การศึกษาสภาวะและปริมาณของแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนส ไอโซเอนไซม์ในผู้ป่วยด้วยโรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่น

นางพักตร์พริ้ง แสงดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๑๗

001960

I16638180

LACTIC ACID DEHYDROGENASE ISOENZYMES IN MYOCARDIAL INFARCTION

Missis Puckprink Sangdee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1974

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

..... กรรมการ

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประโชติ เปล่งวิทยา

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาสภาวะและปริมาณของแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนส ไอโซเอนไซมในผู้ป่วยด้วยโรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่น

ชื่อ นางพักตร์พริ้ง แสงดี แผนกวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา ๒๕๑๖

บทคัดย่อ

โรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่น เป็นโรคที่เป็นอันตรายถึงชีวิต โรคนี้เกิดจากการอุดตันของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจ ถ้าการอุดตันนี้เกิดกับหลอดเลือดเส้นใหญ่ การวินิจฉัยโรคทำได้ง่ายและไม่ค่อยผิดพลาด แต่มีหลายกรณีที่การวินิจฉัยโรคทำได้ยาก เช่น ในรายที่มัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่นเกิดเพียงเล็กน้อย เนื่องจากเกิดการอุดตันในหลอดเลือดเส้นเล็ก ๆ หรือในรายที่อีเล็คโตรคาร์ดิโอแกรมมีการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นได้ไม่ชัด หรือยากที่จะประเมินผลได้ เพราะมีมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่นอยู่ก่อนแล้ว หรือมีการขัดขวางทางเดินของโลหิตในหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจที่แยกไปทางซ้าย หรือที่กล้ามเนื้อหัวใจซีกล่างข้างซ้ายต้องทำงานเกินกำลังมาก่อน สาเหตุต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้แพทย์จำเป็นต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเข้าช่วย

ในการศึกษานี้ยึดหลักที่ว่า แลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมจะออกมาสู่ระบบหมุนเวียนของโลหิตได้เมื่อเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจได้รับอันตรายหรือตาย จึงได้ศึกษาถึงวิธีการที่ใช้ตรวจวัดปริมาณของไอโซเอนไซมที่มีอยู่ในพลาสม่า ในสภาวะต่าง ๆ กัน คือ

ก. ปริมาณของไอโซเอนไซมที่มีอยู่ทั้งหมดในพลาสม่า โดยอาศัยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Amador et al (1963)

ข. ปริมาณของไอโซเอนไซมที่คงทนต่อความร้อน วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Amador et al (1963) และ Bell (1963)

ค. ปริมาณของไอโซเอนไซมที่คงทนต่อยูเรีย ใช้หลักของ Emerson and Wilkinson (1965)

ง. ปริมาณของแต่ละไอโซเอนไซม โดยวิธีอีเล็กโตรโฟรีสิส โดยทดลองหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมที่สุดในการแยกไอโซเอนไซมนี้โดยใช้ Difco Special Agar-Noble เป็นตัวกลางในการแยก

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานถึงการใช้แลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมในการวินิจฉัยโรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่นมาก่อน ผู้ทำการวิจัยจึงได้ศึกษาถึงการวัดปริมาณของไอโซเอนไซมนี้ในพลาสม่า โดยมุ่งจะใช้ผลที่ได้รับเป็นเครื่องช่วยในการวินิจฉัยโรคดังกล่าว โดยได้ศึกษาในคนไทยปกติที่มีอายุระหว่าง ๒๕–๔๕ ปี เปรียบเทียบกับคนไทยที่ป่วยด้วยโรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่น โดยตรวจวัดปริมาณไอโซเอนไซมในพลาสม่า ซึ่งเก็บในวันที่ ๑, ๒, ๓, ๕, ๑๐ และ ๑๕ หลังจากเริ่มมีอาการของมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่นปรากฏให้เห็น

ขณะเดียวกันได้ทดลองแยกไลโปโปรตีน โดยวิธีอีเล็คโตรโฟรีสิส ในสภาวะเดียวกับที่ใช้แยกไอโซเอนไซม แต่ไม่ได้ผลเป็นที่พอใจ นอกจากนี้ได้ตรวจหาปริมาณของคอเรสเตอรอลและไตรกรีเซอราลในคนไทยปกติและที่ป่วยด้วยโรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่น โดยใช้เกณฑ์อายุ และวันของการตรวจคนไข้ เหมือนกับการตรวจไอโซเอนไซม วิธีตรวจหาปริมาณคอเรสเตอรอลใช้วิธีของ Parekh and Jung (1970) และ Jung and Parekh (1971) ส่วนการตรวจหาปริมาณไตรกรีเซอราลใช้วิธีของ Fletcher (1968)

จากการตรวจหาปริมาณของแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังกล่าวนี้พบว่า คนไทยที่ป่วยด้วยโรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่น จะมีระดับของไอโซเอนไซมสูงกว่าในคนปกติ โดยไม่มีข้อแตกต่างในระดับของคอเรสเตอรอล และไตรกรีเซอราล การวัดแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมจึงมีประโยชน์ในการใช้ตรวจวินิจฉัยโรคมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่นในคนไทยได้

วิธีการตรวจวัดไอโซเอนไซมที่ทนต่อความร้อน และยูเรียทำให้ทราบรายละเอียดของการที่มีมัยโอคาร์เดียลอินฟาร์คชั่นได้ดี โดยเฉพาะในคนไข้รายที่สงสัยว่าแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจเป็นไอโซเอนไซมที่มาจากตับ เนื่องจากไอโซเอนไซมที่มีแหล่งกำเนิดจากตับถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนและยูเรีย ขณะที่ไอโซเอนไซมที่มาจากกล้ามเนื้อหัวใจสามารถทนอยู่ได้ดี ยิ่งกว่านั้นการตรวจหาไอโซเอนไซมส่วนที่ทนต่อความร้อนและส่วนที่ทนต่อยูเรียยังทำได้ง่ายและเร็วกว่าวิธีการตรวจโดยวิธีอีเล็คโตรโฟรีสิส อย่างไรก็ดีในรายที่คนไข้มาโรงพยาบาลด้วยอาการที่สลับซับซ้อน การตรวจแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมด้วยวิธีอีเล็คโตรโฟรีสิส ซึ่งเป็นวิธีการที่ละเอียดและเฉพาะกว่า จะเหมาะสมกว่า โดยเฉพาะในกรณีที่การตรวจนั้นจำเป็นต้องกระทำติดต่อกันหลายวันและการวินิจฉัยจะได้ผลดียิ่งขึ้น ถ้านำวิธีการต่าง ๆ ของการตรวจแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมมาประกอบเข้าด้วยกัน

วิธีการของ Parekh and Jung (1970) และ Jung and Parekh (1971) ที่ใช้ตรวจคอเรสเตอรอลและวิธีการของ Fletcher (1968) ที่ใช้ตรวจไตรกรีเซอราลนั้น เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วพอที่จะนำมาใช้ในงานประจำได้และยังเป็นวิธีที่ใช้ปริมาณพลาสม่าน้อยด้วย ส่วนการวัดปริมาณไลโปโปรตีนนั้นควรจะได้ศึกษาต่อไปเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมกว่านี้ และควรศึกษาด้วยว่ามีสารใดในพลาสม่าที่จะมารบกวนในการตรวจวัดไอโซเอนไซมเหล่านี้ อนึ่ง ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงระดับของแลกติกแอซิดดีไฮโดรจีเนสไอโซเอนไซมในคนปกติในช่วงอายุอื่น ๆ ด้วย

Thesis Title Lactic Acid Dehydrogenase Isoenzymes in Myocardial Infarction

Name Missis Puckprink Sangdee Department Biochemistry

Academic Year 1973

ABSTRACT

Myocardial infarction is a potentially fatal disease, caused by an occlusion of coronary artery, an artery that supplies nourishing substances to the heart muscle. In typical cases which are caused by large arterial occlusions, the diagnosis is not difficult and rarely missed. Other cases, however, are not easily diagnosed. These are small infarction resulting from occlusions in small coronary arteries, cases which are caused by previous left ventricular strain and give atypical features or show electrocardiograms which are difficult to interpret. In such instances, clinicians may seek for the aid of clinical laboratory investigations.

This study was based on the fact that lactic acid dehydrogenase (LDH) isoenzymes are liberated from damaged or dead heart muscle cells. The activities of plasma LDH isoenzymes under the following conditions were determined:

a. total activity of plasma LDH isoenzymes (TLDH) based on the method of Amador et al (1963) with slight modifications

b. activity of isoenzymes which is stable in urea (ULDH), the method was modified from the methods of Amador et al (1963), and Bell (1963)

c. activity of isoenzymes which is heat stable (HLDH), the method was modified from the method of Emerson and Wilkinson (1965)

d. activity of different forms of isoenzymes, using electrophoretic method. Difco Special Agar-Noble was used as a supporting medium. Studies were performed to find out the optimum conditions for the electrophoretic procedure.

Because of the lack of work showing the use of LDH isoenzymes in the diagnosis of myocardial infarction in Thailand, studies were performed to determine the activity of the isoenzymes in plasma in the view of using the information obtained as a tool in the diagnosis of the disease. The isoenzyme activity was determined in plasma samples of normal Thai subjects with the age group of 25 to 45 years and those of patients with myocardial infarction. Plasma was taken at 1, 2, 3, 5, 10 and 15 days after the onset of the infarct.

