปลอม การใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้นนี้เรียกว่า ‘Respiratory burst’ โดยการกระตุ้นของ membrane-located enzyme (NADPH-oxidase) เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของออกซิเจนไปเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ แล้วอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ก็จะเกิดกระบวนการสร้าง reactive chemical species อื่นๆ อีกตามมา เช่น Hydroxyl radical ($OH^\bullet$), hypochlorite และ chloramines (Curnutte and Babior, 1987)

ในสภาวะทางสรีรวิทยาปกติ กระบวนการเมแทบอลิซึมของออกซิเจนใน aerobic organisms นำไปสู่การเกิดสารประกอบที่มีปฏิกิริยาสูงคือ สารอนุมูลอิสระ ชนิด ROS (Meier, 2001; Lim *et al.*, 2002) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์, Hydroxyl radical ($OH^\bullet$) (Fantel, 1996; Castro & Freeman, 2001; Young & Woodside, 2001) nitric oxide ($NO^\bullet$) Nitrogen dioxide ($NO_2^\bullet$) และ Peroxyl ($ROO^\bullet$) ส่วนที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระแต่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระได้อย่างง่ายๆ ได้แก่ peroxynitrite ($OONO^\bullet$), hypochlorous acid ($HOCl$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2), ozone (O_3), nitrous acid (HNO_2) และ dinitrogen trioxide (N_2O_3) (Baharun *et al.*, 2006) สารเหล่านี้จะสามารถออกซิไดส์สารที่เป็นโมเลกุลใหญ่ๆ รวมทั้ง โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก (Zachara *et al.*, 2006) ร่างกายจะจัดสารประกอบที่ป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันมาไว้ เพื่อป้องกันอันตรายจากความเสียหายของอนุมูลอิสระ และ ROS ตัวอื่นๆ (Giese, 1999)

ร่างกายถูกพัฒนาให้ป้องกันระบบภายในร่างกายต่อภาวะเครียดอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีทั้งระบบเอนไซม์ ที่สำคัญคือ superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase และระบบของ thioredoxin ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการจดจำเพื่อที่จะกำจัดพิษของ ROS และยังมี สารป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่ไม่ใช่เอนไซม์ ตัวหลักๆ เช่น bilirubin, estrogen sex hormone, uric acid, coenzyme Q, melanin, melatonin, α -tocopherol และ lipoic acid (Laguette *et al.*, 2007) อีกทั้งยังมีแร่ธาตุจำนวนหนึ่ง เช่น copper, zinc และ selenium ที่ไปจับที่ตำแหน่ง active sites ของเอนไซม์ข้างต้น โดยจะแสดงบทบาทสำคัญในระบบป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันใน

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยตัวหลักที่ทำงานคือ selenium (Se) และ Se-dependent GSH-Pxs เป็นตัวป้องกันเซลล์จากภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Zachara *et al.*, 2006) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การสร้างอนุมูลอิสระ และกระบวนการป้องกันของร่างกาย

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jacobson (1996)

ผลของอนุมูลอิสระต่อโมเลกุลของเซลล์

1. การเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation)

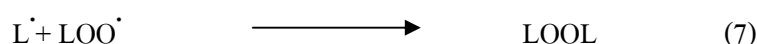
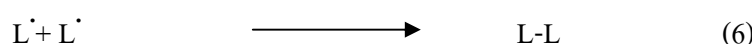
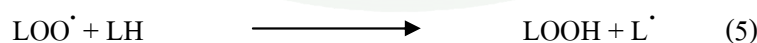
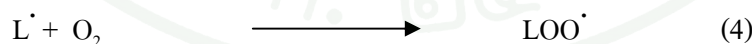
กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าสองพันธะ (Polyunsaturated fatty acids (PUFAS)) มีอยู่มากมายในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และใน low-density lipoproteins (LDL) (Dekkers *et al.*, 1996) ชนิดและระดับของ PUFAS จะบอกถึงความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ อนุมูลอิสระในกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) จะโจมตีเยื่อหุ้มเซลล์โดยดึงอิเล็กตรอนจากส่วนประกอบไขมัน (membrane lipid) ในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ตำแหน่งเป้าหมายสำคัญคือ พันธะคู่ที่ยึดระหว่างคาร์บอนอะตอม (C=C) ของ PUFAS ซึ่งไม่มีความแข็งแรงต่อการทำลายพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) อนุมูลอิสระจะดึงอิเล็กตรอนเดี่ยว (single electron) จากไฮโดรเจน ซึ่งเชื่อมกับคาร์บอนอะตอมด้วยพันธะคู่ ดังนั้นอิเล็กตรอนเดี่ยวที่ถูกดึงจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ และพยายามทำให้ตัวเองเกิดความเสถียรโดยโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่มี

คาร์บอนอะตอมเป็นแกนกลาง (carbon-centered free radical) จะจัดเรียงตัวใหม่ เรียกว่า Conjugated diene (CD) โครงสร้างนี้จะเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายกับออกซิเจน และเปลี่ยนไปเป็น peroxy radical ซึ่งจะดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลไขมันตัวอื่นๆต่อเนื่องไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) (Halliwell and Gutteridge, 1985)

กลไกการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน (Bohnstedt, 2005)

1. ปฏิกิริยาเริ่มต้น (Initiation)

ปฏิกิริยาเริ่มจากกรดไขมันสายยาวชนิดไม่อิ่มตัวถูกดิงไฮโดรเจนอะตอมออกจาก methylene ($-\text{CH}_2-$) group ที่ตำแหน่งถัดจากพันธะคู่ (double bond) โดยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) หรืออนุมูลอิสระตัวอื่นๆ (ปฏิกิริยาที่ 1) ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร (lipid radical หรือ carbon-centered radical) จึงพยายามทำให้ตัวมันเองเสถียรโดยจัดเรียงโมเลกุลใหม่ในรูป conjugated diene ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน conjugated diene จะชอบทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ (peroxyl radical, $\text{ROO}^\cdot$) (ปฏิกิริยาที่ 2) จากนั้นอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์จะไปดิงไฮโดรเจนอะตอมออกจากโมเลกุลของไขมันเพื่อทำให้ตัวเองเสถียร ขณะเดียวกันก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิดไขมัน (ปฏิกิริยาที่ 3)

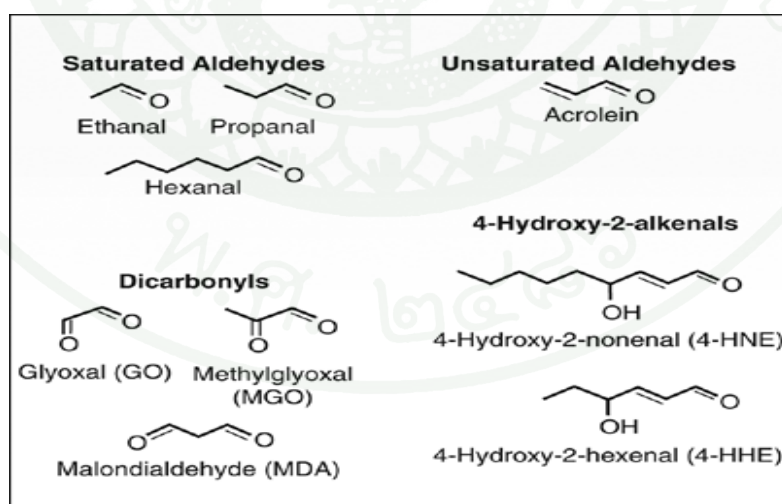


2. ปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน (Propagation)

ในขั้นตอนนี้ไขมันที่แปรสภาพเป็นอนุมูลอิสระ (lipid radical หรือ carbon-centered radical) จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxy radical, $\text{LOO}^\bullet$) (ปฏิกิริยาที่ 4) จากนั้นอนุมูลอิสระไขมันเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลไขมันที่อยู่ข้างเคียง โดยดึงไฮโดรเจนอะตอมออก แล้วเกิดเป็นไขมันเปอร์ออกไซด์ (lipid hydroperoxide, LOOH) และอนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัว (ปฏิกิริยาที่ 5) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ 4 และ 5 จะทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่เปอร์ออกซิเดชันของไขมันดำเนินต่อไป

3. ปฏิกิริยาสุดท้าย (Termination reaction)

ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ การที่อนุมูลอิสระของไขมันที่ไม่คงตัว 2 โมเลกุลมาจับกัน (ปฏิกิริยาที่ 6) หรือการที่อนุมูลอิสระไขมันที่ไม่คงตัวมาจับกับอนุมูลอิสระของไขมันเปอร์ออกไซด์ (ปฏิกิริยาที่ 7) ทำให้เกิดเป็นโมเลกุลที่คงตัว ได้แก่ อีเทน (Ethane) หรือเพนเทน (Pentane) และไขมันอัลดีไฮด์ (lipid aldehyde) โดยมีธาตุเหล็กหรือธาตุทองแดง (iron or copper ion) เป็นตัวช่วย อัลดีไฮด์ชนิด malondialdehyde (MDA) และ hydroxynonenal (HNE) ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3) เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยสามารถทำให้โปรตีนในเซลล์เปลี่ยนแปลงได้



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Malondialdehyde (MDA) และ Hydroxynonenal (HNE) จากกระบวนการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation)

ที่มา: Negre-Salvayre *et al.* (2008)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันใน 2 ทางที่แตกต่างกัน โดยการป้องกันไขมันเป้าหมาย จากปฏิกิริยาเริ่มต้น หรือ โดยการขัดขวาง propagation phase ในกรณีที่ 1 เป็นการป้องกันของสารต้านอนุมูลอิสระในการขัดขวางการสร้าง ROS หรือ การกำจัดชนิดของอนุมูลอิสระที่สามารถทำให้เกิดตัวตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน(oxidation initiation) ได้ เช่น $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 ฯลฯ ในกรณีที่ 2 เรียกว่า Chain breaking เป็นการป้องกันของสารต้านอนุมูลอิสระในการขัดขวาง oxidation propagators ($LOO^{\cdot}$) (Laguette *et al.*, 2007) และตัวต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันยังสามารถทำหน้าที่หลากหลายในระดับต่างๆ (Ozben, 1998) เช่น

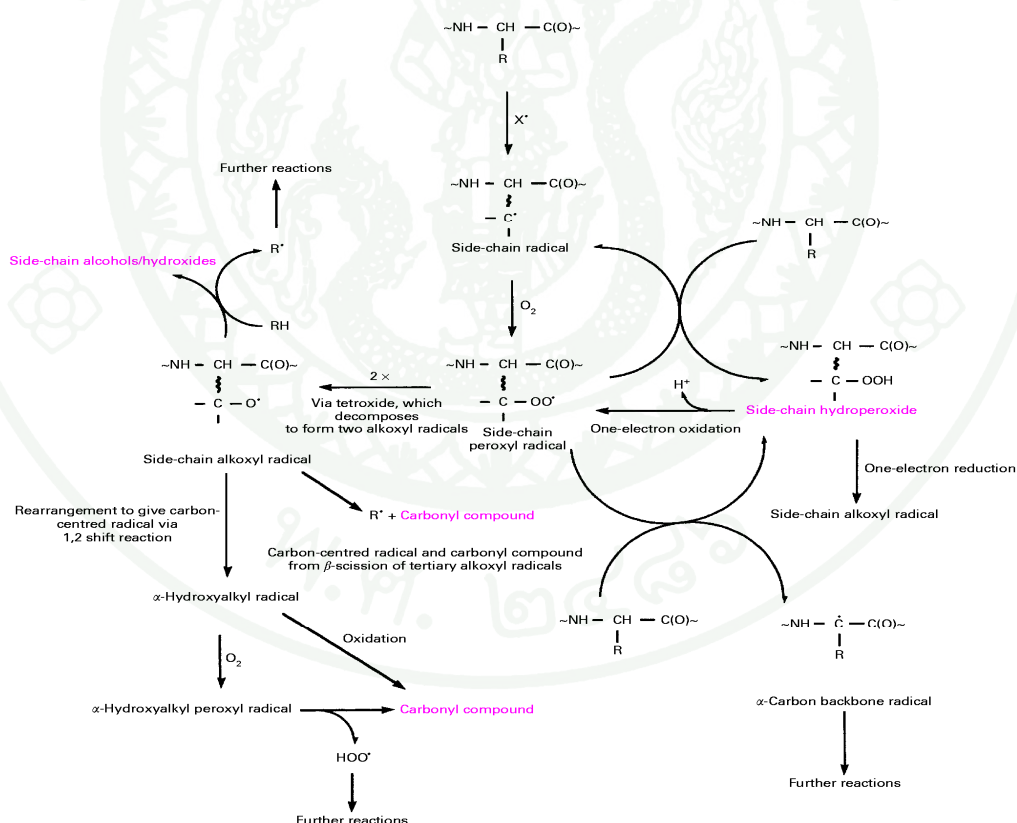
- a. เคลื่อนย้ายออกซิเจน หรือลดความเข้มข้นของออกซิเจน
- b. เคลื่อนย้ายธาตุโลหะที่นำสลาย (catalytic metal ion)
- c. เคลื่อนย้าย ROS/RNS เช่น $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HOCl$, 1O_2 หรือ $ONOO^{\cdot-}$
- d. กำจัดต้นเหตุของปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น $OH^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $RO_2^{\cdot}$
- e. ทำลายสายของตัวตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (initiated sequence)

2. การเกิดออกซิเดชันของโปรตีน (Protein oxidation)

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน (Grune *et al.*, 1997) และนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีและหน้าที่ของโปรตีน หรือเพิ่มความไวต่อการสลายโปรตีน จากการศึกษาพบว่า การสลายโปรตีน (Davies *et al.*, 1987; Stadtman, 1993; Wolff *et al.*, 1986) จะเพิ่มขึ้นหลังจากมีการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ หรือ H_2O_2 (Davies and Goldberg, 1987) ที่มีความเข้มข้น 20 – 400 ไมโครโมล นอกจากนี้ความเข้มข้นในระดับมิลลิโมลาร์ อาจจะไปสู่การสะสมของโปรตีนในรูปออกซิไดซ์ภายนอกเซลล์ อนุมูลอิสระมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์โดยตรง โดยในระยะหลังกระบวนการแปลรหัส (post-translation) ของโปรตีน อนุมูลอิสระจะไปออกซิไดซ์แขนงข้างของกรดอะมิโน และแกนโครงสร้างของโปรตีน (protein backbone) ซึ่งจะนำไปสู่ protein-protein cross-link และการแยกออกเป็นส่วนของโปรตีนอย่างต่อเนื่อง อนุมูลอิสระจึงส่งผลให้การสื่อสารของโปรตีนทำหน้าที่ผิดปกติ การทำหน้าที่ผิดปกติของออร์แกเนลล์ และทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ อนุพันธ์ของโปรตีนที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดถึงการเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจากอนุมูลอิสระ มี 2 ชนิด คือ อนุพันธ์ของคาร์บอนิลโปรตีน และ protein nitrotyrosine การเพิ่มของคาร์บอนิลโปรตีนแสดงถึงการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน จากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ การเพิ่มขึ้นของคาร์บอนิลโปรตีนในเนื้อเยื่อนั้น มี

ความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพ เช่น โรค rheumatoid arthritis, Alzheimer, respiratory distress syndrome, Parkinson's disease และ atherosclerosis (Grune *et al.*, 1997; Stadtman, 1993)

คาร์บอนิลโปรตีนเป็นดัชนีของภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สำคัญ เนื่องจากในกระบวนการที่ได้มาของคาร์บอนิลโปรตีน เกิดจากการออกซิไดซ์แขนงข้างโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรดอะมิโนชนิด โพรลีน อาร์จินีน ไลซีน และ ทรีโอนีน เป็นผลให้เกิดอนุมูลกรดอะมิโน และเมื่อได้รับ O_2 ก็จะเปลี่ยนรูปไปเป็นอนุมูลเปอร์ออกไซด์ (peroxyl radical, $ROO^\bullet$) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการทำลายโมเลกุลโปรตีน และเมื่อมีอนุมูลอิสระตัวอื่นมาเพิ่มปฏิกิริยาก็จะเกิด อนุมูลชนิดใหม่ คือ alkyl radical ($R^\bullet$) พร้อมผลิตภัณฑ์ คาร์บอนิลโปรตีน อีกทั้งการออกซิไดซ์ของ hydroxyalkyl radical ในปฏิกิริยา สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดคาร์บอนิลโปรตีนพร้อมด้วยอนุมูลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ($HO^\bullet$) ซึ่งมีความรุนแรงในการไปทำลายสารชีวโมเลกุลตัวใหม่ได้อีกทางหนึ่ง ดังภาพที่ 4 (Roger *et al.*, 1997)

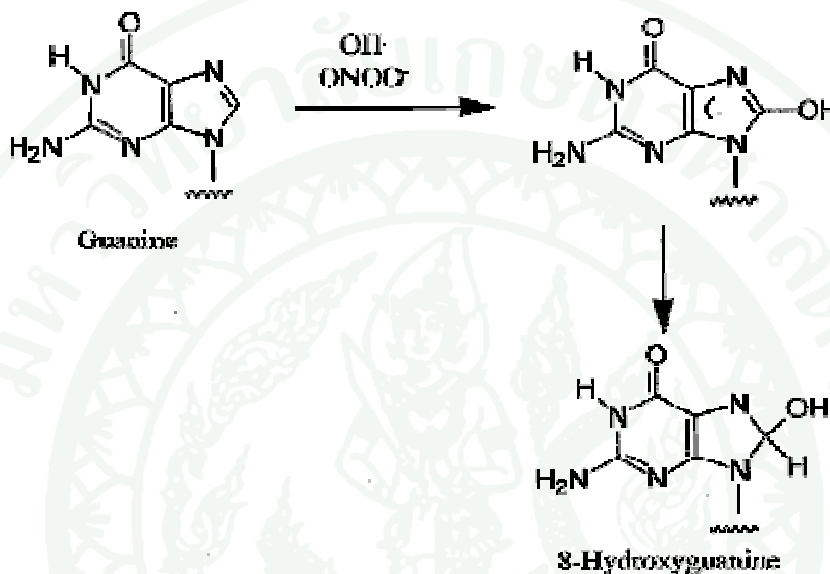


ภาพที่ 4 กระบวนการเกิดคาร์บอนิลโปรตีน ที่ได้จากออกซิเดชันของโปรตีน

ที่มา: Roger *et al.* (1997)

3. ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA Damage)

อนุมูลอิสระเป็นตัวเหนี่ยวนำ และก่อให้เกิดความเสียหายต่อสายดีเอ็นเอ (DNA) โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสายของดีเอ็นเอที่ระดับเบส และนิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งลำดับเบสที่มีกวานีน (guanine) สูง (Burney, 1999) ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของเบสกวานีน จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ที่มา: Burney *et al.* (1999)

ความเสียหายของสายดีเอ็นเอ ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจะมีบทบาทต่อการเกิดโรคมะเร็ง และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ (Kasai, 1997; Dizdaroglu, 1992; Guyton and Kensler, 1993; Feig *et al.*, 1994; Beckman and Ames, 1998) ดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายจะถูกซ่อมแซมด้วยเอนไซม์ และเซลล์จะสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้เป็นปกติ อย่างไรก็ตามการซ่อมแซมที่ผิดพลาดของดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายจะมีผลทำให้เกิดการกลาย (mutation) เช่น การสลับลำดับเบส (base substitution) และการขาดหายของลำดับเบส (deletion) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเป็นเหตุที่จะนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง (Vineis *et al.*, 1999; Halliwell, 1998; Wang *et al.*, 1998; Poulsen *et al.*, 1998) ตำแหน่งของการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) ยังส่งผลต่อการกลายได้ (Hamrahan *et al.*, 1997) ดังนั้นการศึกษาลำดับเบสจำเพาะในสายดีเอ็นเอ จึงใช้ในการตรวจหาความเสียหายของดีเอ็นเอ และนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเกิดมะเร็ง ความ

เสียหายของดีเอ็นเอในร่างกายส่วนหนึ่งเกิดจากการเพิ่มของอนุมูลอิสระ (Marnett, 2000) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และ $\text{OH}^{\cdot}$ และ non – radical oxidants เช่น hydrogen peroxide, singlet oxygen, nitric oxide, lipid hydroperoxide, alkoxyl radical, peroxy radical, nitrogen-centered, sulfate radical และ metal oxygen complexes โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้มีความแตกต่างกันของ redox potential (Neta *et al.*, 1988)

เซลล์เม็ดเลือดแดง และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

เซลล์เม็ดเลือดแดงของสุนัขมีช่วงอายุขัยประมาณ 100-115 วัน (Feldman *et al.*, 2000) มีหน้าที่สำคัญเป็นตัวขนส่งออกซิเจนเข้าสู่เนื้อเยื่อทั้งหลาย แม้จะสามารถเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงได้นานขึ้นในน้ำยารักษาสภาพ (liquid preservation) แต่การทำงานของเซลล์จะลดลงในช่วงเวลาการเก็บรักษา นอกจากนี้อัตราการอยู่รอดหลังจากการให้เลือด (transfusion) และความสามารถในการขนส่งออกซิเจนจะลดลง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการสำหรับการเก็บรักษาเลือดจึงมีความสำคัญ (Hamasaki and Yamamoto, 2000)

เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นกลุ่มของเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย และ ออร์แกเนลล์ (organelles) ภายในเซลล์ (Ozben, 1998) ดังนั้นเซลล์เม็ดเลือดแดงจึงไม่สามารถสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมัน และใช้กระบวนการไกลโคไลซิส จึงเป็นเพียงแหล่งพลังงานเดียวในการดำเนินกิจกรรมของเซลล์ (Hamasaki and Yamamoto, 2000)

เซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์อิสระ จะสัมผัสกับอนุมูลอิสระทั้งภายในและภายนอกเซลล์ จึงมีการพัฒนาระบบการป้องกันที่จะต้านอนุมูลอิสระ เพื่อดำรงความอยู่รอดของเซลล์และทำหน้าที่สำคัญหลายหลาย เช่น (Ozben, 1998)

1. สร้าง ATP จากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เพื่อใช้ในกระบวนการขนส่งไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane ion pump)
2. สร้าง NADH สำหรับเก็บอีโมโกลบินในรูปรีดิวซ์
3. สร้าง reducing power เช่น NADPH และ NADH สำหรับการควบคุมการถูกกระทบจากอนุมูลอิสระทั้งภายนอกและภายในเซลล์
4. เซลล์เม็ดเลือดแดงต้องเคลื่อนย้ายอนุมูลอิสระเหล่านี้ โดยใช้ reducing power ซึ่งได้รับความช่วยเหลือจาก เอนไซม์ เช่น Glutathione reductase, Glutathione peroxidase หรือโดยการใช้

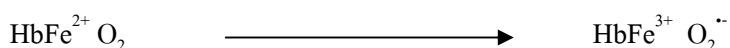
ระบบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ reducing power เช่น catalase และ superoxide dismutase เอนไซม์ทั้งสองนี้ ไม่มี reducing power แต่สามารถเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้มีความเป็นพิษน้อยลง หรือไม่มีพิษเลย

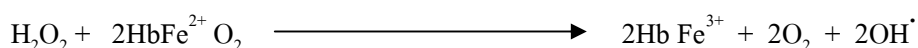
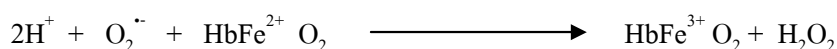
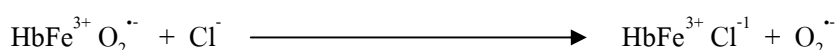
แม้ว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีระบบป้องกันตนเองจากสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ก็ยังคงเกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทั้งที่ส่วนประกอบโปรตีนและไขมัน ทำให้ช่วงชีวิตของเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง แหล่งที่มาหลักของ ROS ในเซลล์เม็ดเลือดแดง คือ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (autooxidation) ของ oxyhemoglobin ซึ่งจะสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ แล้วเกิดปฏิกิริยาดิสมิวเตชัน (dismutation) เปลี่ยนไปเป็น H_2O_2 และเกิด $OH^\cdot$ ตามมา (Nagababu *et al.*, 2003)

ATP และ NADH ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ได้มาจากกระบวนการสลายกลูโคสโดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) ซึ่ง ATP มีความสำคัญสำหรับการทำงานในการขนส่งไอออน (Ion pump) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และ กระบวนการขนส่งสารโดยใช้พลังงาน (active transport) ของเซลล์ (Atkinson, 1949) ในกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) จะมีการสร้าง NADPH ขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการรีดักชัน (reduction) ของฮีโมโกลบินที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidized hemoglobin) หรือ เมตฮีโมโกลบินไปเป็นฮีโมโกลบินในรูปรีดิวซ์ (reduced hemoglobin) ซึ่งทุกๆวันฮีโมโกลบินประมาณ 0.5-3.0% จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเมตฮีโมโกลบิน (Carrell *et al.*, 1975) และ เมตฮีโมโกลบินนี้จะถูกรีดิคซ์โดย NADH โดยการช่วยของเมตฮีโมโกลบินรีดักเทส (methemoglobin reductase) แต่ก็ยังมีเมตฮีโมโกลบินคงเหลือ ซึ่งจะถูกรีดิคซ์โดยวิตามิน ซี (ascorbate) และกลูตาไธโอน (Wefers and Sies, 1988) ยาหรือสารเคมีบางชนิดสามารถป้องกันปฏิกิริยารีดักชันซึ่งเป็นสาเหตุของเมตฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงได้ (Baggot, 1992)

เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความเข้มข้นของธาตุเหล็กสูงจึงมีการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ขึ้น (Carrell *et al.*, 1975; Shikama, 1984; Winterbourn, 1985) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อฮีโมโกลบินของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Wever *et al.*, 1973; Misra and Fridovich, 1972; Winterbourn *et al.*, 1976; Lynch *et al.*, 1976; Demma and Salhany, 1977)

สมการการเกิดอนุมูลอิสระเนื่องจากฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง





การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันพร้อมกับการลด pH และความดันย่อยของออกซิเจนในเลือด จะเกิดการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะสูงที่สุดเมื่อฮีโมโกลบินอิ่มตัวด้วยออกซิเจน 50% (George and Stratmann, 1952; Brown and Mebine, 1969; Banerjee and Stetzkowski, 1970) อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์จะปลดปล่อย Fe^{2+} จากฮีโมโกลบิน และ Fe^{3+} จากเมตฮีโมโกลบิน ซึ่งผลจากเหล็กที่ถูกสลายก็จะเกิด Fenton reaction และ Haber-Weiss reaction ผลจากการสลายจะให้ $\text{OH}^{\cdot}$ และนำไปสู่การทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ต่อไป (Halliwell and Gutteridge, 1984; Halliwell and Gutteridge, 1985; Halliwell and Gutteridge, 1986; Wood, 1988; Puppo and Halliwell, 1988)

สมการ Fenton reaction:



สมการ Haber-Weiss reaction :

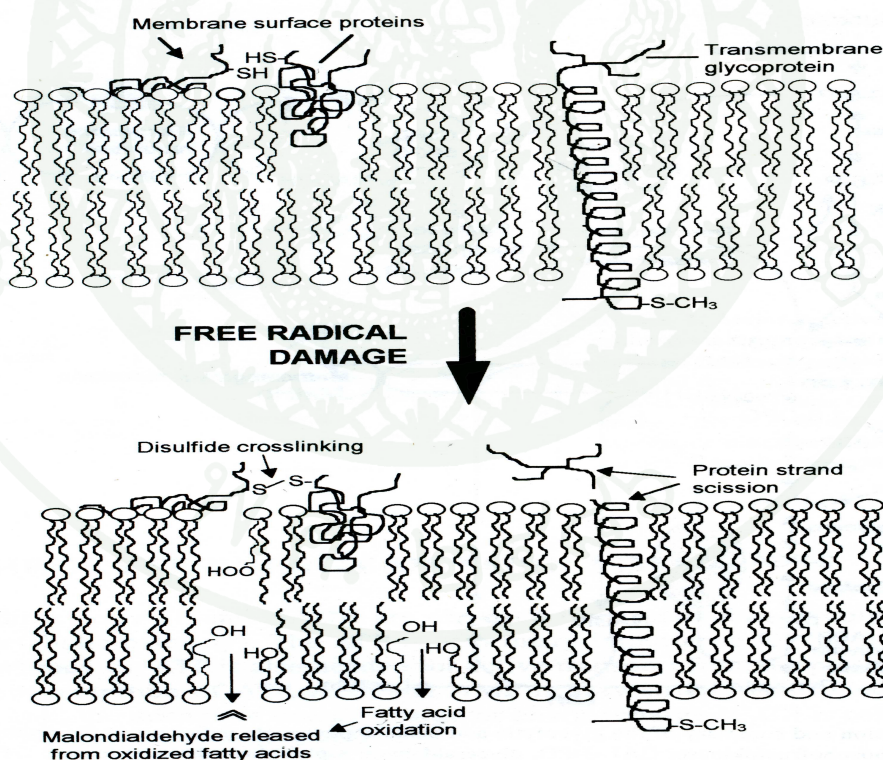


กระบวนการเกิดออกซิเดชันในเม็ดเลือดแดง เป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างอนุมูลตั้งต้น (precursor radical) เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ในระหว่างการสร้างเมตฮีโมโกลบิน เมื่ออนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับ oxyhemoglobin จะนำไปสู่การเกิด H_2O_2 และปฏิกิริยาของอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์กับ H_2O_2 และ Fe^{2+} ก็จะเป็นแหล่งผลิต $\text{OH}^{\cdot}$ ที่สำคัญของเม็ดเลือดแดง

ในเม็ดเลือดแดงที่มีระดับของธาตุเหล็กที่สูง การสร้าง $\text{OH}^{\cdot}$ จึงเป็นกลไกเริ่มต้นในการทำลายเซลล์ ดังนั้นการป้องกันที่จะต้านอันตรายจากผลของการปล่อยธาตุเหล็กมีความสำคัญมากในเม็ดเลือดแดง จึงมีการใช้ metal chelator ที่แตกต่างออกไป เช่น deferoxamine diethylenetriaminepentaacetic acid หรือ ethylenediaminetetraacetic acid ซึ่งจับเหล็กที่ถูกปล่อยจากเม็ดเลือดแดง

ที่เสื่อมสภาพทำให้สามารถลดอันตรายที่เกิดจาก Fenton reaction และ Haber-Weiss reaction ได้ (Knight *et al.*, 1992)

แหล่งที่สำคัญของ reducing power ในเซลล์เม็ดเลือดแดง คือ Pentose phosphate pathway (PPP) โดยมีเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีส่วนในการสังเคราะห์ NADPH คือ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) และ 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุม Pentose phosphate pathway หากขาดเอนไซม์นี้จะเกิดความผิดปกติต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากการสังเคราะห์ NADPH ไม่เพียงพอ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระมากขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมีผลต่อไขมัน และ โปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดความเสียหายต่อฟอสโฟลิปิด เกิดการสร้าง Malondialdehyde (MDA) ทำลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน ผลจากการทำลายโมเลกุลโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าวจะนำไปสู่การสูญเสียโครงสร้างปกติ และเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (Orten and Neutaus, 1982) ดังภาพที่ 6

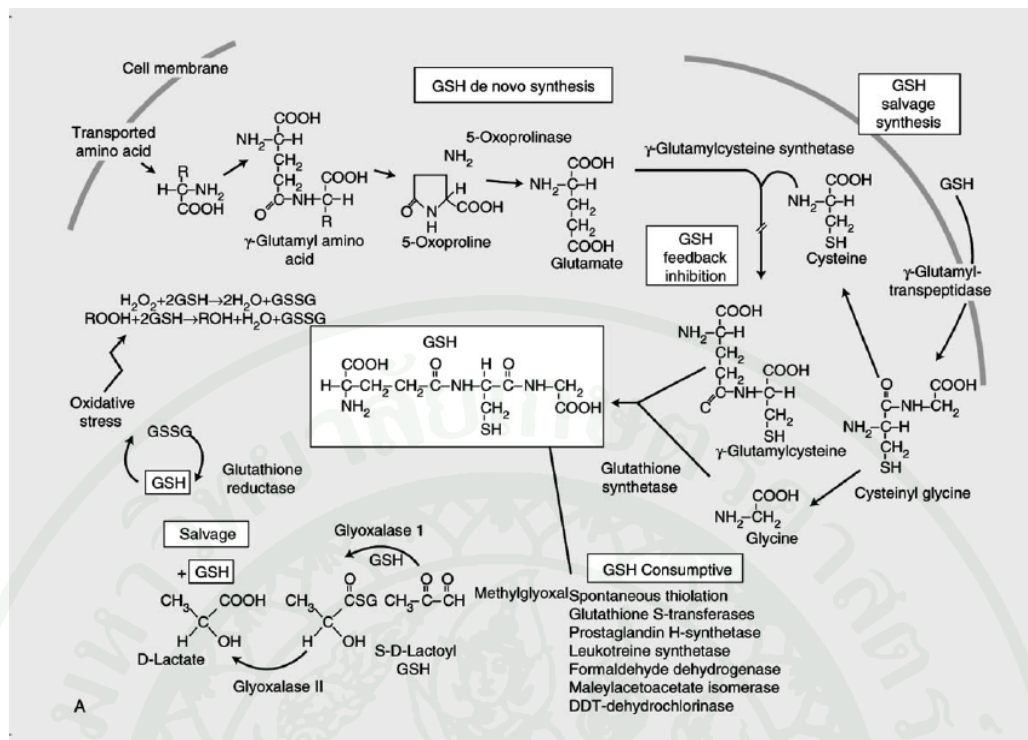


ภาพที่ 6 กระบวนการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากอนุมูลอิสระ

ที่มา: Ozben (1998)

ความสำคัญของ NADPH ไม่เพียงแต่จะเป็น reducing power แต่ยังใช้ในปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของ oxidized glutathione (GSSG) ไปเป็น reduced glutathione (GSH) โดย glutathione reductase (Ozben, 1998) กลูตาไธโอนสังเคราะห์จากกรดอะมิโนไกลซีน ซีสเตอีน (cysteine) และ กลูตามิก แอซิด (glutamic acid) การสังเคราะห์กลูตาไธโอนต้องใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) และ GSH synthetase ในการเร่งปฏิกิริยา (Meister and Anderson, 1983) (ภาพที่ 7) การควบคุมของการทำงานของเอนไซม์ γ -GCS เป็นลักษณะที่มีความซับซ้อนจะทำงานก็ต่อเมื่อมีการตอบสนองที่จำเพาะ ซึ่งการสังเคราะห์กลูตาไธโอนนี้มีข้อจำกัดที่ระดับของกรดอะมิโนซีสเตอีน ซึ่งจะขนส่งเข้าสู่เซลล์ โดยจับกับโซเดียมไอออน โดยไม่ต้องอาศัยตัวพา (Bannai *et al.*, 1984) สารอนุมูลอิสระ เช่น H_2O_2 และสารประกอบอิเล็กโตรฟิลิก (electrophilic compound) จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ γ -GCS ซึ่งมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์กลูตาไธโอนโดยเฉพาะ กระบวนการฟอสโฟรีเลชันของเอนไซม์ γ -GCS นำไปสู่การยับยั้งการสังเคราะห์ กลูตาไธโอน และกลูตาไธโอนเองจะควบคุมการทำงานของเอนไซม์ γ -GCS โดยกลไกการยับยั้งย้อนกลับ (feed back inhibition) ดังนั้นการขาดหายไปของกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงจะเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ กลูตาไธโอนด้วย ทั้งนี้กลูตาไธโอนยังมีหน้าที่หลัก 4 ประการ คือ (Mannervik, 1985)

1. การรักษาหมู่ไธออล (thiol groups) ของโปรตีนไว้ ในระยะ reduced state (หน้าที่ของ protein disulfide reducing ของ GSH จะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ GSH/GSSG มากกว่าจำนวน glutathione ในเซลล์เม็ดเลือดแดง)
2. เคลื่อนย้าย H_2O_2 เพื่อกำจัดโดย GSH-Pxs
3. เพื่อช่วยให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน กับสารประกอบที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidizing compounds) ตัวอื่นๆ
4. เพื่อกำจัดสารพิษของ xenobiotics โดยกระบวนการ conjugation แล้วถูกสลายโดย glutathione S-transferase (GSTs)



ภาพที่ 7 ภาพแสดงกระบวนการรักษาสมดุลของกลูตาไธโอน(GSH)

ที่มา: Danyelle (2003)

ในสภาพความเป็นจริงเซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถสร้าง NADPH และกลูตาไธโอนอย่างเพียงพอสำหรับป้องกันภาวะต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Ozben, 1998) แต่ถ้ากระบวนการป้องกันภาวะเครียดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่เพียงพอ ก็จะมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ 3 ทาง (เจลิยว, 2548) คือ

1. เกิดมี heinz body หรือ accentrocyte จากฮีโมโกลบินมีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม (denatured)
2. โครงสร้างโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน
3. เกิดเมตฮีโมโกลบินจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของธาตุเหล็กที่โมเลกุลของฮีโมโกลบิน มีผลขัดขวางการขนส่งออกซิเจน

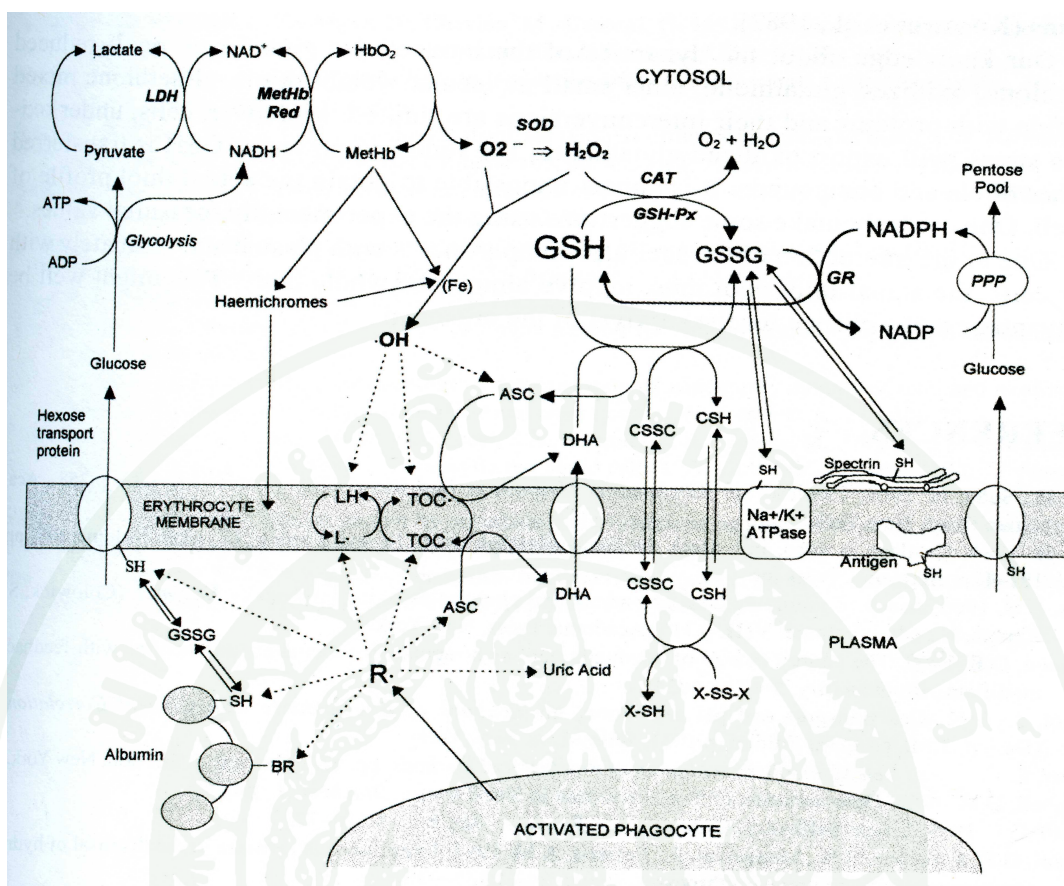
ผลของข้อ 1 และ 2 ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงเสียหายมากพอที่จะปล่อยฮีโมโกลบินออกมา แล้วเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงตามมา

ระบบการทำงานของสารต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์เม็ดเลือดแดง

ระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่สำคัญ คือ กลูตาไธโอน เนื่องจากสารประกอบนี้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา ที่ร่วมทำงานกับสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ 3 ชนิด คือ Glutathione peroxidase (GSH-Px) Glutathione reductase (GR) และ Glutathione S-transferase (GSHs-t) ในระหว่างกระบวนการสลายของ GSHpx ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกทำให้ไม่สามารถทำงานได้โดยสารที่เป็นกลาง คือ H_2O และ Oxidized Glutathione (GSSG) กลูตาไธโอนเป็น reducing factor ที่สำคัญภายในเซลล์ ส่วน GSSG จะกลับมาอยู่ในรูปกลูตาไธโอนอย่างคงที่โดย GR โดยการใช้ประโยชน์จาก NADPH (ภาพที่ 8) ปฏิกิริยาจะดำเนินต่อไปจนกระทั่ง NADPH ลดลงหรือหมดไป ที่ความเข้มข้นของ NADPH ในระดับต่ำ ระดับของกลูตาไธโอนก็จะลดลง เป็นสาเหตุให้เกิดการเพิ่มความเข้มข้นของ H_2O_2 ในเนื้อเยื่อ โดยส่วนมากความเข้มข้นของกลูตาไธโอนภายในเซลล์อยู่ระหว่าง 0.5-10 โมลต่อลิตรโดยประมาณ 5% อยู่ในรูป GSSG (Kretzschmar and Klinger., 1990; Mannervik, 1987; Reed and Fariss, 1984; Deneke and Fanburg, 1989) ภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงมีการใช้ประโยชน์จากกลูตาไธโอนมากตามความแตกต่างของสารประกอบเคมี เนื่องจากกลูตาไธโอนจะทำปฏิกิริยาหลักๆ กับ H_2O_2 และปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน จึงมีการเพิ่มกลูตาไธโอนตัวใหม่อีกอย่างคงที่ และจะต้องสร้างก่อนที่จะเกิดการการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ (Jozwik *et al.*, 1997)

ระบบการป้องกันอันตรายต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งมีสาเหตุมาจาก ROS หรือ อนุมูลอิสระตัวอื่นๆ สามารถแบ่งระบบออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. GSH independent system ประกอบด้วย catalase, superoxide dismutase
2. GSH dependent system ประกอบด้วย NADPH-dependent GR และ GSH-Px systems



ภาพที่ 8 ภาพแสดงกลไกการเกิดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และกลไกการป้องกันของเซลล์เม็ดเลือดแดง อธิบายด้วยย่อโดย DHA: dehydroascorbate; ASC: ascorbate; CSH: cysteamine; CSSC: cystamine; L[•]: lipid radical; LH: lipid; TOC[•]: α -tocopherol radical; TOC: α -tocopherol; PPP: pentose phosphate pathway; BR: bilirubin; X-SH: โมเลกุลของสารใดๆ ที่มีหมู่ไธอิล (thiol group) เป็นองค์ประกอบ; X-SS-X: รูปออกซิไดซ์ของโมเลกุลที่มีหมู่ไธอิลเป็นองค์ประกอบ

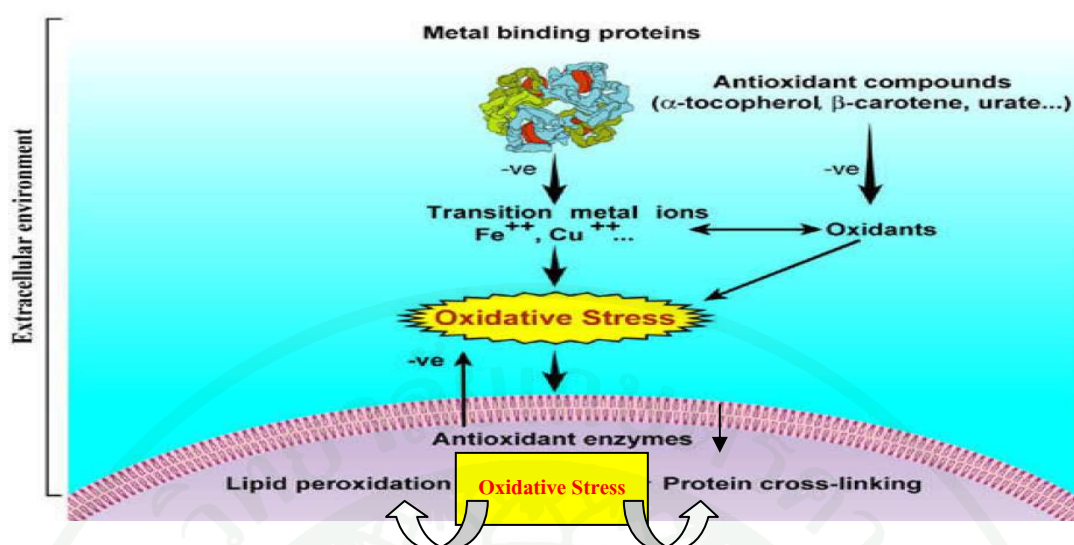
ที่มา: Hunt and stocker (1990)

เนื่องจากความดันย่อยของออกซิเจน (partial oxygen pressure) สูง เซลล์เม็ดเลือดแดงจะเผชิญกับภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทุกวันๆ ประมาณ 0.5-30% ของฮีโมโกลบินจะเปลี่ยนไปเป็นเมตฮีโมโกลบิน และ เกิดปฏิกิริยาออกโตออกซิเดชันของฮีโมโกลบิน เป็นสาเหตุให้เกิดการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ในภาวะที่มีการสร้างเมตฮีโมโกลบิน ร่างกายจะมีระบบกำจัดเพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปฮีโมโกลบินที่สามารถทำงานได้โดยใช้ NADH จากวิถีไกลโคไลซิสเป็นตัวรีดิวซ์ เมตฮีโมโกลบินให้เปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูปฮีโมโกลบิน โดยความช่วยเหลือของเอนไซม์เมตฮีโมโกลบินรีดัก

เทศ แต่ถ้า NADH ไม่เพียงพอก็จะทำให้เกิดการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และเปลี่ยนไปเป็น H_2O_2 จากนั้นกลูตาไธโอนก็จะมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็น H_2O และ O_2 เพื่อที่จะลดความเสี่ยงต่อการเกิด $OH^\cdot$ (ภาพที่ 8) ซึ่งส่งผลต่อ unsaturated phospholipids ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกออกซิไดซ์ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงตามมา (Hunt and stocker, 1990; Gaetani *et al.*, 1994)

ปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่มีผลต่อการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง คือ โปรตีนในพลาสมา ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอนุมูลอิสระจะเกิดขึ้นควบคู่กันทั้งภายในเซลล์ที่มีผลต่อเซลล์โดยตรง และภายนอกเซลล์ที่เกิดจากการทำลายสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในพลาสมา แล้วมีการสร้างสารอนุมูลอิสระที่มีความรุนแรงสูง ไปมีผลต่อเซลล์ที่อยู่ข้างเคียง โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง (Agarwal *et al.*, 2005) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นดังกล่าว จะไปทำลายโมเลกุลไขมัน และโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นในระหว่างการเก็บรักษาเลือดอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์จึงมีความสำคัญในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง

การทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนในพลาสมาเกิดจากอนุมูลคาร์บอนิลที่เกิดจากการออกซิไดซ์แขนงข้างของกรดอะมิโน (Grune *et al.*, 1997) ซึ่งต้องการ metal ions (Fe^{2+} และ Cu^{2+}) ในการกระตุ้น โดยการจับกับตำแหน่ง cation binding site ในโมเลกุลของโปรตีน จากนั้น H_2O_2 เข้าทำปฏิกิริยากับ Fe^{2+} (โดยสมการของ Fenton reaction) เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $OH^\cdot$ (Stadtman, 1990; Moskovitz *et al.*, 2002) ซึ่งมีพลังในการทำลายสารชีวโมเลกุล นำไปสู่การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงโดยเพราะอย่างยิ่งเซลล์เม็ดเลือดแดง (ภาพที่ 9) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมาสามารถใช้เป็นดัชนีที่แสดงถึงการเกิดโปรตีนออกซิเดชัน (Grune *et al.*, 1997; Stadtman, 1993)



ภาพที่ 9 กระบวนการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงจากโปรตีนในพลาสมา

ที่มา: Agarwal *et al.* (2005)

ธนาคารเลือด และการให้เลือด

การให้เลือดเป็นการช่วยชีวิตสัตว์ในรายที่เกิดภาวะวิกฤต โดยการช่วยชดเชยเลือดที่สูญเสีย เพื่อที่จะรักษาความสมดุลในการขนส่งออกซิเจนเข้าสู่ vital organs (Tinmouth *et al.*, 2008) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาพัฒนาการใช้สารรักษาสภาพเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างต่อเนื่อง เริ่มตั้งแต่การใช้ Acid-Citrate-Dextrose (ACD) ในปี 1947 (Gibson *et al.*, 1947; Ross *et al.*, 1947) ต่อมามีการใช้ Citrate Phosphate Dextrose (CPD) และ Citrate Phosphate Dextrose Adenine (CPDA) ในปี 1957 และ 1960 ตามลำดับ ปัจจุบันทั้งในคน และสุนัขนิยมใช้สาร CPDA ในการเก็บรักษาเลือด ซึ่งสามารถเพิ่มเวลาเก็บเป็น 28 - 35 วัน (Orlina and Josephson, 1969) เลือดที่เก็บรักษาในธนาคารเลือดได้จากการเจาะเลือดแล้วผสมกับสารรักษาสภาพเซลล์ (CPDA) ใช้สำหรับให้พลังงานแก่เซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วเก็บในอุณหภูมิ 4 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยลดวิถีไกลโคไลซิสของเซลล์ต่างๆ ในเลือดระหว่างการเก็บเลือดจะมีภาวะเป็นกรดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสภาวะเช่นนี้จะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่น hexokinase และ phosphofructokinase นอกจากนี้การคงสภาพชีวิต (viability) และ organic phosphates ได้แก่ adenosine triphosphate (ATP) และ 2,3 diphosphoglyceric acid (DPG) จะลดลงไปด้วย (Dawson *et al.*, 1970) การที่ ATP ในเลือดลดลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างและผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง ระดับ ATP จึงมีความสำคัญต่อความมีชีวิตของเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดทุกชนิดยังมีชีวิตหลังจากเจาะเก็บในน้ำยากันเลือดแข็ง และกิจกรรมของเซลล์

เหล่านี้ยังดำเนินต่อไป ทำให้มีความเปลี่ยนแปลงระดับของสารต่างๆ ในเลือด เรียกว่า storage lesion (พิมล, 2526)

การลดลงของ DPG ในเม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาในธนาคารเลือด โดย DPG เป็น Hb-organic phosphate ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปล่อยออกซิเจนจากออกซีฮีโมโกลบิน (HbO_2) ไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย เลือดที่มี CPD จะมีการลดลงของ DPG น้อยกว่าเลือดที่เก็บใน acid citrate dextrose (ACD) ในระยะเวลาเก็บเท่าๆ กัน (Bailey and Bove, 1975) ปัจจุบันจึงนิยมใช้สาร CPD เป็นสารช่วยรักษาความชุ่มชื้นของเซลล์เม็ดเลือดแดง และมีการเติมสารในน้ำยาเก็บเลือดแข็ง เช่น อะดีนีน (adenine) เพื่อยืดอายุการเก็บ (rejuvenation) ของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดย อะดีนีนจะถูกใช้ไปในการสร้าง nucleotide ตลอดระยะเวลาการเก็บเลือด จึงช่วยชะลอการลดลงของ ATP แต่ข้อเสียของการเติมอะดีนีน คือ การลดลงของ DPG เร็วกว่าเลือดที่เก็บรักษาด้วย ACD หรือ CPD ธรรมดา (Zuck *et al.*, 1977)

เนื่องจากเลือดสัมผัสกับความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานเพิ่มขึ้น (Lewin and Popov, 1994) ซึ่งหลังจากเก็บเลือดจากผู้ให้เลือดในเลือดจะมีองค์ประกอบมากมายที่จะนำไปสู่การเพิ่มภาวะออกซิเดชันของเลือด ทำให้ลดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลต่อเนื่องถึงการเสียหายต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการเกิดอนุมูลอิสระนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงหลายด้าน เช่น โปรตีนเซียม และแลคเตต ดีไฮโดรจีเนส ที่หลังจากเม็ดเลือดแดงออกสู่พลาสมา ซึ่งสามารถพิจารณาเป็นตัวชี้วัดที่ดีของความเสียหายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและ MDA ก็ใช้เป็นตัวชี้วัดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Niki *et al.*, 1988) การทำงานของ SOD และการป้องกันของ GSH-Px ในการต้านความเสียหายของเลือด (Yamaguchi *et al.*, 1992) ก็มีประโยชน์ในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของสถานะรวมของสารต้านอนุมูลอิสระและเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในเลือดที่เก็บในเวลาต่างๆ เช่นเดียวกัน

ผลิตภัณฑ์เลือดของสุนัขในปัจจุบันสามารถเก็บรักษาได้หลายรูปแบบ แบ่งชนิดผลิตภัณฑ์ของเลือดออกได้ดังต่อไปนี้

1. ผลิตภัณฑ์ของเม็ดเลือดแดง (Red blood cell products)

โลหิตครบส่วน (Whole blood)

คือ เลือดที่เก็บจากตัวให้ผสมกับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Howard *et al.*, 1992)
 ถุงเลือดมาตรฐาน 1 ถุงจะมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (CPDA) อยู่ 50 ml (Ettinger and Feldman, 2005) โดยต้องให้เลือดกับสัตว์ภายใน 8 ชั่วโมงหลังการเก็บเลือด ผลิตภัณฑ์เลือดชนิดนี้ จะให้ทั้งการเพิ่มความสามารถในการขนส่งออกซิเจน และมีองค์ประกอบการแข็งตัวของเลือด (Howard *et al.*, 1992) โลหิตครบส่วนที่ถูกเก็บเป็นเวลานานจะมีคุณสมบัติเพียงแค่เป็นตัวเพิ่มความสามารถในการขนส่งออกซิเจน การใช้โลหิตครบส่วนจะมีความเหมาะสมมากที่สุดในการรักษาสัตว์ที่มีการสูญเสียเลือดมากจากอุบัติเหตุหรือในการผ่าตัด มีภาวะโลหิตจาง (anemic animal) หรือ รายที่ขาดองค์ประกอบการแข็งตัวของเลือด ถ้าโลหิตครบส่วนถูกใช้เป็นแหล่งขององค์ประกอบที่ช่วยให้เลือดแข็งตัว (coagulation factors) ในสัตว์ที่ยังไม่มีอาการของภาวะเลือดจาง จะทำให้เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงมากกว่าปกติ (polycythemia) โลหิตครบส่วนไม่ควรจะใช้ในรายที่มีภาวะโลหิตจางแต่มีปริมาตรเม็ดเลือดแดงปกติ (normovolemic anemia) เนื่องจากจะทำให้เกิดความเสียดื้อต่อภาวะ ปริมาตรเลือดมากกว่าปกติ (volume overload) จากมีปริมาตรของพลาสมาเพิ่มขึ้น โลหิตครบส่วนมีอายุการเก็บได้ 28-35 วัน ขนาดการให้ โลหิตครบส่วน คือ 10-20 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม (ml/kg) (Ettinger and Feldman, 2005)

Packed red blood cells

หลังจากการปั่นโลหิตครบส่วน แล้วแยกส่วนของเม็ดเลือดแดง และพลาสมา จากนั้นพลาสมาก็จะถูกย้ายเข้าสู่ satellite bag ซึ่งจะยังเหลือเฉพาะเม็ดเลือดแดง และพลาสมาจำนวนหนึ่ง (Kerl and Hohenhaus, 1993) ซึ่ง Packed red blood cells จะมีความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดง (PCV) ประมาณ 80% (Morrissey and Cotter, 2000) ในการสร้างเป็น Packed red blood cells โดย 1 ยูนิต ของ Packed red blood cells ได้จาก 1 ยูนิต ของโลหิตครบส่วนในสุนัข Packed red blood cells 1 ยูนิต เท่ากับ 200 มิลลิลิตร มีค่า hematocrit 80% (Kerl and Hohenhaus, 1993) ซึ่ง Packed red blood cells จะมีความเหนียวหนืดมาก ดังนั้นจึงควรเพิ่ม Normal saline (0.9%) เข้าสู่ Packed red blood cells เพื่อให้ผลิตภัณฑ์เลือดสามารถเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น (Ettinger and Feldman, 2005) โดย Packed red blood cells จะใช้ในการดำรงไว้ซึ่งการขนส่งออกซิเจนเข้าสู่เนื้อเยื่อให้เพียงพอกับความ ต้องการ ซึ่ง Packed red blood cells ใช้ในการรักษา ภาวะโลหิตจาง เนื่องจากการเสียเลือด เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) หรือ ไชกระดุกไม่ทำงาน (Kerl and Hohenhaus, 1993) ค่าความเข้มข้นของ

ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) และ ฮีโมโกลบินเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับการประเมินความจำเป็นที่จะให้เม็ดเลือดแดง แต่ต้องดูองค์ประกอบอื่นๆด้วย เช่น สถานะของหัวใจ (cardiovascular status) การเสียเลือด โรคโลหิตจางเรื้อรัง และความสามารถของไขกระดูก ต่อการตอบสนองภาวะโลหิตจางเข้ามามีบทบาทในการตัดสินใจให้เลือดกับสัตว์ (Audet and Goodnough, 1992) ขนาดการให้ Packed red blood cells คือ 6-10 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม (Ettinger and Feldman, 2005)

Packed red blood cells ที่มี Additive solution

เป็นผลิตภัณฑ์เลือดที่มีกระบวนการทำลายกันกับ Packed red blood cells แต่หลังจากที่เม็ดเลือดแดงถูกแยกออกจากพลาสมาแล้ว ก็จะมีการเพิ่ม additive solution เข้าไปใน red blood cells 100 มิลลิลิตร มีค่า PCV อยู่ที่ 55%-60% additive solution มีหลายชนิด เช่น dextrose, adenine, mannitol และ sodium chloride เพื่อที่จะช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดแดงสามารถทำงานได้นานกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บอยู่ในสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดทั่วไป (เพิ่มอายุการเก็บจาก 21 วัน ไปเป็น 35-37 วัน) และควรมีการเพิ่ม normal saline เพื่อเพิ่มการเคลื่อนไหวของเซลล์เม็ดเลือดแดงเช่นกัน ขนาดการให้ Packed red blood cells ที่มี additive solution คือ 10-15 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม (Ettinger and Feldman, 2005)

2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากส่วนประกอบของพลาสมา (Plasma component)

Fresh frozen plasma (FFP)

คือ พลาสมาที่ได้รับจากโลหิตครบส่วนที่ถูกปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงออกภายใน 6 ชั่วโมง หากเก็บด้วย sodium citrate หรือ ACD แต่ถ้าเก็บด้วย CPDA, CPD จะต้องปั่นแยกเม็ดเลือดแดงภายใน 8 ชั่วโมง (Lanevschi and Wardrop, 2001) หลังจากการเก็บเลือด ซึ่งจะยังคงมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเหลือในพลาสมา จากนั้นก็นำไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส โดยองค์ประกอบการแข็งตัวของเลือดยังคงทำงานต่อไปได้อีกประมาณ 1 ปี FFP เป็นแหล่งขององค์ประกอบการแข็งตัวของเลือดที่ดีที่สุด (Ettinger and Feldman, 2005) จึงใช้รักษาภาวะขาด coagulation factor ที่เกี่ยวกับตับทำงานผิดปกติ (Lanevschi and Wardrop, 2001) และสามารถรักษาภาวะ hemorrhage ที่ผิดปกติได้อย่างกว้างขวาง รวมไปถึงภาวะ hemophilia, von Willebrand's disease, rodenticide intoxication, และ Disseminated intravascular coagulation (DIC) แต่ไม่ควรใช้เป็นแหล่งของอัลบูมิน (albumin) หรือ สารอาหาร โดย FFP 45 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 1

กิโลกรัมจึงจะสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ serum albumin ได้ 1 กรัมต่อปริมาตรพลาสมา 100 มิลลิตร (g/dl) FFP จะใช้ในลูกสุนัข หรือลูกแมวที่มีภาวะ failure of passive transfer การให้พลาสมา จะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด volume overload หรือ ปฏิกิริยาการแพ้ ขนาดการให้เริ่มต้นของ FFP คือ 6-10 มิลลิตรต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม 1-3 ครั้งต่อวัน ขนาดการให้ขึ้นอยู่กับสภาพสัตว์ (Ettinger and Feldman, 2005)

Frozen plasma (FP)

เป็นพลาสมาที่ไม่ได้แช่แข็งภายใน 6 ชั่วโมงหลังการเก็บ หรือ เป็น Fresh frozen plasma (FFP) ที่เก็บที่ -20°C นานกว่า 1 ปี ซึ่งทั้งสองแบบได้มีการเสียสมดุลของ coagulation factors V และ VIII นอกจากนี้ยังอาจแยก FP ได้จากโลหิตครบส่วนที่ถูกเก็บแช่เย็นนานกว่า 6 ชั่วโมง อาจใช้ FP ในลูกสุนัข หรือ ลูกแมว ที่มีภาวะ failure of passive transfer และใช้เป็นแหล่งอัลบูมิน ขนาดที่ใช้ คือ 6-10 มิลลิตรต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 1 กิโลกรัม โดยให้ 1 – 3 ครั้งต่อวัน ขนาดการให้ขึ้นอยู่กับสภาพสัตว์ (Ettinger and Feldman, 2005)

Cryoprecipitate

Cryoprecipitate เป็นแหล่งที่มีความเข้มข้นของ von Willebrand's factor (vWf), fibrinogen (factor I) (Ettinger and Feldman, 2005), fibronectin (Morrissey and Cotter, 2000) และ factor VIII ซึ่งเตรียมจาก FFP 1 ยูนิต โดย FFP จะถูกละลายที่ 4 องศาเซลเซียส (Ettinger and Feldman, 2005) ในระหว่างการละลายประมาณ 90% (Morrissey, 2000) cryoprecipitate ก็จะรวมตัวกันในพลาสมา ซึ่ง precipitate เหล่านี้ ประกอบด้วย vWf, factor VIII และ I แล้วแยก precipitate ออกจาก liquid plasma โดยการปั่นแยก liquid plasma ก็จะอยู่ในรูปของ cryo-poor plasma