Plasma lipoproteins were simultaneously determined with electrophoresis technique without any satisfactory results. Cholesterol and triglycerides were investigated in the same series of plasma samples of LDH isoenzymes. The methods of Parekh and Jung (1970), Jung and Parekh (1971) and Fletcher (1968) were used for the determinations of cholesterol and triglycerides respectively.

It was seen in these investigations that Thai people who had been attacked with myocardial infarction showed higher levels of plasma LDH isoenzymes activity than normal subjects. There was no significant differences in the plasma levels of cholesterol and triglycerides. The measurement of LDH isoenzymes, therefore, offers its value in the diagnosis of myocardial infarction.

The measurements of HLDH and ULDH would give good indications showing myocardial damage particularly when the increase in plasma LDH activity is suspected to be augmented by liver-originated LDH isoenzymes. This is due to the fact that liver isoenzymes are very sensitive to heat and urea while those from cardiac muscle are particularly resistant. A major advantage in measuring the HLDH and ULDH activity is that they can be more easily accomplished and less tedious than the more complicated electrophoretic separation. However, in complicated clinical conditions, the electrophoretic separation of LDH isoenzymes is considered to be more sensitive and more specific. Electrophoresis should be carried out especially when several investigations are taken. A combination of various methods is recommended, however, in cases which absolute certainty is required.

The methods of Parekh and Jung (1970), Jung and Parekh (1971) and Fletcher (1968) for the determinations of cholesterol and triglycerides required only small amount of plasma. These two methods are reliable and simple enough to be used in routine laboratories.

It would be interesting to study further to find out optimum conditions for the electrophoretic separation of lipoproteins and possible interfering substances in the determinations of plasma isoenzymes. Studies should be done in subjects of different age groups apart from those reported in this thesis.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest grateful to Dr.Prachote Plengvidhya for his most helpful advice and criticism throughout this investigation and for his hearty supervision in preparing of this thesis.

Grateful thanks are due to Dr.Kamchad Mongkolkul, Dr.Chuchit Plengvidhya, M.D., and Dr.Varapan Danutra for their kindly assistance from the beginning to end.

I am indebted to the Graduate School Foundation; Professor Police Colonel Dr.Thaval Asanasen, M.D., Head of Department of Forensic Medicine; and Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy; Chulalongkorn University, for providing me the grant and laboratory facilities.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vii
ACKNOWLEDGEMENT	x
TABLE OF CONTENTS	xi
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii

CHAPTER

1. INTRODUCTION	1
2. MATERIALS AND METHODS	18
3. RESULTS	27
4. DISCUSSION	52
5. CONCLUSION AND RECOMMENDATION	60
BIBLIOGRAPHY	64
VITA	79

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Characteristic of lactic acid dehydrogenase isoenzymes -	9
2.	Various conditions used in the electrophoresis of plasma proteins ----------	28
3.	Activity of lactic acid dehydrogenase isoenzymes in plasma of normal subjects and patients with myocardial infarction ----------	40
4.	Plasma lipids concentrations of normal subjects and patients with myocardial infarction ----------	51

LIST OF FIGURES

Figure — Page

1. The electrophoretograms of plasma proteins and LDH isoenzymes obtained from electrophoresis under different conditions ---------- 29
2. Electrophoretograms comparing different methods used for the staining of LDH isoenzymes ---------- 31
3. Electrophoretograms comparing the staining solution of Fritz et al (1970) in glycine buffer ---------- 32
4. Electrophoretograms comparing results obtained when lipoproteins were stained ---------- 34
5. The relative location of plasma LDH isoenzymes to that of proteins ---------- 36
6. Different electrophoretic patterns of LDH isoenzymes peaks found in normal subjects ---------- 37
7. Rate of reaction of LDH isoenzymes from plasma of a patient with myocardial infarction and a normal subjects 39
8. The changes of activities of isoenzymes in plasma samples of a patient with myocardial infarction comparing with those of plasma proteins and LDH isoenzymes of a normal subject ---------- 41
9. Total activities of lactic acid dehydrogenase isoenzymes in plasma samples from 22 patients with myocardial infarction ---------- 43

Figure Page

10. Urea-stable activities of lactic acid dehydrogenase isoenzymes in plasma samples from 22 patients with myocardial infarction ---------- 44

11. Heat-stable activities of lactic acid dehydrogenase isoenzymes in plasma samples from 22 patients with myocardial infarction ---------- 45

12. Mean activities of lactic acid dehydrogenase isoenzymes in plasma samples from 22 patients with myocardial infarction ---------- 46

13. Mean activities of five LDH isoenzymes in plasma samples from 22 patients with myocardial infarction ---------- 47

14. A calibration curve of cholesterol ---------- 49

15. A calibration curve of triglycerides ---------- 50