Cryoprecipitate ใช้ในการรักษา von Willebrand's disease, hemophilia A, และ ภาวะการขาด fibrinogen การใช้ Cryoprecipitate คล้ายกับ FFP สามารถเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 ปี Cryoprecipitate จะเหมือนกับผลิตภัณฑ์พลาสมาทั่วไป ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ได้ 1 ยูนิต ของ Cryoprecipitate ได้จาก 1 ยูนิตของ FFP ขนาดที่ใช้ คือ 1 ยูนิตต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 10 กิโลกรัม (Ettinger and Feldman, 2005)

Cryo-poor plasma

เป็นพลาสมาที่ยังคงเหลือหลังจากนำเอา Cryoprecipitate ออก โดย cryo-poor plasma จะประกอบไปด้วย factor II , VII, IX, และ X ซึ่งจะใช้ในการรักษา rodenticide intoxication การเก็บและการใช้เหมือนกับ FFP และผลิตภัณฑ์พลาสมาอื่นๆ ไป ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ได้ ขนาดที่ใช้ คือ 1 ยูนิตต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 10 กิโลกรัม (Ettinger and Feldman, 2005)

Platelet-rich plasma (PRP)

เตรียมจากโลหิตครบส่วน โดยการปั่นแยกที่ความเร็วต่ำกว่าการเตรียม pRBC และพลาสมา เพื่อให้เกล็ดเลือด (platelet) ตกตะกอนในพลาสมา ซึ่งจะต้องให้ภายในไม่กี่ชั่วโมงหลังการเก็บ PRP ไม่ควรจะนำไปแช่เย็น ซึ่งจะทำให้เกล็ดเลือดไม่ทำงาน การให้เกล็ดเลือดจะมีประโยชน์มากที่สุดในการที่มีอาการลดการสร้างเกล็ดเลือด และจะได้ผลยากในการที่ร่างกายมีการเพิ่มอัตราการใช้เกล็ดเลือด หรือการสลายเกล็ดเลือด ซึ่งจะเป็นสาเหตุของ thrombocytopenia ในสุนัข การให้เกล็ดเลือดอาจมีการตอบสนองเกิดปฏิกิริยาการแพ้ หรือมีไข้ ขนาดที่ใช้ คือ 1 ยูนิตต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 10 กิโลกรัม (Ettinger and Feldman, 2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง

- 1.1 เฮพาริน (Heparin)
- 1.2 ถังเก็บเลือดมาตรฐานบรรจุสาร citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) ขนาด 350 มิลลิลิตร
- 1.3 กระบอกฉีดขนาด 10 มิลลิลิตร
- 1.4 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อุปกรณ์ในการทดลอง

- 2.1 หลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 2.2 หลอดแก้วทดลอง
- 2.3 Auto pipette ขนาด 20, 200, และ 1,000 ไมโครลิตร
- 2.4 Microcentrifuge tube
- 2.5 96 well plate
- 2.6 Eight multi-channel pipette
- 2.7 Microhematocrit capillary tube
- 2.8 เครื่อง Elisa reader
- 2.9 เครื่อง Spectrophotometer
- 2.10 เครื่อง Centrifuge ควบคุมอุณหภูมิ
- 2.11 Sorvall Centrifuge
- 2.12 Vortex mixer
- 2.13 Waterbath

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในวิธี Osmotic Fragility test (ดูภาคผนวก)

3.1.1 Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4

3.1.2 0.25% -0.75% Sodium chloride solution (NaCl)

3.2. สารเคมีที่ใช้ในการวัดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกโดยวิธี Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay (ดูภาคผนวก)

3.2.1 Sodium acetate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศ
สหรัฐอเมริกา

3.2.3 Hydrochloric acid (HCl)

3.2.4 Ferric chloride จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.5 Ferrous sulfate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3. สารเคมีวิเคราะห์ระบบกลูตาไธโอน (ดูภาคผนวก)

3.3.1 Metaphosphoric acid จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.2 Sodium phosphate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.3 Ethylenediaminetetraacetic acid-Na (EDTA-Na) จากบริษัท Sigma-Aldrich
ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.4 Oxidized glutathione (GSSG) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศ
สหรัฐอเมริกา

3.3.5 Triethanolamine จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.6 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) จากบริษัท Sigma-Aldrich
ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.7 NADPH จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.8 Glutathione reductase (GR) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศ
สหรัฐอเมริกา

3.3.9 2-vinylpyridine จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4 สารเคมีวิเคราะห์ Malondialdehyde (MDA) โดยวิธี Thiobarbituric Acid (TBA) assay (ดูภาคผนวก)

3.4.1 2-thiobarbituric acid (TBA) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.2 Trichloroacetic acid จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.3 Butylated hydroxytoluene (BHT) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.4 n-butanol จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.5 Pyridine จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.6 Hydrochloric acid (HCl)

3.4.7 Deionized water

3.5. สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนิลโปรตีน ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (ดูภาคผนวก)

3.5.1 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) จากบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

3.5.2 Trichloroacetic acid จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5.3 Ethanol จากบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

3.5.4 Ethyl acetate จากบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

3.5.5 Guanidine hydrochloride จากบริษัท Acros ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

สุนัขพันธุ์ โกลเด้น รีทรีฟเวอร์ (Golden Retriever) ที่มาบริจาคเลือด ณ ธนาคารเลือด โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน อายุระหว่าง 3-6 ปี คละเพศ น้ำหนักอยู่ในระหว่าง 30-36 กิโลกรัม จำนวน 7 ตัว จากแหล่งเลี้ยงเดียวกัน สภาพแวดล้อม และอาหารแบบเดียวกัน มาบริจาคเลือดให้หน่วยธนาคารเลือด โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เป็นประจำเมื่อจำเป็นต้องใช้เลือด มีประวัติการทำวัคซีนครบบริบูรณ์ปราศจากโรคติดต่อทางเลือด ไม่เคยได้รับการผ่าตัดใหญ่ ในระยะ 1 – 2 เดือน ไม่มีโรคประจำตัวที่ร้ายแรง ไม่มีเห็บหมัด หรือโรคผิวหนัง ทำการเจาะเก็บเลือดสุนัขตัวให้ (donors) แต่ละตัวจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณลำคอ (Jugular vein) ของสุนัขด้วยวิธีการที่ปลอดเชื้อ เข้าตรงสู่ถุงเก็บเลือดมาตรฐานที่มีสารรักษาสภาพเซลล์ Citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) อยู่ในปริมาตร 49 มิลลิลิตร รวมกับปริมาตรเลือดเป็น 350 มิลลิลิตรในถุงเลือด หลังจากผสมเข้ากันดีแล้วจึงทำการถ่ายเทเลือดปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากถุงใหญ่ผ่านท่อที่เชื่อมต่อกันด้วยระบบปิด ไปยังถุงเก็บเลือดมาตรฐานขนาดเล็กแล้วเก็บเลือดสุนัขในธนาคารเลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การวางแผนการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างเลือด 5 ระยะ

กำหนดสัญลักษณ์แทนด้วย C 0 14 28 และ 42 โดยในวันแรกของการเก็บเลือดจะแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ C เป็นเลือดที่เก็บจากสุนัขในสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดเฮปาริน (heparin) ที่ความเข้มข้น 5-10 ยูนิต ต่อ มิลลิลิตรเลือด เพื่อแสดงคุณภาพเลือดตามสภาพธรรมชาติจากร่างกายสัตว์ก่อนบรรจุลงในถุงเลือดมาตรฐานที่มีสาร CPDA และ 0 คือ เลือดที่เก็บจากสุนัขในวันแรกผสมด้วยสาร CPDA นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเลือดจะถูกเก็บในธนาคารเลือดสุนัข 14 คือ เลือดเก็บรักษาด้วยสาร CPDA นาน 14 วัน 28 คือ เลือดเก็บรักษาด้วยสาร CPDA นาน 28 วัน และ 42 คือ เลือดเก็บรักษาด้วยสาร CPDA นาน 42 วัน

2.2 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างโลหิตครบส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละช่วงเวลาในข้อ 2.1 จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ น้ำเลือดพลาสมา (plasma) และเซลล์เม็ดเลือดแดง

1. การเตรียมพลาสมา โดยการนำโลหิตครบส่วนมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1,300 g นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนใสด้านบน คือพลาสมา ใส่หลอดเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป

2. การเตรียมเม็ดเลือดแดง นำเลือดที่ถูกแยกพลาสมาจากข้อ 1 ไปล้างด้วย PBS (Phosphate buffer solution) pH 7.4 ปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดที่ 1,300 g นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใส และเซลล์เม็ดเลือดขาวพร้อมทั้งเกล็ดเลือดที่ผิวบนทิ้ง ทำการล้างเม็ดเลือดเช่นนี้ 2 ครั้ง จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. วิธีการศึกษา

การศึกษาสภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ทาง คือ

3.1 การศึกษาทางกายภาพ

3.1.1 Osmotic fragility test เป็นการเปรียบเทียบคุณสมบัติการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสุนัขในสารละลาย Hypotonic ของ NaCl ที่มีความเข้มข้นต่ำในระดับร้อยละ 0.25-0.75 ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ

เยื่อหุ้มเซลล์มีบทบาทสำคัญในการรักษาสภาวะภายในเซลล์ให้เหมาะสมต่อการดำรงชีพ และการทำหน้าที่ต่างๆ แม้เมื่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์แปรเปลี่ยนไป คุณสมบัติเคมี-ฟิสิกส์ขององค์ประกอบลิพิด-โปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์มีความสำคัญในการควบคุมอัตราและปริมาณการเคลื่อนเข้าออกของน้ำและสารต่างๆ ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ดังนั้นในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ และมีผลกระทบต่อคุณสมบัติความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์ จะส่งผลต่อการขนส่งสารต่างๆ เข้าออกเซลล์ได้ การใช้สารละลาย NaCl ที่ลำดับความเข้มข้นต่างกันจะเป็นการทดสอบความทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถ

เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงได้จากการคำนวณเป็นค่า MCF (Mean Corpuscular Fragility) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารละลาย NaCl ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในระดับ 50% (McGown *et al.*, 1983)

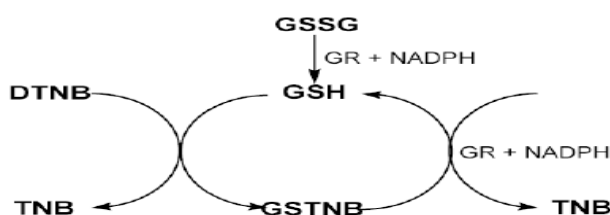
3.1.2 การวัดปริมาณอัดแน่นของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hematocrit) เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของเลือดสุนัข และใช้เปรียบเทียบความอยู่รอดของเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด

ใช้ microcapillary technique ในการดึงเลือดเข้าสู่หลอด capillary หลังจากดูดด้วยดินน้ำมันที่ปลายหลอดด้านหนึ่งแล้ว ทำการปั่นตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1,300 g นาน 15 นาที และอ่านค่าร้อยละของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเทียบกับปริมาตรเลือดทั้งหมดที่ดูดเข้ามาในหลอด capillary

3.2 การศึกษาทางเคมี

3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูตาไธโอนภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยวิธี Enzymatic Recycling Assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Tietze 1969)

หลักการวิเคราะห์กลูตาไธโอนโดยใช้เอนไซม์ กลูตาไธโอน รีดักเทส (Glutathione reductase) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูตาไธโอนใน microtiter plate assay โดยอาศัยหลักการดังนี้ หมู่ sulphhydryl ของกลูตาไธโอน จะทำปฏิกิริยากับ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) และให้สีเหลืองของ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ซึ่งจะวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร อัตราการเกิด TNB เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของกลูตาไธโอนในตัวอย่างในปฏิกิริยาย้อนกลับ ดังแสดงในภาพที่ 10

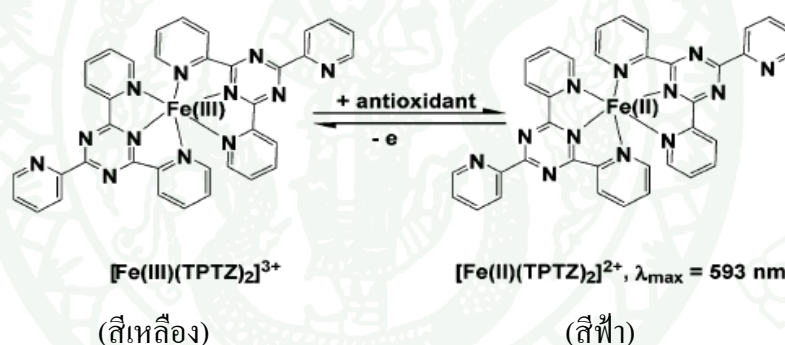


ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์กลูตาไธโอน (GSH) ด้วยวิธี enzymatic recycling method.

3.2.2 การวัดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ (Total antioxidant capacity: TAC) ในตัวอย่างพลาสมาโดยวิธี Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Benzie and Strain, 1996)

วิธี FRAP Assay ใช้หลักการที่สารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมาสามารถรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (ferric ion: Fe^{3+}) ได้เป็นเฟอร์รัสไอออน (ferrus ion: Fe^{2+}) ที่ pH ต่ำ โดยมีโมเลกุล tripyridyl-triazine (TPTZ) ในปฏิกิริยาจับกับเฟอร์รัสไอออน ทำให้เกิดสีฟ้า วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (ภาพที่ 11)

คำนวณความเข้มข้นได้จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่ทราบความเข้มข้น (0-3,000 ไมโครโมลต่อลิตร) และรายงานผลค่า TAC เป็นค่าไมโครโมลต่อลิตร (Benzie and Strain, 1996; Fernandez-Pachon *et al.*, 2005)



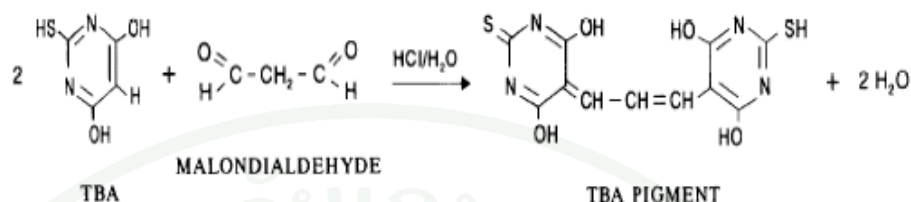
ภาพที่ 11 ปฏิกิริยาระหว่าง TPTZ กับ Fe^{2+}

ที่มา: Fernandez-Pachon *et al.* (2005)

3.2.3 การวิเคราะห์ระดับ Malondialdehyde (MDA) ในพลาสมาโดยวิธี Thiobarbituric acid (TBA) assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Sinnhuber และคณะ 1958)

MDA เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เมื่อทำปฏิกิริยากับ TBA เกิดเป็น Thiobarbituric acid reactive substate (TBARS) ให้สีชมพูแดง ซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง TBA 2 โมเลกุล กับ MDA 1 โมเลกุล (ภาพที่ 12) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

แสง 532 และ 572 นาโนเมตร เพื่อกำจัดปฏิกิริยารบกวนที่ไม่ใช่ MDA-TBA และรายงานผลค่า MDA เป็น นาโนโมลต่อมิลลิลิตรของพลาสมา



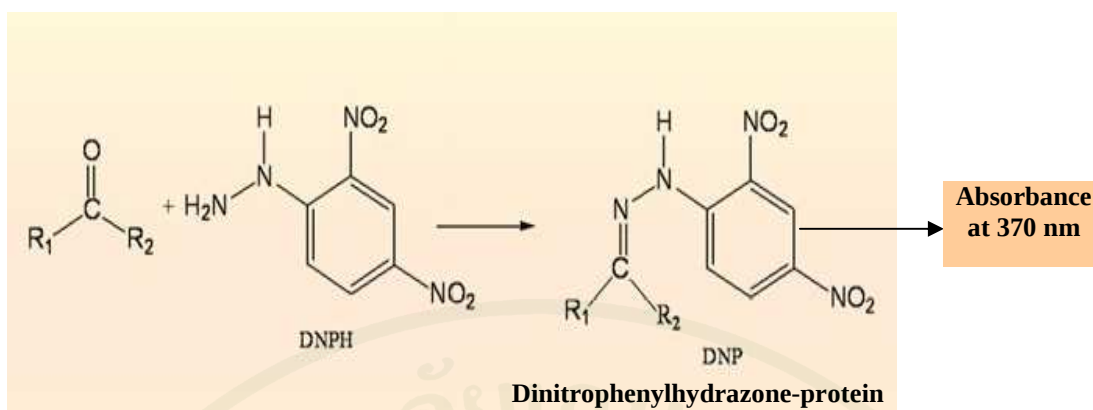
ภาพที่ 12 ปฏิกิริยาระหว่าง TBA และ MDA

ที่มา: Sinnhuber *et al.* (1958)

3.2.4 การหาปริมาณคาร์บอนิลโปรตีน (Protein carbonyl content) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยใช้วิธีของ Levine และคณะ (1990)

การเกิดออกซิเดชันของธาตุโลหะที่เกาะอยู่กับโปรตีน มีผลให้เกิดเป็นคาร์บอนิลโปรตีน พร้อมทั้งผลิต $\text{OH}^\cdot$ (Dukan *et al.*, 2000) คาร์บอนิลโปรตีนจึงเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนที่มีความสำคัญในการบ่งถึงการเกิดภาวะออกซิเดชันในตัวอย่างทางชีวภาพ ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้มาจากการเปลี่ยนแปลงแขนงข้างของกรดอะมิโนจำเพาะบางชนิดในโปรตีน เนื่องจากคาร์บอนิลโปรตีนเกิดขึ้นอย่างสมดุลโดยปฏิกิริยาเคมี จึงถูกใช้เป็นตัวชี้วัดสำคัญของภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อโปรตีน โดยส่วนใหญ่เป็นชนิด ROS (Donne *et al.*, 2003) อนุมูล $\text{OH}^\cdot$ ที่เกิดตามมาจะไปออกซิไดซ์โปรตีนข้างเคียงเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เกิดเป็นอนุมูลอิสระของกรดอะมิโน ทำให้โปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดความเสียหาย (Hawkins and Davies, 2001)

หลักการหาคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมาคือ การทำปฏิกิริยาระหว่าง 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) กับคาร์บอนิลโปรตีนเกิดการสร้าง Protein-hydrazone (ภาพที่ 13) ซึ่งสามารถตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (control) โดยแสดงค่าเป็น นาโนโมลต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 13 ปฏิกริยาระหว่าง DNPH กับคาร์บอนิลโปรตีน

ที่มา : Butterfield and Stadtman (1997)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Paired T-Test และวิธี Repeated Measures ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดย Duncan's Multiple-Comparison Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ โดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 16

ผลและวิจารณ์

1. ข้อมูลสุขภาพสุนัขที่ให้เลือด

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสุขภาพสุนัขพันธุ์ โกลเด้น รีทรีฟเวอร์ ทั้ง 7 ตัวที่เป็นผู้ให้เลือด (doner) ในการศึกษาครั้งนี้ สุนัขทุกตัวมีสุขภาพดี มีค่าเคมีโลหิต และค่าทางโลหิตวิทยาอยู่ในเกณฑ์ปกติ

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสุขภาพของสุนัขที่ใช้ในการศึกษา

สุนัข	เพศ	อายุ (ปี)	Hct (%)	BUN (mg%)	CREA (mg%)	ALT IU/L	TP gm%	ALB gm%
1	ผู้	6	37	11.5	0.9	32	6.4	2.8
2	เมีย	4	39	12.2	1.1	36	5.6	2.4
3	ผู้	3	37	11.1	1.2	29	6.9	3.2
4	ผู้	5	42	10.3	0.9	41	7.8	3.2
5	ผู้	6	38	10.9	1.0	30	8.5	3.1
6	ผู้	4	40	11.2	1.1	38	7.2	3.0
7	ผู้	3	37	12.3	1.0	59	6.8	2.6

ค่าปกติ: Hct (Hematocrit) 37-55 %

BUN (Blood urea nitrogen) 10-26 mg%

CREA (Creatinine) 0.5-1.3 mg%

ALT (Alanine aminotransferase) 6-70 IU/L

TP (Total protein) 5.3-7.8 gm%

ALB (Albumin) 2.3-3.2 gm%

2. ผลของการเก็บรักษาเลือดต่อระดับความเข้มข้นของกลูตาไธโอนภายในเซลล์

เซลล์เม็ดเลือดแดงมีระบบการป้องกันซึ่งจะถูกกระตุ้นเมื่อเซลล์ได้รับอันตรายที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์ ภายในเซลล์จะมีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ เพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ และเพื่อต้านทานความรุนแรงที่จะเกิดขึ้น กลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่สำคัญในการป้องกันความเสียหายของเซลล์ ความเข้มข้นของกลูตาไธโอนระดับสูงภายในเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันหรือกำจัดอนุมูลอิสระหลายชนิด (Meister, 1992) การเพิ่มของอนุมูลอิสระภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงจำเป็นต้องใช้กลูตาไธโอนในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระเพื่อเปลี่ยนความรุนแรงของ H_2O_2 ไปเป็น H_2O และ O_2 (Gaetani *et al.*, 1994) อีกทั้งยังช่วยรักษาหมู่ไทออล (Thiol groups) ของโปรตีนไว้ในรูปรีดิวซ์ (reduced state) ในสภาวะปกติเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมี NADPH และกลูตาไธโอนอย่างเพียงพอเพื่อป้องกันอันตรายต่อเม็ดเลือดแดง (Ozben, 1998) ในภาวะเครียดที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมากเกินไป อาจมีผลทำให้โครงสร้างของโมเลกุลฮีโมโกลบินเปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะเดิม (denatured) เกิดมี Heinz body หรือ accentrocyte ปฏิกิริยาออกซิเดชันของธาตุเหล็กยังส่งผลเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ให้เป็นเมตฮีโมโกลบิน (methemoglobin) ซึ่งจะขัดขวางการขนส่งออกซิเจน นอกจากนี้ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ระดับไขมันและโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ ยังทำให้เกิดการสูญเสียรูปร่างของเซลล์ ผลเหล่านี้ก็จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเสียหาย และมีการปลดปล่อยฮีโมโกลบินออกนอกเซลล์ แล้วเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงตามมา (Duncan *et al.*, 1994)

จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของกลูตาไธโอนในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เก็บรักษาในสารรักษาสภาพเซลล์ (CPDA) นาน 3 ชั่วโมง (0) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 3) เมื่อเทียบกับ กลูตาไธโอนในเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนใส่ในถุงเลือด (C) ความเข้มข้นของกลูตาไธโอนที่ลดลงแสดงถึงประสิทธิภาพในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ที่ลดลงเช่นกัน อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมของเซลล์ที่เปลี่ยนไป มีผลต่อการปรับตัวเพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ในการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาเลือดใน 3 ชั่วโมงแรก และเมื่อเก็บรักษาเลือดนานถึง 14 วัน ความเข้มข้นของกลูตาไธโอนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับ 0 (ตารางที่ 4) และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง สอดคล้องกับการทดลองในคน (Jozwiz *et al.*, 1997; Marjani, 2006; Dumaswala *et al.*, 1999) แต่หลังจากวันที่ 14 การลดลงไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ความเข้มข้นของกลูตาไธโอนในเม็ดเลือดที่ลดลงระหว่างการเก็บรักษาเลือดบ่งชี้ถึงการลดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากกลูตาไธโอนไม่เพียงพอต่อการป้องกันออกซิเดชันภายในเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด จึงมีผลต่อการลดการทำงานของ

กลูตาไธโอนรีดักเทส (Glutathione reductase) และประสิทธิภาพของ Pentose Phosphate Pathway ลดลง (Jozwiz *et al.*, 1997) และเมื่อพิจารณาถึงการเพิ่มขึ้นของ MDA (ตารางที่ 8) ในทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนิลโปรตีน (ตารางที่ 10) ซึ่งบ่งบอกถึงความเสียหายของโมเลกุลไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีนในสภาพแวดล้อมของเซลล์และในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงตามลำดับ สามารถยืนยันถึงความเสียหายที่รุนแรงเกินขีดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระนำไปสู่ความล้มเหลวของระบบต้านภาวะออกซิเดชันภายในเซลล์ ภาวะเสียสมดุลในการป้องกันอันตราย เป็นจุดเริ่มต้นของภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในเซลล์

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของกลูตาไธโอน (Glutathione concentration) ในเม็ดเลือดแดงก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Control/Test	GSH ($\mu\text{mol/ml}$)
C	0.70 ± 0.05^a
0	0.49 ± 0.06^b

ตัวเลขแสดงค่า mean $\pm$ SEM, n = 7

^{a,b} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นของกลูตาไธโอน (Glutathione concentration) ในเม็ดเลือดแดงในระหว่างการเก็บรักษาเลือดในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Duration (days)	GSH ($\mu\text{mol/ml}$)
0	0.49 ± 0.06^b
14	0.40 ± 0.06^c
28	0.36 ± 0.06^c
42	0.34 ± 0.05^c

ตัวเลขแสดงค่า mean $\pm$ SEM, n = 7

^{a,b,c} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

3. ผลของการเก็บรักษาเลือดต่อความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Total antioxidant capacity)

เซลล์เม็ดเลือดแดงจะสัมผัสกับอนุมูลอิสระทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบการป้องกันที่จะต้านภาวะออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Ozben, 1998) สารต้านอนุมูลอิสระจะทำงานมากขึ้นเมื่อตกอยู่ในภาวะเครียดเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (TAC) บอกระดับความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา ซึ่งช่วยในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้งที่เกิดขึ้นกับเซลล์ และโปรตีนในพลาสมา จากผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าค่า TAC ของเลือดที่เก็บรักษาเลือดที่ 3 ชั่วโมงในสาร CPDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับเลือดที่เก็บก่อนใส่ในถุงเลือด แสดงถึงการเก็บรักษาเลือดนาน 3 ชั่วโมงในสาร CPDA มีผลต่อการเพิ่มการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระในการรักษาสมดุลของเซลล์ เพื่อให้เซลล์สามารถดำรงชีพในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ผลต่อการทำงานของเม็ดเลือดแดงในช่วงเริ่มต้นของการเก็บเลือดนี้สอดคล้องกับการทดลองในคน (Marjani, 2006) โดยการทดลองดังกล่าวเกิดจากการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์ เพื่อรักษาภาวะสมดุลการทำงานของเซลล์ และโปรตีนในพลาสมาให้ดำเนินได้ตามปกติ แต่เมื่อเก็บรักษานาน 14 28 และ 42 วัน ค่า TAC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 6) อาจเป็นไปได้ว่าในระหว่างการเก็บรักษาในวันที่ 14 ถึง 42 มีการเคลื่อนออกของสารต้านอนุมูลอิสระจากภายในเซลล์ ออกสู่นอกเซลล์ เพื่อปรับระดับระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ และเมื่อเซลล์ได้รับความเสียหายจากอนุมูลอิสระเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ จึงนำไปสู่การแตกของเซลล์ ซึ่งพิจารณาได้จากการเพิ่มขึ้นของ MDA (ตารางที่ 8) ที่บ่งถึงมีการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงอย่างต่อเนื่อง ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด นำไปสู่การเพิ่มความเปราะบางของเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังแสดงด้วยค่า MCF ในตารางที่ 12 และการลดลงของปริมาตรอัดแน่นของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hct) ในตารางที่ 14 จากการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจสันนิษฐานได้ว่ามีการเคลื่อนออกของสารต้านอนุมูลอิสระจากภายในเซลล์ จึงทำให้ค่า TAC เพิ่มขึ้นในตัวอย่างพลาสมา ในขณะที่ความอยู่รอดของเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลงเป็นลำดับ

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity: TAC)) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Control/Test	TAC ($\mu\text{mol/l}$)
C	515.91 $\pm$ 36.66 ^a
0	306.04 $\pm$ 42.88 ^b

ตัวเลขแสดงค่า mean $\pm$ SEM, n =7

^{a,b} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 6 ค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity: TAC) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือดในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Duration (days)	TAC ($\mu\text{mol/l}$)
0	306.04 $\pm$ 42.88 ^a
14	370.65 $\pm$ 35.31 ^b
28	465.43 $\pm$ 31.47 ^c
42	528.80 $\pm$ 29.30 ^d

ตัวเลขแสดงค่า mean $\pm$ SEM, n =7

^{a,b,c,d} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

4. ผลของการเก็บรักษาเลือดต่อเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation)

จากผลข้างต้นที่แสดงถึงการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระ มีผลต่อการเพิ่มการทำลายสารชีวโมเลกุล ที่สำคัญ โดยอนุมูลอิสระที่เพิ่มในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระลดลงโดยไม่มีการสร้างเพิ่มเติมในเซลล์เม็ดเลือดแดง จะเป็นสาเหตุให้เกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันในโมเลกุลฟอสโฟลิปิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ ระดับของ MDA ในพลาสมา คือ ผลผลิตที่ถูกสลายจากปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยการทำลาย Polyunsaturated fatty acid ของเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นก็จะปลดปล่อยผลผลิตสุดท้ายของเปอร์ออกซิเดชัน ชนิด MDA ออกสู่พลาสมา ดังนั้น MDA จึงเป็นตัวชี้วัดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันที่สำคัญที่สุด (Boaz. *et al.*, 1999; Fiorillo *et al.*, 1998; Niki *et*

al., 1988) และเป็นสาเหตุหลักของความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง ซึ่งนำไปสู่การแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) (Knight *et al.*, 1992; Chiu *et al.*, 1989; Jain, 1988)

ผลการทดลองพบว่า ระดับของ MDA ในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในเลือดที่เก็บรักษานาน 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับเลือดที่เก็บก่อนใส่ในถุงเลือด (ตารางที่ 7) แสดงถึงมีการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในช่วงต้นของการเก็บรักษาเลือด และเมื่อเก็บรักษาเลือดนานถึง 14 28 และ 42 วัน ระดับ MDA ในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 8) กล่าวได้ว่าในระหว่างการเก็บรักษาเลือดมีเปอร์ออกซิเดชันของไขมันอย่างชัดเจนสอดคล้องกับการศึกษาในคน (Marjani, 2006; Korgun *et al.*, 2001; Jozwik *et al.*, 1997; Gultekin *et al.*, 2000; Dumaswala *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 1989; Knight *et al.*, 1992; Jain, 1988; Wong *et al.*, 1987; Aslan *et al.*, 1997; Racek *et al.*, 1997) ผลการทดลองนี้แสดงถึงการทำลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์อย่างชัดเจน และการเพิ่มของคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมา (ตารางที่ 9) แสดงถึงการสร้างอนุมูลอิสระที่เกิดจากโปรตีนซึ่งมีส่วนสำคัญในการเพิ่มการทำลายสารชีวโมเลกุลไขมันของเซลล์ นำไปสู่ความเสียหายต่อโครงสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เป็นไขมันอีกทางหนึ่ง จากการเพิ่มทั้ง MDA และคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมาแสดงถึงแนวโน้มความเสียหายที่อาจจะทวีความรุนแรงไปสู่การแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในที่สุด

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของ Malondialdehyde (MDA)) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Control/Test	MDA (nmol/ml)
C	1.36±0.11 ^a
0	1.84±0.12 ^b

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

^{a,b} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 8 ค่าความเข้มข้นของ Malondialdehyde (MDA) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด

Duration (days)	MDA (nmol/ml)
0	1.84±0.12 ^a
14	2.32±0.16 ^b
28	3.04±0.20 ^c
42	3.77±0.21 ^d

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

^{a,b,c,d} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

5. ผลของการเก็บรักษาเลือดต่อออกซิเดชันของโปรตีนในพลาสมา

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน (Grune *et al.*, 1997) จากการศึกษาพบว่า การสลายโปรตีน (Davies *et al.*, 1987; Stadtman, 1993; Wolff *et al.*, 1986) จะเพิ่มขึ้นหลังจากมีการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Davies and Goldberg, 1987) อนุมูลอิสระมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์โดยตรง โดยอนุมูลอิสระจะไปออกซิไดซ์แขนงข้างของกรดอะมิโน และแกนโครงสร้างของโปรตีน (protein backbone) ซึ่งจะนำไปสู่ protein-protein cross-link และการแยกออกเป็นส่วนของโปรตีน จะมีผลต่อเนื่องทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าว

หมู่คาร์บอนิลจากโมเลกุลของโปรตีนในพลาสมา (plasma protein carbonyl groups) จะเกิดบนแขนงข้างของกรดอะมิโนของโปรตีน (Grune *et al.*, 1997) เมื่อมี metal ions ได้แก่ Fe^{2+} เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญ โดยไปจับกับตำแหน่ง cation binding site ในโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ในพลาสมา หรือที่เชื่อมเซลล์ จากนั้น H_2O_2 จะมีผลในการเปลี่ยนแขนงข้าง (side chains) ของกรดอะมิโนไปเป็นหมู่คาร์บอนิล (aldehydes และ ketones) ซึ่งทั้ง Fe^{2+} และ H_2O_2 ล้วนเกี่ยวข้องกับการสร้าง $OH^{\cdot}$ (ตามสมการของ Fenton reaction) (Stadtman, 1990; Moskovitz *et al.*, 2002) ซึ่งมีพลังในการทำลายสารชีวโมเลกุลสูง นำไปสู่การทำลายเชื่อมเซลล์ในบริเวณใกล้เคียง ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ protein carbonyl ในพลาสมาที่ถูกเก็บรักษาแสดงให้เห็นถึงการเกิดความเสียหายเนื่องจากอนุมูลอิสระ (Grune *et al.*, 1997; Stadtman, 1993)

ผลการทดลองพบว่าคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในการเก็บรักษาเลือดนาน 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับเลือดที่เก็บก่อนใส่ในถุงเลือด (ตารางที่ 9) ซึ่งบ่งบอกถึงความเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในพลาสมาที่ง่ายต่อการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหาย เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงด้านภาวะแวดล้อม นำไปสู่การเพิ่มปฏิกิริยาออกซิเดชัน เกิดการทำลายโปรตีนที่สำคัญ ซึ่งอาจเป็นจุดเริ่มต้นของความเสียหายในระหว่างการเก็บรักษาเลือด และนำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระที่มีความรุนแรงชนิด $OH^{\cdot}$ ในระบบตามมา มีลักษณะเป็นวงจรการเพิ่มปริมาณคาร์บอนิลโปรตีนและอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง เมื่อเก็บเลือดนานถึง 14 28 และ 42 วัน (ตารางที่ 10) ซึ่งมีผลทำลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นไขมัน และโปรตีน อันเป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่ในพลาสมา อย่างเช่นเซลล์เม็ดเลือดแดง เพิ่มความเสี่ยงต่อการถูกทำลาย จากการศึกษาในคนพบว่าภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมีผลโดยตรงในการทำลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ และมีส่วนทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง (Dumaswala *et al.*, 1996; Dumaswala *et al.*, 1997; Jarolim *et al.*, 1990; Kriebardis *et al.*, 2006)

การเพิ่มขึ้นของคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมา ซึ่งแสดงถึงการเพิ่มการเกิดอนุมูลอิสระ $HO^{\cdot}$ จากคาร์บอนิลโปรตีน ก็จะนำไปสู่การทำลายเชื้อหุ้มเซลล์ของเซลล์ทุกชนิดในเลือด เซลล์เม็ดเลือดขาวมักเกิดอนุมูลอิสระชนิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Curnutte and Babior, 1987) จากบทบาทการทำงานทางภูมิคุ้มกัน แต่เนื่องจากมีปริมาณเซลล์น้อย จึงไม่มีผลกระทบในการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อยู่ข้างเคียงได้มากนัก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมาจึงเป็นดัชนีที่สำคัญในการศึกษาผลของอนุมูลอิสระต่อโครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากผลการทดลองแสดงว่าความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมีผลต่อโปรตีนของเชื้อหุ้มเซลล์และโปรตีนที่อยู่ในสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจจะส่งผลต่อเซลล์ทั้งทางตรงและทางอ้อมตามลำดับ ซึ่งผลจากการทำลายโปรตีนที่สำคัญจากทั้งสองแหล่งก็จะนำไปสู่การเพิ่มอันตรายให้กับเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงสูญเสียการทำงาน และเซลล์ถูกทำลายในที่สุด

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของคาร์บอนิลโปรตีน ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Control/Test	Carbonyl proteins (nmol/ml)
C	6.95±0.82 ^a
0	9.49±0.88 ^b

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

^{a,b} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 10 ค่าความเข้มข้นของคาร์บอนิลโปรตีน ในระหว่างการเก็บรักษาเลือดที่มีสาร CPDA

Duration (days)	Carbonyl proteins (nmol/ml)
0	9.49± 0.88 ^a
14	12.77±1.06 ^b
28	18.65±1.37 ^c
42	20.97±1.30 ^d

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

^{a,b,c,d} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

6. ผลของการเก็บรักษาเลือดต่อความเปราะ และปริมาตรอัดแน่นของเม็ดเลือดแดง

จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นถึงปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาเลือด โดยมีสาเหตุหลักมาจากอนุภาคลิขระที่เพิ่มขึ้น เป็นผลให้ระบบป้องกันของเซลล์เสื่อมสภาพลง และเกิดการทำลายโมเลกุลโครงสร้างของเซลล์ นำไปสู่การทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญของเซลล์ มีผลทำให้เซลล์สูญเสียการทำงาน สูญเสียรูปร่าง และสุดท้ายเซลล์ก็จะถูกทำลาย ดังนั้น ค่าความเปราะและแตกง่ายของเซลล์ (MFC) สามารถบอกถึงความเสียหายทางกายภาพที่สะท้อนถึงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากการออกซิเดชันของกรดอะมิโน เกิดผลต่อเนื่องจนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลไขมัน และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลต่อการลดการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารระหว่างภายในและนอกเซลล์ ตลอดจนลดความยืดหยุ่นของเยื่อหุ้มเซลล์ และการ

สูญเสียคุณสมบัติแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง (Clarke, 1985; Pfafferot *et al.*, 1982; Jain *et al.*, 1983; Hochstein and Jain., 1981) ในระหว่างการเก็บรักษาเม็ดเลือดมีผลต่อการเพิ่มปฏิกิริยาออกซิเดชันนำไปสู่การลดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ในระบบการเก็บรักษาเลือดมีปริมาณอนุมูลอิสระสูง ถึงแม้จะเป็นปฏิกิริยาที่ช้าแต่ก็มีความไวพอที่จะสร้างความเสียหายต่อเม็ดเลือดแดง จนนำไปสู่การแตกของเม็ดเลือดแดงในที่สุด (Jozwiz *et al.*, 1997)

ผลการทดลองพบว่า ค่า MCF เพิ่มขึ้นในเลือดที่เก็บในสาร CPDA นาน 3 ชั่วโมงอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเลือดที่เก็บก่อนใส่ในถุงเลือด (ตารางที่ 11) สอดคล้องกับการลดลงของค่า Hct เพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 13) ซึ่งอาจเกิดจากการเจือจางของเลือดลงร้อยละ 14.28 ด้วยสาร CPDA เมื่อใส่เลือดในถุง นอกจากนี้ยังแสดงว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันใน 3 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาเลือดยังไม่มีผลต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงมากนัก

เมื่อเก็บรักษาเลือดนานถึง 14 วัน ค่า MCF ก็ยังคงเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12) และเมื่อพิจารณาผลของค่า Hct ที่ 14 วัน (ตารางที่ 14) แสดงถึงความอยู่รอดของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยรวมในสาร CPDA ใน 14 วันแรกของการเก็บรักษาไม่มีผลต่อเซลล์มากนัก แต่เมื่อเก็บรักษาเลือดนานถึงวันที่ 28 และ 42 ค่า MCF เพิ่มขึ้น พร้อมทั้ง Hct ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่อดูในภาพที่ 14 ก็จะเห็นเปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดงที่ 50% เข้าใกล้ความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นไอโซโทนิก (isotonic solution) แสดงถึงภาวะการเพิ่มความเปราะของเม็ดเลือดแดงเมื่อเก็บเป็นเวลานาน 28 ถึง 42 วัน อาจจะมีผลต่อความอยู่รอดของเม็ดเลือดแดงเนื่องจากการศึกษาถึงการทำลายโมเลกุลลิปิดและโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงในระหว่างการเก็บรักษาเลือด (Dumaswala *et al.*, 1996; Dumaswala *et al.*, 1997; Jarolim *et al.*, 1990; Kriebardis *et al.*, 2006;) ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การเพิ่มขึ้นของคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมาบ่งถึงความเสียหายของโปรตีนที่มีส่วนในการเพิ่มการผลิตสารอนุมูลอิสระเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นไขมัน และโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดแดง การร่วมทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ ยิ่งทวีความรุนแรงเป็นผลให้เซลล์ สูญเสียหน้าที่ และการทำงาน นำไปสู่การเพิ่มการแตกของเซลล์ตามมา (Knight *et al.*, 1992; Chiu *et al.*, 1989; Jain, 1988)

จากผลการทดลองดังกล่าวยืนยันได้ว่า ความเปราะที่เพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดแดงเกิดควบคู่กับการเพิ่มความเข้มข้นของ MDA (ตารางที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในคน (Chiu *et al.*, 1989; Knight *et al.*, 1992; Jain, 1988 and Wong *et al.*, 1987) และการเพิ่มของ TAC ในพลาสมาเนื่องจากการเคลื่อนออกของสารต้านอนุมูลอิสระจากภายในเซลล์ อันเป็นผลจากการสูญเสียคุณสมบัติปกติ

ของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง และมีการแตกเพิ่มขึ้นตามความเปราะของเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มขึ้น การเกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical) จากการออกซิไดซ์ฮีโมโกลบิน (Carrel *et al.*, 1975) ยังเพิ่มอัตราการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ และส่งผลต่อการขนส่งออกซิเจน (Chiu *et al.*, 1989; Tsuda *et al.*, 1972; Desforjes and Slawski, 1972; Fagiolo *et al.*, 1986) โปรตีนในพลาสมายังเป็นสาเหตุที่สำคัญในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและส่งผลต่อการแตกของเซลล์ เนื่องจากมีการเพิ่มปริมาณคาร์บอนิลโปรตีน (ตารางที่ 10) ที่แสดงถึงการเพิ่มออกซิเดชันของโปรตีนในพลาสมา โดยอาจมีผลมาจากการเกิด $\text{OH}^{\cdot}$ ที่มีความรุนแรงในการทำลายสารชีวโมเลกุลของเซลล์ข้างเคียง ซึ่งเป็นแนวร่วมที่สำคัญในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบค่าความเปราะของเม็ดเลือดแดง (Mean Corpuscular Fragility, MCF) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Control/Test	MCF (%)
C	0.3779±0.01 ^a
0	0.3910±0.01 ^a

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

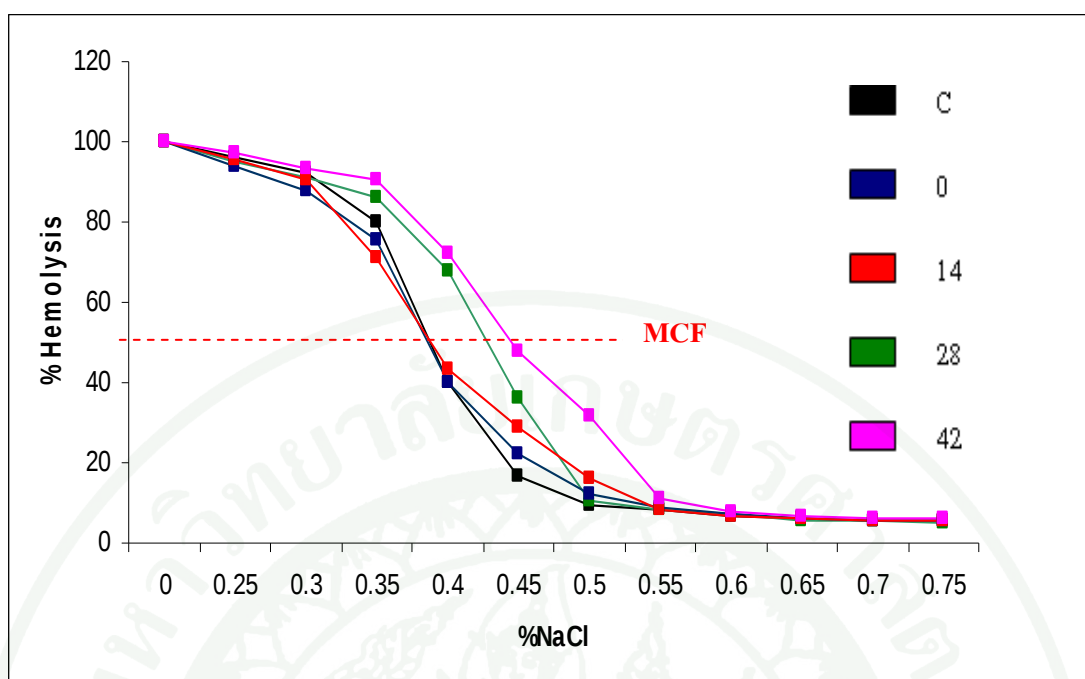
^a แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 12 ค่าความเปราะของเม็ดเลือดแดง (Mean Corpuscular Fragility; MCF) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือดที่มีสาร CPDA

Duration (days)	MCF (%)
0	0.3910±0.01 ^a
14	0.4026±0.01 ^a
28	0.4588±0.01 ^b
42	0.4718±0.01 ^b

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

^{a,b} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน



ภาพที่ 14 กราฟแสดงค่า % Hemolysis ของเลือดก่อนเข้าถุงเลือด (C) หลังเข้าถุงเลือดนาน 3 ชั่วโมง (0) 14 28 และ 42 ตามลำดับ

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบค่าปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit; Hct) ก่อน และหลังใส่ในถุงเลือดที่มีสาร CPDA

Control/Test	Hct (%)
C	38.29±0.84 ^a
0	38.00±0.82 ^a

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

^a แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 14 ค่าปริมาตรเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit; Hct) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือดที่มีสาร CPDA

Duration (days)	Hct (%)
0	38.00±0.82 ^a
14	37.21±0.72 ^a
28	33.43±0.37 ^b
42	31.00±0.77 ^c

ตัวเลขแสดงค่า mean±SEM, n =7

^{a,b,c} แสดงนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์เดียวกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ปริมาณ MDA และคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมา ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และการลดลงของระดับกลูตาไธโอนในเซลล์เม็ดเลือดแดง และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของระดับ TAC ในพลาสมาในวันที่ 14 ถึง 42 บ่งว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงของสุนัขที่เก็บรักษาในสารรักษาสภาพของเซลล์ CPDA มีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แม้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการใช้กลูตาไธโอนร่วมด้วยในการทำงานของระบบป้องกันออกซิเดชันภายในเซลล์

2. การเกิดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลลดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา (TAC) ในเลือดที่เก็บรักษาด้วยสาร CPDA ที่ 3 ชั่วโมง แสดงถึงการลดการทำงานของระบบป้องกันออกซิเดชันภายนอกเซลล์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของเซลล์ นำไปสู่การปรับตัวของเซลล์ในช่วงต้นของการเก็บรักษาเลือด ต่อเมื่อเม็ดเลือดแดงสูญเสียคุณสมบัติของโครงสร้างและการทำงานมากขึ้น ระดับของ TAC ในพลาสมาจึงเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 14 28 และ 42 อันอาจมีผลมาจากความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มขึ้นจนนำไปสู่การแตกของเม็ดเลือดแดง และมีสารต้านอนุมูลอิสระเคลื่อนออกสู่พลาสมาในระหว่างการเก็บรักษาเลือด

3. ภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันส่งผลเพิ่ม lipid peroxidation ของเยื่อหุ้มเซลล์ (ปริมาณ MDA) และกระทบต่อความอยู่รอดของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยเพิ่มความเปราะบางของเม็ดเลือดแดง (ค่า MCF) จนนำไปสู่การแตกเพิ่มขึ้น (ค่า Hct) เมื่อเก็บรักษาเลือดนานถึง 28 และ 42 วัน มีผลเพิ่มการเคลื่อนออกของสารต้านอนุมูลอิสระสู่พลาสมา (TAC) ในระหว่างการเก็บรักษาเลือด ในวันที่ 14 28 และ 42

4. ในระหว่างการเก็บรักษาเลือดมีเปอร์ออกซิเดชันของโมเลกุลไขมันที่เป็นโครงสร้างของเซลล์เม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจน (การเพิ่มของ MDA) แต่จะมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงชัดเจนที่สุดในวันที่ 28 และ 42 เมื่อพิจารณาการเพิ่มของ MCF และการลดของ Hct

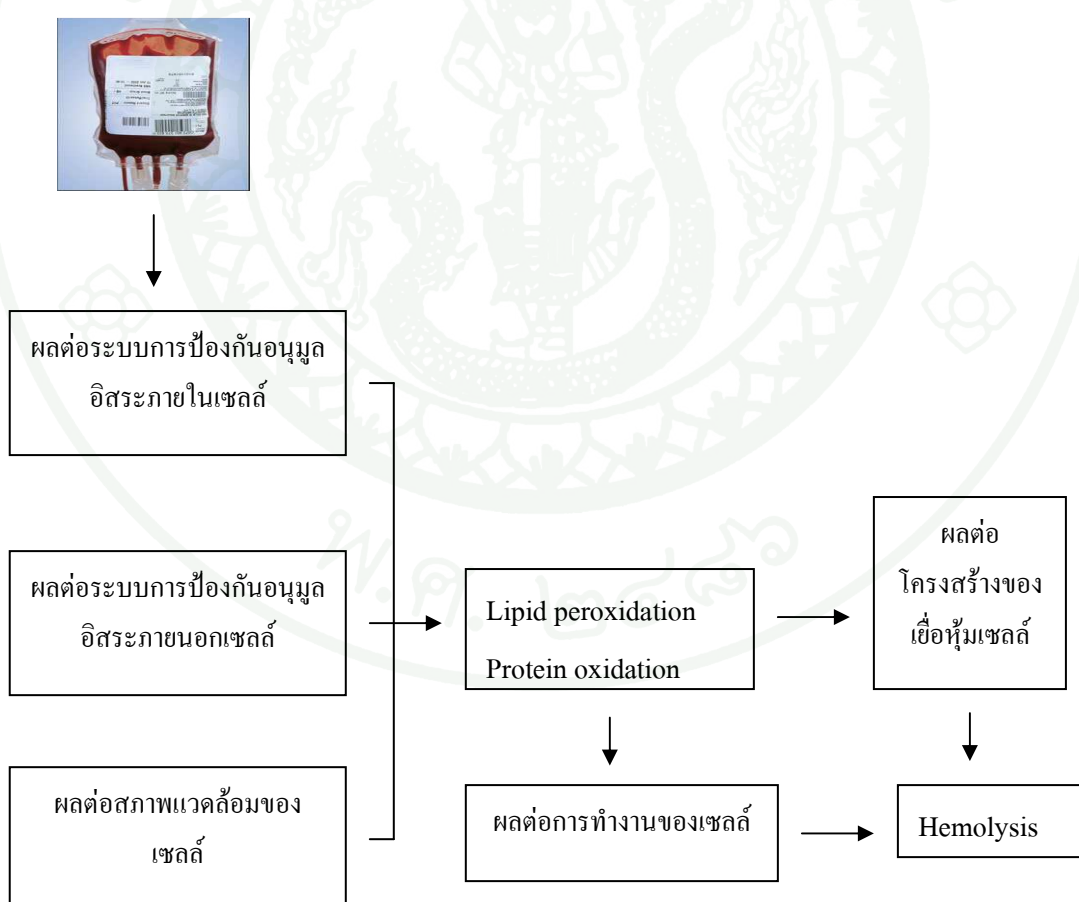
5. ปริมาณคาร์บอนิลโปรตีนในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บรักษาเลือด แสดงถึงออกซิเดชันของโปรตีนในพลาสมาและเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งบ่งถึงความไม่เหมาะสมของ

สภาพแวดล้อมของเซลล์เม็ดเลือดแดงในระหว่างการเก็บรักษา ที่มีความเสี่ยงต่อการเพิ่มการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง

6. จากผลการทดลองสามารถประเมินได้ว่า การเก็บรักษาเลือดด้วยสาร CPDA นานถึง 28 วันอาจไม่ให้ประสิทธิผลดีในการใช้ถ่ายเลือดให้แก่สุนัขป่วย

7. จากผลการทดลองที่เกิดขึ้นแสดงถึงการเกิดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษาเลือดสุนัข โดยพิจารณาจากดัชนีชี้วัดที่สำคัญ ซึ่งผลจากภาวะดังกล่าวนำไปสู่การเสื่อมของระบบป้องกันอนุมูลอิสระ เกิดการทำลายโครงสร้างของเซลล์ และเซลล์ถูกทำลายในที่สุดดังแสดงในภาพ ที่ 15

ระยะเวลาการเก็บรักษาเลือด



ภาพที่ 15 แสดงกลไกการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงในระหว่างการเก็บรักษาเลือด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาถึงการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารให้พลังงานอื่นๆ เข้าไปในถุงเลือดมาตรฐาน (Maeda et al., 1992; Lindeman et al., 1992) เพื่อเพิ่มความสามารถในการต้านการทำลายของอนุมูลอิสระ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดแดงหลังการถ่ายเลือดให้สุนัขป่วย อีกทั้งยังช่วยเพิ่มคุณภาพเลือดให้กับเลือดที่เก็บเป็นเวลานานขึ้นด้วย
2. ควรมีการศึกษาถึงการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดแดงหลังจากถ่ายเลือดให้กับสุนัขตัวรับ หลังจากการให้เลือดกับสุนัขป่วย เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพของเลือดที่ถูกเก็บรักษาในแต่ละช่วงเวลา
3. การใช้เลือดที่เก็บรักษานานถึง 28 วันอาจไม่ให้อะสิทธิภาพในการรักษาสุนัขป่วย
4. ควรมีการศึกษาผลของภาวะเครียดต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพ และคุณภาพของเลือด ตลอดจนการเพิ่มข้อมูลที่เป็นมาตรฐานในการเก็บรักษาเลือดสุนัข เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ผลิตภัณฑ์เลือดอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เนลิขว ศาลากิจ. 2548. ตำราโลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม
การเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

พิมล เชี่ยวศิลป์. 2526. การให้เลือด. โรงพิมพ์ พิมพ์, กรุงเทพฯ.

Amici, A., R. L. Levine, L. Tsai, and E. R. Stadtman. 1989. Conversion of amino acid residues in
proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal - catalyzed
oxidation reactions. **J. Biol. Chem.** 264:3341-3346.

Anderson, M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chem. Biol.
Interact.** 2: 1–14.

Aslan, R., M.R. Sekeroglu, M. Tarakcioglu and H. Koylu. 1997. Investigation of
malondialdehyde
formation and antioxidant enzyme activity in stored blood. **Haematology.** 28: 233-237.

Atkinson, D.E. 1949. The energy charge of adenylate pool as a regulatory parameter: Interactions
with feedback modifiers. **Biochemistry.** 7: 4030-4034.

Audet, A.M. and , L.T. Goodnough. 1992. Practice strategies for elective red blood cell
transfusion. **Ann Intern Med.** 116:403.

Authement, J.M., K.J. Wolfsheimer and S. Catchings. 1987. Canine blood component therapy:
product preparation, storage, and administration. **J Amer Anim Hosp Assoc.**
23:483-493.

Baggot, J.D. 1992. Clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. **Clinical
Pharmacokinetics.** 18:254–273.

- Bahorun, T., M.A. Soobrattee, V. Luximon-Ramma and O.I. Aruoma. 2006. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. **IJMU**. 1(2): 1-20.
- Bailey, D.N. and Bove, J.R. 1975. Chemical and hematological changes in stored CPD blood. **Transfusion**. 15: 244-249.
- Banerjee, R. and F. Stetzkowski. 1970. Heme transfer from hemoglobin and ferrihemoglobin to some new ligands and its implication in the mechanism of oxidation of ferrohemoglobin by air. **Biophys. Acta**. 221: 636-9.
- Bannai, S., H.N. Christensen, J.V. Vadgama, J.C. Ellory, E. Englesberg and G.G. Guidotti. 1984. Amino acid transport systems. **Nature**. 311: 308.
- Beckman, K.B. and B.N. Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.** 78: 547-581.
- Benzie, I.F. and J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power : The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**. 239: 70-76.
- Boaz, M., Z. Matas and , A. Biro. 1999. Comparison of hemostatic factors and serum malondialdehyde as predictive factors of cardiovascular disease in hemodialysis patients. **Am. J. Kidney Dis**. 34: 438-444.
- Bohnstedt, K.C. 2005. Determination of biomarkers for lipid peroxidation and oxidative stress. **Doctoral thesis**. 91.
- Brown, W.D. and L.B. Mebine. 1969. Autoxidation of myoglobin by oxygen. **Biochem. J**. 244: 6696-701.

- Burney, S., J.C. Niles, P.C. Dedon and S.R. Tannenbaum. 1999. DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.** 12: 513-520.
- Butterfield, D.A. 1996. **Biofunctional Membranes**. Plenum Press, New York.
- Butterfield, D.A. and E.R. Stadtman. 1997. Protein oxidation processes in aging brain. **Adv. Cell Aging Gerontol.** 2: 161-191.
- Buttke, T.M. and P.A. Sandstorm. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunology Today.** 15: 7-10.
- Carrell, R.W., C.C. Winterbourn and E.A. Rachmilewitz. 1975. Activated Oxygen and hemolysis. **Br J Haematol.** 30: 259-64.
- Castro, L. and B.A. Freeman. 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. **Nutrition.** 17: 161-165.
- Chiu, D., F. Kuypers and B. Luben. 1989. Lipid peroxidation in human red blood cells. **Semin Hematol.** 26: 257-276.
- Clarke, S. 1985. The role of aspartic acid and asparagine residues in the aging of erythrocyte proteins: Cellular metabolism of racemized and isomerised forms by methylation reactions. **Prog Clin Biol Res.** 195: 91-107.
- Claster, S., D.T.Y. Chiu, A. Quintanilha and B. Lubin. 1984. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. **Blood.** 64: 1079-1084.
- Curnutte, J.T. and B.M. Babior. 1987. Chronic granulomatous disease. **Adv Human Genetics.** 16:229-245.

- Danyelle, M., D. Kenneth, T.H. Tapiero. 2003. The importance of glutathione in human disease. **Biomed. Pharmacother.** 57: 145-155.
- Davies, K.J.A., M.E. Delsignore and S.W. Lin. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals.II. Modification of amino acids. **J. Biol. Chem.** 262: 9902-9907.
- Davies, K.J.A. and A.L. Goldberg. 1987. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 262: 8220-8226.
- Dawson, R.B., W.F. Kocholaty and J.L. Gray. 1970. Hemoglobin function and 2, 3-DPG levels of blood stored at 4°C in ACD and CPD, pH effect. **Trnsfusion.** 10: 299-304.
- Dekkers, J. C., L.J.P. van Doornen and H.C.G. Kemper. 1996. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. **Sports Med.** 21:213-238.
- Demma, L.S. and J.M. Salhany. 1977. Direct generation of superoxide anions by flash photolysis of human oxyhemoglobin. **J. Biol. Chem.** 252: 1226-30.
- Deneke, S.M. and B.L. Fanburg. 1989. Regulation of cellular glutathione. **Am J Physiol.** 257:163-73.
- Desforges, J.F. and P. Slawski. 1972. Red cell 2,3-diphosphoglycerate and intracellular arterial pH in acidosis and alkalosis. **Blood.** 40:740-6.
- Dizdaroglu, M. 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. **Mutat. Res.** 275: 331-342.
- Donne, I.D., R. Rossib, D. Giustarinib, A. Milzania and R. Colomboa. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta.** 329: 23-38.

- Dorge, W. 2002. Free radicals in physiological control of cellular function. **Physiol.Rev.** 82: 47-95.
- Dukan, S., A. Farewell, M. Ballesteros, F. Taddei, M. Radman and T. Nystrom. 2000. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97:5746–49.
- Dumaswala, U. J., M. J. Wilson, T. Jose and D. L. Daleke. 1996. Glutamine-and phosphate-containing hypotonic storage media better maintain erythrocyte membrane physical properties. **Blood.** 88:697-704.
- Dumaswala, U. J., M. J. Wilson, T. Jose and D. L. Daleke. 1997. Effect of a glycerol-containing hypotonic medium on erythrocyte phospholipid asymmetry and aminophospholipid transport during storage. **Biophys. Acta.** 1330:265-273.
- Dumaswala, U.J., L. Zhuo, D.W. Jacobsen, S.K. Jain and K.A. Sukalski. 1999. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. **Free Radical Biology & Medicine.** 27:1041-1049.
- Duncan, J.R., Prasse, K.W. and Mahaffey, E.A. 1994. **Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology.** 3rd ed. The Iowa State University Press. Iowa. 300 p.
- Ettinger, S. J. and E. C. Feldman. 2000. **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat.** Vol. 1, 5th ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia.
- Ettinger, S. J. and E. C. Feldman. 2005. **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat.** Vol. 1, 6th ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia.
- Fagiolo, E., N. Mores, A. Pellicetti, M.L. Gozzo, C. Zuppi and G.P. Littarru. 1986. Biochemical parameters to assess viability of blood stored for transfusional use. **Haematol.** 113: 783-9.

Fantel, A. G. 1996. Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and hypothesis. **Teratology**. 53: 196-217.

Feig, D.I., T.M. Reid and L.A. Loeb. 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cancer Res.** 54 Suppl. 7: 1890-1894.

Feldman, B.F., J.G. Zinkl and N.C. Jain. 2000. **Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Canada.

Fernandez-Pachon, M.S., D. Villano, A.M. Troncoso and M.C. Garcia Parrilla. 2005. Antioxidant capacity of plasma alter red wine intake in human volunteers. **J.Agri.Food Chem.** 53: 5024-5029.

Fiorillo, C., C. Oliviero, G. Rizzuti, C. Nediani, A. Pacini and P. Nassi. 1998. Oxidative stress and antioxidant defences in renal patients receiving regular hemodialysis. **Clin. Chem. Lab. Med.** 36: 149-153.

Gaetani, G.F., H.N. Kirkman, R. Mangerini and A.M. Ferraris. 1994. Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. **Blood**. 84(1): 325-330.

Geldwerth, D., F.A. Kuypers, P. Butikofer, I.M. Allary, B.H. Lubin and P.F. Devaux. 1993. Trans bilayer mobility and distribution of red cell phospholipid during storage. **J. Clin. Invest.** 92:308-314.

George, P. and C.J. Stratmann. 1952. Oxidation of myoglobin by oxygen. **Biochem. J.** 51: 418-25.

Gibson, J.G., R.D. Evans, J.C. Aus, T. Sack and W.C. Peacock. 1947. The post –transfusion survival of preserved human erythrocytes stored blood or in resuspension, after removal of plasma, by mean of two isotopes of radioactive iron. **J. Clin. Invest.** 26: 715-738.

Giese, S. 1999. Reducing free radicals. **New Zealand Science**. 3: 6-8.

Ginsburg, I. and R. Kohen. 1995. Cell damage in inflammatory and infectious sites might involve a coordinated 'cross-talk' among oxidants, microbial haemolysins and amphiphiles, cationic proteins, phospholipases, fatty acids, proteinases and cytokines (an overview). **Free Radic Res Commun**. 22: 489-517.

Goldfarb, A. H. 1999. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. **Can. J. Appl. Physiol**. 24:249-266.

Grune, T., T. Reinheckel and K.J.A. Davies. 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. **FASEB. J**. 11: 526-534.

Gultekin, F., M. Akdogan, I. Altuntas, N. Delibas and M. Kaptanagasi. 2000. Changes in erythrocyte lipid peroxidation and antioxidant potential during storage of blood and protective effect of melatonin. **Turkish J. Biochem**. 25: 83-91.

Guyton, K.Z. and T.W. Kensler. 1993. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. **Br. Med. Bull**. 49: 523-544.

Halliwell, B. 1998. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans ? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. **Free Radical Res**. 29: 469-486.

Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease. **Biochem. J**. 219: 1-14.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1985. **The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In : Free radicals in Biology and Medicine.** Oxford University Press, New York.

- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Mol Aspects Med.** 8: 189-93.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.** 246: 501-4.
- Hamasaki, N. and M. Yamamoto. 2000. Red blood cell function and blood storage. **Vox. anguinis.** 79:4: 191–197.
- Hanrahan, C.J., M.D. Bacolod, T. VyasLiu, N.E. Geacintov, E.L. Loechler and A.K. Basu. 1997. Sequence specific mutagenesis of the major (C) anti benzo a [p]pyrene diol epoxide DNA adduct at a mutational hot spot *in vitro* and in *Escherichia coli* cells, **Chem.Res.Toxicol.** 10: 369-377.
- Hawkins, C.L. and M.J. Davies. 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochem. Biophys. Acta.** 1504: 196–219
- Ho, J., W.J. Sibbald, I.H. Chin-Yee. 2003. Effects of storage on efficacy of red cell transfusion: when is it not safe?. **Crit Care Med.** 31: 687–97.
- Hochstein, P. and S.K. Jain. 1981. Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. **Fed. Proc.** 40: 183–8.
- Howard, A., B. Callan and M. Sweeny. 1992. Transfusion practices and costs in dogs. **JAVMA.** 210:1697.
- Hunt, N.H. and R. Stocker. 1990. Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. **Blood Cells.** 16: 499-526.

Iris, F., F. Benzie and J.J. Strain. 1996. **Assessing Age-Related Changes in Antioxidant Status: the FRASC Assay for Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration in Biological Fluids.** Humana Press.

Jacobson, M. D. 1996. Reactive oxygen species and programmed cell death. **TIBS.** 21: 83-86.

Jain, S.K.1988. Evidence for membrane lipid peroxidation during the *in vivo* aging of human erythrocytes. **Biochem Biophys Acta.** 937: 205–10.

Jain, S.K., N. Mohandas, M.R. Clark and S.B. Shohet. 1983. The effect of malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and Cr-survival of erythrocytes. **Br J Haematol.**53: 247–55.

Jarolim, P., M. Lahav, S.H. Chun Liu and J. Palek. 1990. Effect of Hemoglobin Oxidation Products on the Stability of Red Cell Membrane Skeletons and the Associations of Skeletal Proteins: Correlation With a Release of Hemin. **Blood.** 76 (10):2125-2131.

Jozwik, M., M. Jozwiz, M. Szczypka, J. Gajewska and T. Laskowska-Klita. 1997. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. **Clinica Chimica Acta.**267:129-142.

Karlsson, J. 1997. Introduction to Nutraology and Radical Formation. In: Antioxidants and Exercise. Illinois: **Human Kinetics Press.** 21: 1-143.

Kasai, H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-20-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. **Mutat. Res.** 387: 147-163.

Kerl, M.E. and A.E. Hohenhaus. 1993. Packed red blood cell transfusions in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 202, 1495-1499.

- Knight, A., R.P. Voorhees and L. Martin. 1992. The effect of metal chelators on lipid peroxidation in stored erythrocytes. **Ann Clin Lab Sci.** 22: 207-13.
- Korgun, D.K., S. Bilmen and A. Yesilkaya. 2001. Alteration in the erythrocyte antioxidant system of blood stored in blood bags. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 109: 357-363.
- Kretzschmar, M. and W. Klinger. 1990. The hepatic glutathione system influence of xenobiotics. **Exp. Pathol.** 38: 145-64.
- Kriebardis, A.G., M.H. Antonelou, K.E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L.H. Margaritis and I.S. Papassideri. 2006. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. **J. Cell. Mol. Med.** 11:148-155.
- Kriebardis, A.G., M.H. Antonelou, K.E. Stamoulis, E.E. Petersen, L.H. Margaritis and I.S. Papassideri. 2006. Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases.** 36 : 279–282.
- Laguerre, M., J. Lecomte and P. Villeneuve. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research.** 46 : 244–282.
- Lanevski, A. and K.J. Wardrop. 2001. Principles of transfusion medicine in small animals. **Can. Vet. J.** 42: 447–454.
- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel and E.R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in Oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 186: 464-478.
- Lewin, G. and I. Popov. 1994. The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences. **Med. Hypotheses.** 42: 269-275.

- Lim, P-S., Y-M. Cheng and Y-H. Wei. 2002. Increase in oxidative damage to lipids and proteins in skeletal muscle of uremic patients. **Free Radic Res.** 36: 295-301.
- Lindeman, J.H.N., E.G.W.M. Lentjes, E. Houdkamp and D. Zoeren-Grobbe. 1992. Effect of and exchanges transfusion on plasma antioxidants in the newborns. **Pediatrics.** 90: 200-203.
- Lippa, S., F. Forni, A. Candido, V. Aureli and G. Mango. 1990. Oxidative stress of red blood cell stored for transfusion use. **Folia. Haematol. Intl. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.** 117: 105-110.
- Liu, S-C. and L.H. Derick. 1992. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: structure-function relationships. **Semin Hematol.** 29:231-243.
- Lynch, R.E., G.R. Lee and G.E. Cartwright. 1976. Inhibition by superoxide dismutase of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. **J. Biol. Chem.** 251: 1015-9.
- Lynch, R. E., J. E. Thomas and G. R. Lee. 1977. Inhibition of methemoglobin formation from purified oxyhemoglobin by superoxide dismutase. **Biochemistry.** 16: 4563-4567
- Maeda, H., H. Yoshida, T. Nakahara, Y. Imai and H. Tamai. 1992. Effect of alpha-tocopherol on oxidative hemolysis, as evaluated by impedance measurements. **J. Nutr. Sci. Vitamimol.** 28: 1-14.
- Mannervik, B. 1985. The isoenzymes of glutathione transferase, **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** 57: 357– 411.
- Mannervik, B. 1987. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. **Biochem. Soc. Trans.** 15: 717-9.
- Marchesi, V. T., N. Furthmayr and M. Tomita. 1976. The red cell membrane. **Annual Review of Biochemistry.** 45: 667-698.

- Marjani, A. 2006. Alterations in plasma Lipid peroxidation and total antioxidant status during storage of blood. **Pakistan Journal of Biological Science**. 9 (13) : 2520-2523.
- Marnett, L.J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. 21: 361-370.
- McGown, E.I., R.J. O'Connor and J.W. Neher. 1982. Erythrocyte filterability, fragility and membrane proteins in folic acid deficient guinea pigs. **J. Nutr.**, 112: 92-97.
- Meister, A. and M.E. Anderson. 1983. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 52: 711-760.
- Meier, B. 2001. Reactive oxygen intermediates involved in cellular regulation. **Protoplasma**. 217: 101-116.
- Misra, H.P. and I. Fridovich. 1972. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.** 247:6960-2.
- Morrissey, P. and S. Cotter. 2000. I Need Blood, Stat! Canine Transfusion Medicine. **Vet. Technician**. 21(5):273-278.
- Moskovitz, J., B. Yim and B. Chock. 2002. Free radicals and diseases. **Arch. Biochem. Biophys.** 397: 354-60.
- Nagababu, E., S. Ramasamy, D. R. Abernethy and J. M. Rifkind. 2003. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. **J. Biol. Chem.** 278: 46349-46356.
- Negre-Salvayre, A., C. Coatrieux, C. Ingueneau and R. Salvayre. 2008. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **Pharmacology**. 153:6-20.

- Neta, P., R.E. Huie, A.B. Ross. 1988. Rate constants for reactions of inorganic radicals in aqua solution. **J.Phys. Chem. Ref. Data**.17: 1027-1284.
- Niki, E., Y. Yamoto, M. Takahashi and K. Yamoto. 1988. Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**. 34: 507-512.
- Orlina, A.R. and A.M. Josephson. 1969. Comparative viability of blood stored in ACD and CPD. **Transfusion**. 9:62-69
- Orten, J.M. and O.W. Neutaus. 1982. **Human Biochemistry**. 10th ed. The C.V. Mosby Co, Louis.
- Ozben, T. 1998. **Free Radicals, Oxidative stress, and Antioxidants**. Plenum Press, New York.
- Pfafferot, C., H.J. Meiselman and P. Hochstein. 1982. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. **Blood**. 59:12-5.
- Poulsen, H.E., H. Prieme and S. Loft. 1998. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **Eur. J. Cancer Prev**. 7: 9-16.
- Puppo, A. and B. Halliwell. 1988. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. **Biochem. J**. 249: 185-90.
- Racek, J., R. Herynkova, V. Holeck, Z. Jerabek and V. Slama. 1997. Influence of antioxidants on the quality of stored blood. **Vox. Sang**. 72: 16-19.
- Reed, D.J. and M.W. Fariss. 1984. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacol. Rev**. 36:25-33.
- Ross, J.F., C.A. Finch, W.E. Peacock and M.C. Sammons. 1947. The *in vitro* preservation and post-transfusion survival of stored blood . **J. Clin. Invest**. 26: 687-703.

- Shikama, K. 1984. A controversy on the mechanism of autoxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. **Biochem. J.** 84: 223-279.
- Sinnhuber, R.O., I.C. Yu and T.C. Yu. 1958. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. **Food Res.** 23: 624-634.
- Stadtman, E.R. 1990. Metal catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Rad Biol Med.** 9:315-25.
- Stadtman, E.R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. **Annu. Rev. Biochem.** 62: 797-821.
- Tietze, F. 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total And oxidized glutathione : Application to mammalian blood and other tissues. **Anal.Biochem.** 27: 502-522.
- Tinmouth, A.T., A.L. McIntyre, R.A. Fowler. 2008. Blood conservation strategies to reduce the need for red blood cell transfusion in critically ill patients. **CMAJ.** 178: 49-57.
- Trotter, J., M.G. Rumsby. 1981. Lipids of the human erythrocyte membrane during storage for transfusion. Correlation of lipid changes with the discocyte to spherocyte shape transformation. **J. Appl. Biochem.** 3:19.
- Tsuda, S., K. Kakinuma and S. Minarami. 1972. Intracellular pH of red cells stored in acid citrate dextrose medium. **Experientia.** 28: 1481-2.
- Vineis, P., N. Malats, M. Porta and F.X. Real. 1999. Human cancer, carcinogenic exposures and mutaion spectra. **Mutat. Res.** 436: 185-194.
- Wang, D., D.A. Kreutzer and J.M. Essigmann. 1998. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. **Mutat. Res.** 400: 99-115.

- Webster, N.R. and C. Toothil. 1986. Effects of blood storage on red blood cell antioxidative systems. **Acta Haematol.** 75: 30-3.
- Wefers, H. and H. Sies. 1988. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. **European Journal of Biochemistry.** 174: 353–357.
- Weiss, S.J. 1980. The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. **J. Biol. Chem.** 255: 9912–9917.
- Weiss, S.J., J. Young, A.F. Lobuglio, A. Slivka and N.F. Nimen. 1981. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. **J. Clin. Invest.** 68: 714–721
- Wever, R., B. Oudega, and B.F. Gelder Van. 1973. Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxyhemoglobin. **Biochem Biophys Acta.** 302: 475-8.
- Winterbourn, C.C., B.M. McGrath and R.W. Carrel. 1976. Reactions involving superoxide and normal and unstable hemoglobins. **Biochem. J.** 155: 493-502.
- Winterbourn, C.C. 1985. Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. **Environ Health Perspect.** 64: 321-30.
- Wolff, S.P., A. Garner and R.T. Dean. 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends. Biochem. Sci.** 11: 27.
- Wong, S.H.Y., J.A. Knight, S.M. Hopfer, O. Zacharia, Jr. C.N. Leach and Jr. F.W. Sunderman. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde–thiobarbituric acid adduct. **Clin Chem.** 33: 214–20.
- Wood, P. 1988. The potential diagram for oxygen at pH 7.0. **Biochem. J.** 253:287-9.

Yamagchi, T., K. Uchimura, Y. Kurokova and M.M. Hamada. 1992. Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocyte from human blood.

J. Clin. Biochem. Natur. 12: 41-50.

Yu, B. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological**

Reviews. 74: 139–162.

Zachara, B.A., J. Gromadzinska, W. Wasowicz and Z. Zbrog. 2006. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. **Acta Biochimica Polonica.** 53 (4) : 663–677.

Zuck, T. F., T.A. Bensinger, C.C. Peck, R.K. Chillar, E. Beutler, L.N. Button, P.R. McCurdy, A.M. Josephson and T.J. Greenwalt. 1977 . The *in vivo* survival of red blood cells stored in modified CPD with adenine: report of a multi-institutional cooperative effort. **Transfusion.** 17: 374-382.

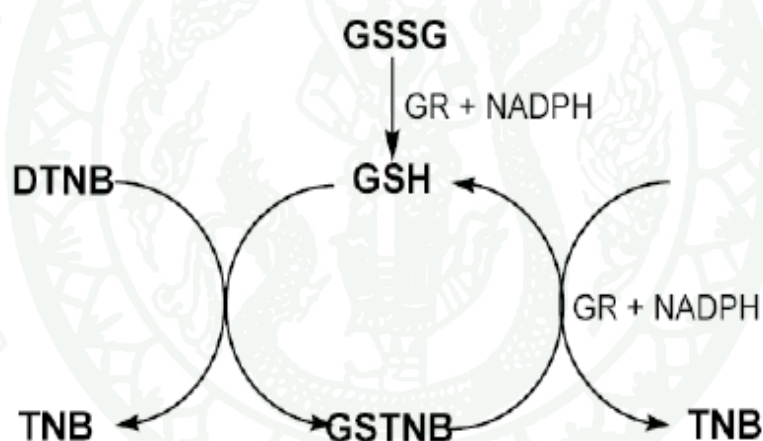


ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์กลูตาไธโอนโดยวิธี Enzymatic Recycling Assay

หลักการวิเคราะห์กลูตาไธโอน(GSH)

กลูตาไธโอนในตัวอย่าง จะทำการวัดโดยวิธี enzymatic recycling method โดยใช้ เอนไซม์กลูตาไธโอน รีดักเทส (glutathione reductase) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูตาไธโอนใน microtiter plate assay โดยอาศัยหลักการดังนี้ หมู่ sulhydryl ของกลูตาไธโอน จะทำปฏิกิริยากับ 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) และ ให้สีเหลืองของ 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) ซึ่งถูกวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร อัตราการสร้าง TNB เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อปฏิกิริยาการย้อนกลับ ซึ่งการย้อนกลับนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อความเข้มข้นของกลูตาไธโอนในตัวอย่าง ดังรูป



ภาพผนวกที่ 1 ปฏิกิริยาการวิเคราะห์ GSH ด้วยวิธี enzymatic recycling method.

สารเคมี

1. Metaphosphoric acid
2. 100 mM Sodium phosphate buffer pH 7.4
3. Ethylene Diamine Tetra Acetic acid-Na (EDTA –Na)
4. Oxidized glutathione (GSSG)
5. Triethanolamine
6. 5,5'-dithiosbis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)
7. NADPH
8. Glutathione reductase (GR)
9. 2-vinylpyridine

อุปกรณ์

1. เครื่อง Elisa reader
2. 96 well plate
3. Eight multi-channel pipette

การเตรียม ตัวอย่างเม็ดเลือดแดง

1. ใช้เลือดที่แบ่งจากถุงเก็บเลือดมาตรฐาน 2 มิลลิลิตร
2. ปั่นด้วยความเร็ว 1,300 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ดูดแยกพลาสมา และดูด buffy coat ที่มีส่วนของเม็ดเลือดแดง
4. เติมน้ำกลั่น 4 เท่าของปริมาตรตัวอย่างผสมให้เข้ากันเพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก
5. ปั่นตกตะกอนเยื่อหุ้มเซลล์ที่ 4,000 g นาน 15 นาที
6. ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอดทดลอง (microcentrifuge tube)
7. เติม metaphosphoric acid ปริมาตร 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

นาน 5 นาที

8. ปั่นตกตะกอนด้วยการ centrifuge ที่ 2,000 g อย่างน้อย 2 นาที
9. ดูดส่วนใสด้านบนไว้เพื่อรอการวิเคราะห์
10. ถ้ายังไม่ทำการวิเคราะห์ เก็บไว้ที่ – 40 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

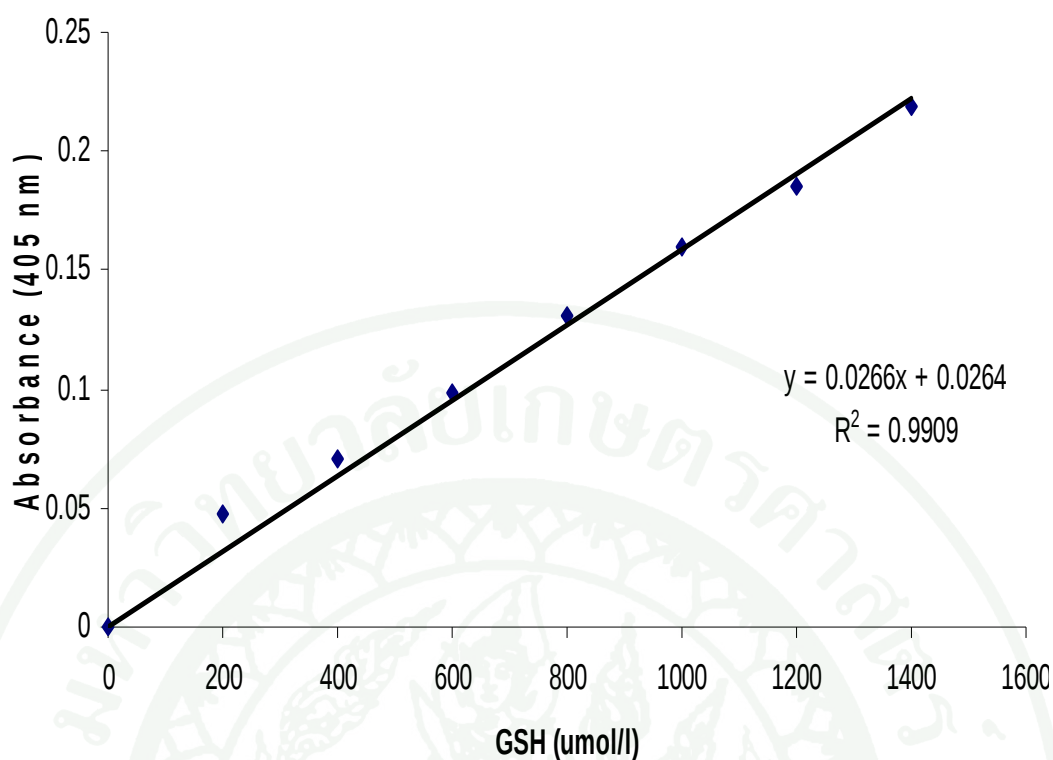
1. คัดตัวอย่างส่วนใสจากข้อ 9 (ทำการเจือจาง 20 เท่าโดยใช้ตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร เติม buffer 950 ไมโครลิตร), standard และ blank (น้ำกลั่น) ปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ใน microtube
2. เติม triethanolamine 50 ไมโครลิตร เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ผสมด้วย vortex mixture ทันที
3. ดูข้อ 1.2 standard และ blank ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ตามตาราง template plate ที่กำหนดไว้
4. เติม reagent (ประกอบด้วย 1 มิลลิโมล DTNB 1 มิลลิโมล NADPH 100 มิลลิโมล Sodium phosphate buffer pH 7.4 และ 20 ยูนิต Glutathione reductase) หลอมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งแต่หลุมแรกถึงหลุมสุดท้ายใช้เวลาไม่เกิน 2 นาที
5. วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร อ่านค่าทุกๆ 30 วินาทีจนถึง 15 นาที
6. นำค่าที่ 4 (ในข้อ 1.5) นาฬิกาคำนวณความเข้มข้นเทียบกับค่ามาตรฐานกลูตาไธโอน (GSH standard) ตามสูตร

รายงานผลการทดลอง

คำนวณความเข้มข้นเทียบกับกราฟมาตรฐาน

สูตรคำนวณ

$$\text{GSH} = \frac{\{(\text{absorbance at 405 nm}) - (\text{y-intercept})\}}{\text{Slope} \times \text{sample dilution}}$$

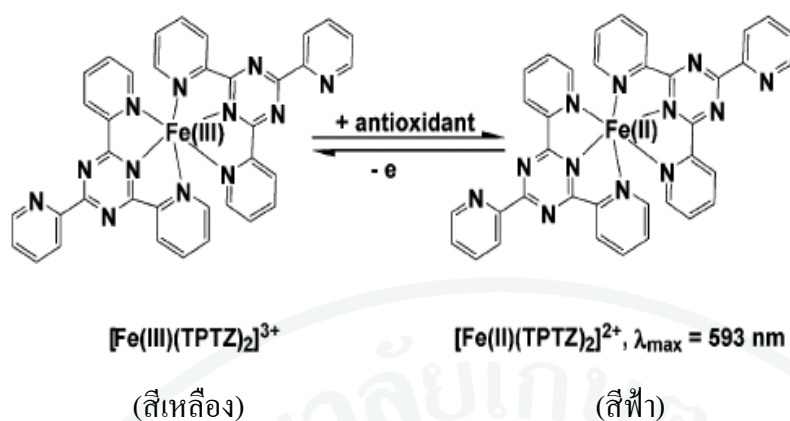


ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของกลูตาไธโอน (GSH)

2. วิธีวัดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริกในตัวอย่างพลาสมา โดยวิธี Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay

หลักการ

การวัดค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา โดยวิธี Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Assay (ดัดแปลงจากวิธีการของ Benzie and Strain (1996)) โดยใช้หลักการของสารต้านอนุมูลอิสระ ในพลาสมา สามารถรีดิวซ์ เฟอริก ไอออน (ferric ion: Fe^{3+}) ไปเป็นเฟอร์รัส ไอออน (ferrous ion: Fe^{2+}) ที่ pH ต่ำ โมเลกุล tripyridyl-triazine (TPTZ) ในปฏิกิริยาจะจับกับ เฟอร์รัส ไอออน ทำให้เกิดสีฟ้า วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ 3 ปฏิกริยาระหว่าง TPTZ กับ Fe^{2+}

ที่มา: Fernandez-Pachon *et al.* (2005)

คำนวณความเข้มข้นได้จากการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ Fe^{2+} ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว (0-3,000 ไมโครโมลต่อลิตร) รายงานผลค่าความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นค่าเป็นไมโครโมลต่อลิตร (Iris F. F. Benzie and J. J. Straint, 1996, Fernandez-Pachon *et al.*, 2005)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
2. Autopipette ขนาด 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
3. Microcentrifuge tube
4. Cuvette พลาสติก
5. เครื่อง UV/VIS Spectrophotometer รุ่น Helios Alpha หมายเลขเครื่อง UVA 130623

จากบริษัท บางกอกไฮเล็บ จำกัด

6. Waterbath

สารเคมี

1. 2-4-6-tripyridyl-s-triazine จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Ferrous sulfate heptahydrate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Sodium acetate จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. Hydrochloric acid (HCl)
6. Glacial acetic acid
7. Deionized water

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

1. เก็บเลือดโดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดเฮปาริน ที่ความเข้มข้นเฮปาริน 5-10 หน่วย ต่อมิลลิลิตรเลือด
2. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 1,300 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. คูดเก็บส่วนของเหลวใส (ส่วนบน) โดยปราศจากการรบกวนต่อ white buffy layer ใส่ในหลอดทดลอง
4. ถ้ายังไม่ทำการวิเคราะห์ เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารเคมี

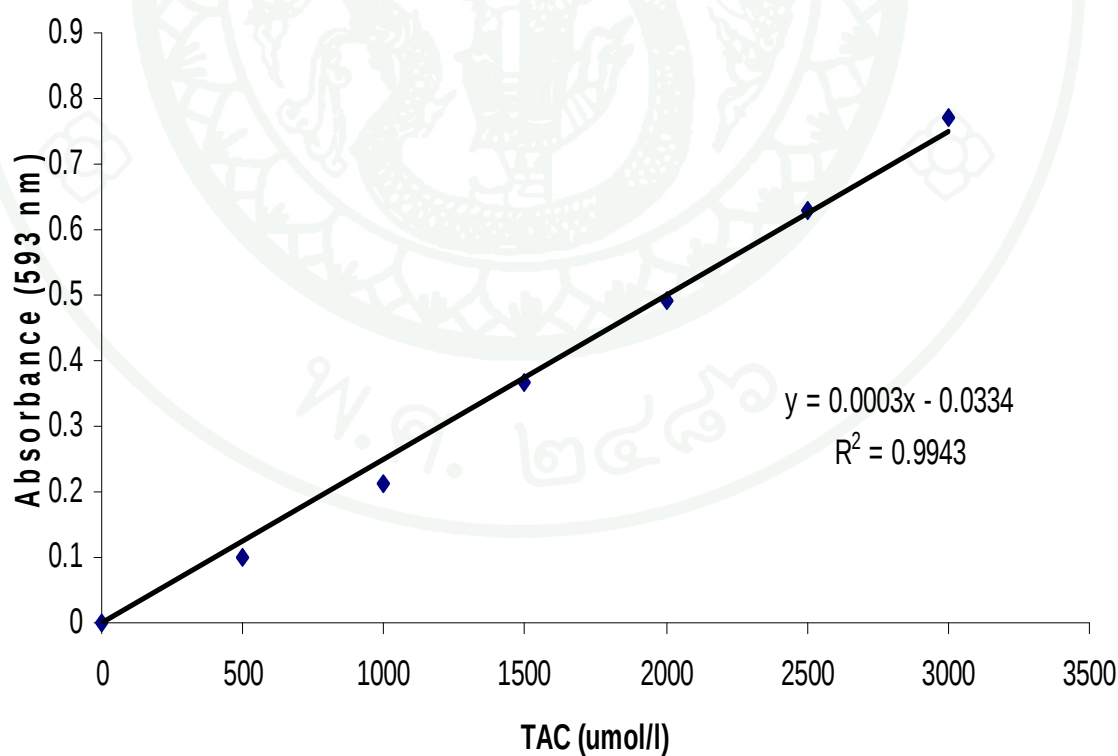
1. FRAP reagent โดยใช้อัตราส่วนข้อ 1.1:1.2 :1.3 เท่ากับ 10:1:1
 - 1.1 300 มิลลิโมลต่อลิตรของ acetate buffer pH 3.6 ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.1 g + $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ 16 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร)
 - 1.2 10 มิลลิโมลต่อลิตรของ TPTZ ละลายใน 40 มิลลิโมลต่อลิตรของ HCl
 - 1.3 20 มิลลิโมลต่อลิตรของ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

วิธีการทดลอง

1. ชุด FRAP reagent ปริมาตร 1800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 180 ไมโครลิตร
3. คุดพลาสมาปริมาตร 60 ไมโครลิตร (ในปฏิกิริยาตัวอย่างต้องมีความเข้มข้นเท่ากับ 1/34)
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ที่ 593 นาโนเมตร เทียบกับ standard ทุกๆ 15 วินาที นาน 10 นาที
5. นำค่า ที่ 4 นาทีจากข้อ (4) มาคำนวณหาความเข้มข้นเทียบกับ standard (Fe^{2+}) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว

การรายงานผล

รายงานความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นหน่วย ไมโครโมลต่อลิตร

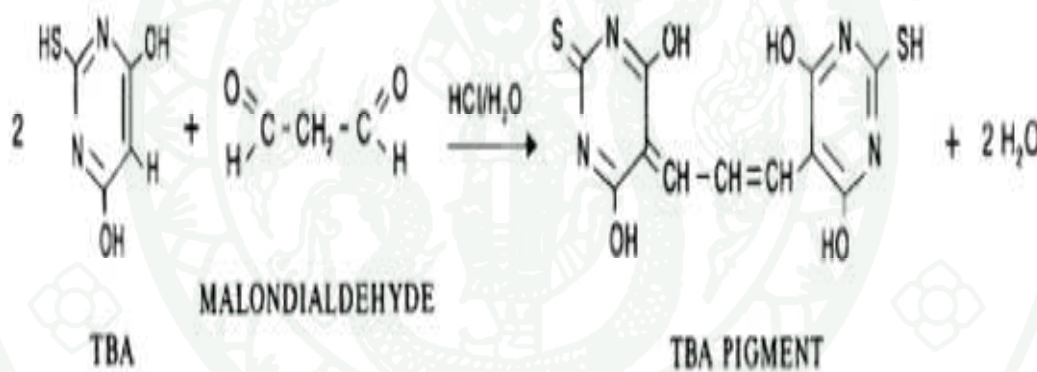


ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของเหล็กเฟอร์ริก

3. การวิเคราะห์ Malondialdehyde (MDA) ด้วย วิธี Thiobarbituric Acid (TBA) assay

หลักการ

MDA เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน จะไปทำปฏิกิริยากับ Thiobarbituric acid (TBA) เกิดเป็น Thiobarbituric acid reactive substrate (TBARS) ให้สีชมพูแดง ซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง TBA 2 โมเลกุล กับ MDA 1 โมเลกุล วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 532 และ 572 นาโนเมตร เพื่อกำจัดปฏิกิริยารบกวนที่ไม่ใช่ MDA-TBA โดยการนำค่า OD ที่ 532 นาโนเมตรลบด้วย OD ที่ 572 นาโนเมตร และรายงานผลค่า MDA เป็น นาโนโมลต่อมิลลิลิตร (Sinnhuber *et al.*, 1958)



ภาพผนวกที่ 5 ปฏิกิริยาระหว่าง TBA และ MDA

ที่มา: Sinnhuber และคณะ (1958)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
2. Autopipette ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
3. Vortex mixer
4. Cuvette quatze

5. เครื่อง UV/VIS Spectrophotometer รุ่น Helios Alpha หมายเลขเครื่อง UVA 130623
จากบริษัท บางกอกไฮเล็บ จำกัด

6. Waterbath

สารเคมี

1. 2- thiobarbituric acid (TBA) จากบริษัท sigma
2. Trichloroacetic acid จากบริษัท sigma
3. Butylatehydroxytoluene (BHT) จากบริษัท sigma
4. n-butanol
5. Hydrochloric acid (HCl)
6. Pyridine
7. Deionized water

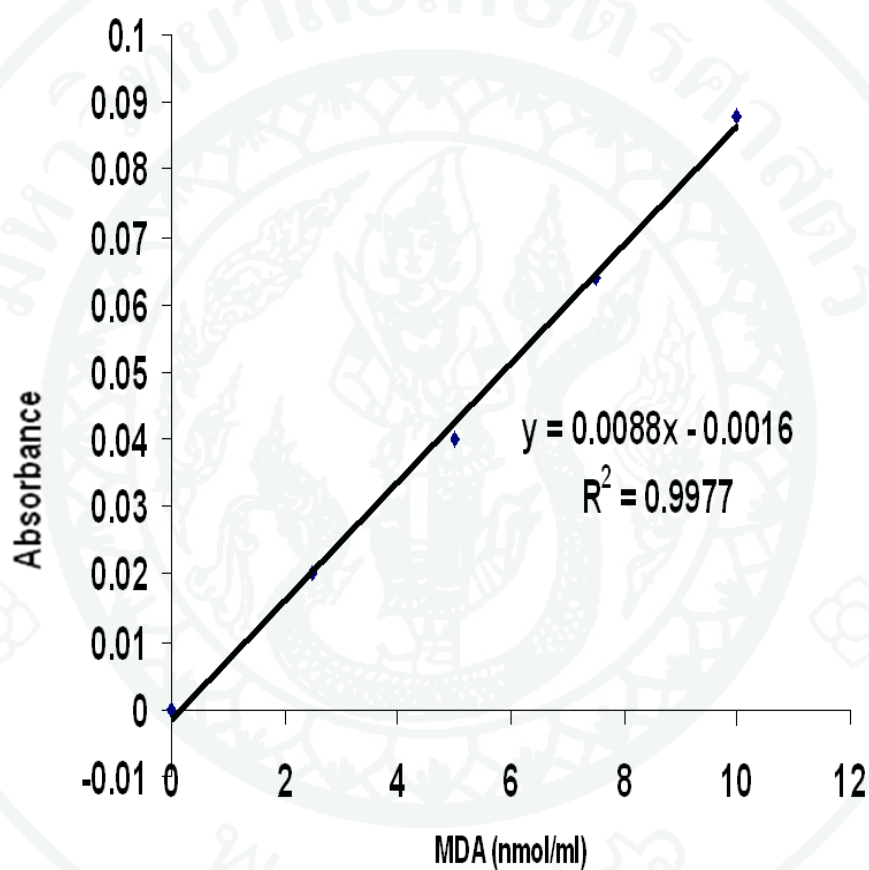
วิธีการ

1. ควบ TBA (3.7 กรัมต่อลิตร ละลายใน 0.25 โมลต่อลิตรของ HCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอด centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
2. เติม 15% trichloroacetic acid (ละลายด้วย 0.25 โมลต่อลิตรของ HCl) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
3. เติม 0.5 M BHT ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
4. เติมตัวอย่างพลาสมา standard และ blank (deionized water) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลอด
5. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
6. ตั้งที่อุณหภูมิ 95° C นาน 1 ชั่วโมง
7. ทำให้เย็นโดยแช่น้ำเย็น นาน 5 นาที
8. เติม n-butanol และ pyridine (15:1 v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
9. นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm นาน 10 นาที

10. ดูค่าส่วนชั้นบนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ cuvette วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 532 และ 572 นาโนเมตร เพื่อกำจัดปฏิกิริยารบกวนที่ไม่ใช่ MDA-TBA

การรายงานผล

รายงานผลความเข้มข้นของเป็น Malondialdehyde เป็น นาโน โมลต่อมิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้น malondialdehyde (MDA)

4. การหาปริมาณคาร์บอนิลโปรตีนในตัวอย่างพลาสมา โดยใช้วิธีของ Levine และคณะ (1990)

การเตรียมตัวอย่าง

1. เลือดที่เก็บ (whole blood) centrifuge ที่ 1,300 g เป็นเวลา 15 นาที
2. ดูดแยกพลาสมาออกและเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส (จนกว่าจะนำมาใช้)

สารเคมี

1. 10 มิลลิโมล 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)
2. 2.5 โมลาร์ HCl
3. 20% TCA (w/v)
4. 10 % TCA
5. thanol : ethyl acetate (1:1, v/v)
6. 6 M guanidine hydrochloride

วิธีการหาปริมาณคาร์บอนิลโปรตีน

1. เดิมพลาสมา 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด (หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร) สำหรับเตรียมเป็นตัวอย่างในการทดสอบ (test sample) และ ตัวอย่างควบคุม (control sample)
2. โดย เดิม 4.0 มิลลิลิตร ของ 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ที่ละลายด้วย 2.5 M HCl ให้เป็น ตัวอย่างในการทดสอบ
3. ใส่เฉพาะ 4.0 มิลลิลิตร ของ 2.5 โมลาร์ HCl เป็น ตัวอย่างควบคุม
4. ผสมให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง (มืด) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยต้องเขย่าหลอด ทุก 15 นาที
5. เดิม 20% TCA (w/v) 5 มิลลิลิตร ในทั้ง 2 หลอด ตั้งหลอดบนน้ำแข็ง 10 นาที
6. นำไป centrifuge ที่ 1,300 g เป็นเวลา 15 นาที จะได้ตะกอนโปรตีนนอนก้น ดูดส่วนใสทิ้งไป
7. ล้างตะกอนโปรตีน ด้วย 10 % TCA

8. ล้างตะกอนโปรตีน อีก 3 ครั้งด้วย 4 มิลลิลิตร ของ ethanol : ethyl acetate (1:1, v/v) เพื่อกำจัดเอาส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับ DNPH และ ส่วนที่เป็นไขมันออก
9. ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 6 โมลาร์ guanidine hydrochloride 2 มิลลิลิตร
10. incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ใน water bath
11. แยกส่วนที่ไม่ละลายออกโดยการ centrifuge
12. วัดปริมาณคาร์บอนิลโปรตีนด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบแต่ละตัวอย่างในการทดสอบ กับ ตัวอย่างควบคุม
13. คำนวณปริมาณคาร์บอนิลโปรตีนโดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม
14. คำนวณปริมาณคาร์บอนิลโปรตีนโดยใช้ $22,000 \text{ M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นค่า molar extinction coefficient (ϵ) ของคาร์บอนิลโปรตีน
15. สูตรคำนวณ

$$\text{ปริมาณคาร์บอนิลโปรตีน} = \frac{\text{OD.}}{0.022} \times \frac{\text{ปริมาณตัวทำละลายโปรตีน}}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}}$$

แสดงหน่วยปริมาณคาร์บอนิลโปรตีนเป็น นาโนโมลต่อมิลลิลิตร

5. การวิเคราะห์ค่าความเปราะของเม็ดเลือดแดง โดยวิธี Osmotic fragility test (McGown *et al.*, 1983)

วิธีการ

1. เตรียมหลอดทดลอง 8 มิลลิลิตร จำนวน 12 หลอด จำนวน 2 ชุด (duplicated) แต่ละหลอดบรรจุด้วยสาร NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดังตาราง

หลอด ที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
%NaCl	Dw	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75

2. นำเลือดไปปั่นแยกพลาสมาด้วยการ centrifuge ที่ความเร็ว 1,300 g นาน 7 นาที
3. ดูดแยกพลาสมาด้วยพลาสติกเตอร์ปิเปต เหลือไว้แต่เม็ดเลือดแดง
4. เติมสารละลาย PBS pH 7.4 ลงในหลอดบรรจุเม็ดเลือดในอัตราส่วนเม็ดเลือดต่อสารละลาย 1:5 ปิดฝาด้วย parafilm ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหงายหลอดซ้ำๆ เพื่อไม่ให้เม็ดเลือดแตก
5. นำส่วนผสมเม็ดเลือดไปปั่นแยกเม็ดเลือดตามข้อ 2 แล้วดูดแยกส่วนที่เป็นสารละลายใส และชั้นผิวเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด (buffy coat)ทิ้งด้วยพลาสติกเตอร์ปิเปต
6. ทำข้อ 4-5 ซ้ำอีก 1 ครั้ง เพื่อล้างเม็ดเลือดและขจัดพลาสมาที่ปะปนออก
7. เติมสารละลาย PBS pH 7.4 ลงในหลอดเม็ดเลือด ในอัตราส่วน 1:2 เพื่อให้ได้สารแขวนลอยเม็ดเลือด ในอัตราส่วน 50% ปิดฝาและผสมซ้ำๆ ให้เข้ากัน
8. บรรจุสารแขวนลอยเม็ดเลือด 50% ลงในแต่ละหลอดที่เตรียมไว้ตามข้อ 1 ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
9. เติมสารละลาย 0.9% NaCl 3 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอด ให้สารละลายไหลลงตามผนังหลอดเบาๆ เพื่อระงับการแตกของเม็ดเลือด ผสมเบาๆแล้วนำไปปั่นตามข้อ 2
10. ใช้พลาสติกเตอร์ปิเปตสะอาดดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
11. การคำนวณและแสดงผล
 - 11.1 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{\text{O.D. Soln}}{\text{O.D. H}_2\text{O}} \times 100$$

O.D. Soln = Optical density ของสารละลายจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ในสารละลายชนิดต่างๆ

O.D. H₂O = Optical density ของสารละลายจากการแตกของเม็ดเลือดแดง ในน้ำกลั่น

11.2 การคำนวณค่า Mean Corpuscular Fragility (MCF) โดยใช้สูตร ดังนี้

$$0.05 \times \text{ค่าสูงสุดที่อยู่ในช่วงที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50\%} - 50$$

(1)

$$\frac{\text{ค่าสูงสุดที่อยู่ในช่วงที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50\%} - \text{ค่าต่ำสุดที่อยู่ในช่วงที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50\%}}{\text{ค่าสูงสุดที่อยู่ในช่วงที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50\%} - \text{ค่าต่ำสุดที่อยู่ในช่วงที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50\%}}$$

นำผลของสมการที่ (1) + % NaCl ของค่าสูงสุดที่อยู่ในช่วงที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50% จะได้ค่า MCF ที่มีหน่วยเป็น % NaCl ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกที่ระดับ 50%

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายธานินทร์ สิงกันยา
เกิดวันที่	23 กรกฎาคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภออมลไศย จังหวัด กาฬสินธุ์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี ราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ จังหวัด ชลบุรี

