

ระดับ ฮีโมโกลบิน เอ₁ ในคนสุขภาพปกติ และผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติก

ศิวพร คุปตเมธี วัธนา ฤทธิมัต และทัศนีย์ เล็บนาค

บทคัดย่อ : คณะผู้รายงานได้ศึกษาระดับ ฮีโมโกลบิน เอ₁ หรือ กลัยเคทฮีโมโกลบิน ในเลือดคนสุขภาพปกติ 40 คน และผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติก 20 รายโดยใช้วิธี Micro-column cation exchange chromatography พบว่าทั้งในคนสุขภาพปกติและผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติก มีระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เท่ากับร้อยละ 6.74 ± 0.58 และ 4.81 ± 0.64 ของฮีโมโกลบินรวมตามลำดับ จากผลการศึกษพบว่าผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติก มีระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ต่ำกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.00001$) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าร้อยละของเรติคูลัสซีด ทั้งในคนปกติและผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติก ($r = -0.090, p > 0.05$ และ $-0.144, p > 0.05$ ตามลำดับ) ผลการศึกษานี้สนับสนุนว่าระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ในเลือดเป็นสัญญาณแสดงว่ามีการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติก (คำรหัส : ฮีโมโกลบิน เอ₁, ภาวะโลหิตจางฮีโมลิติก) วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ ปีที่ 22 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2532 หน้า 17-23

Abstract : Hemoglobin A₁ Levels in Healthy Subjects and Patients with Hemolytic Anemia. Kuptamethi S, Ridthimat W, Lebnark T.

Hemoglobin A₁ level was determined by microcolumn cation exchange resin chromatography in 40 normal subjects and 20 hemolytic anemic patients. Levels of hemoglobin A₁ (mean \pm SD) in normal subjects and hemolytic anemic patients were respectively $6.74 \pm 0.58\%$ and $4.81 \pm 0.64\%$ of total hemoglobin. The mean hemoglobin A₁ level in hemolytic anemic patients was significantly lower than normal subjects ($p < 0.00001$). No significant correlation was found between the hemoglobin A₁ level and reticulocyte count in normal subjects and hemolytic anemic patients, with r values of -0.090 ($p > 0.05$) and -0.144 ($p > 0.05$) respectively. The results confirm that hemoglobin A₁ level may be used as indicator for hemolysis in hemolytic anemia. (Keyword : hemoglobin A₁ , hemolytic anemia, hemolysis) Bull Chiang Mai AMS 1989; 22(1): 17-23

ภาควิชาคลินิคัลไมครอสโคปี
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ฮีโมโกลบินเอ₁ หรือ กลัยเคซีฮีโมโกลบิน (HbA₁ or glycated hemoglobin) เป็นส่วนประกอบจำนวนน้อยของฮีโมโกลบิน เกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างน้ำตาลกับฮีโมโกลบินเอโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์⁽¹⁾ โดยกลไกนี้จะเข้ามาเชื่อมติดกับปลายหมู่أمين ที่ตำแหน่งปลายด้านไนโตรเจน (N-Terminal) ของสายเบต้าโกลบิน⁽²⁾ การรวมตัวกับกลูโคสกลายเป็นฮีโมโกลบินเอ₁ จึงขึ้นกับการควบคุมและรักษาโรคเบาหวานระยะยาวได้^(3,4) การใช้อธิ gel electrotrofocusing สามารถแยกฮีโมโกลบินเอ₁ เป็นหน่วยย่อยตั้งแต่เอ_{1A} จนถึงเอ_{1E}⁽⁵⁾ ในคนปกติมีปริมาณฮีโมโกลบินเอ_{1c} มากที่สุดโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 4-6 ของ ฮีโมโกลบินเอ คิดเป็นร้อยละ 70 ของ ฮีโมโกลบินเอ₁⁽⁶⁾ ดังนั้น ระดับฮีโมโกลบินเอ₁ และ ฮีโมโกลบินเอ_{1c} จึงมีความสัมพันธ์กันมากที่สุด ในทางปฏิบัตินิยมหาระดับฮีโมโกลบินเอ₁ อย่างเดียว กระบวนการกลัยโคซิเลชันของฮีโมโกลบินเอ₁ เกิดขึ้นอย่างช้าๆ และดำเนินต่อไปตลอดช่วงอายุของเม็ดเลือดแดง⁽⁷⁾ เมื่อมีระดับน้ำตาลในเลือดปกติ การหาระดับฮีโมโกลบินเอ₁ ใช้น้ำเป็นตัวบ่งบอกอายุของเม็ดเลือดแดงได้ โดยเม็ดเลือดแดงในระยะตัวแก่จะมีระดับฮีโมโกลบินเอ₁ สูงกว่าในระยะตัวอ่อน⁽⁸⁾ ดังนั้นผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ซึ่งมีอายุของเม็ดเลือดแดงสั้นกว่าปกติเนื่องจากมีการแตกทำลายมาก จึงน่าจะมีระดับฮีโมโกลบินเอ₁ ต่ำ คณะผู้รายงานได้ทำการวัดระดับฮีโมโกลบินเอ₁ โดยวิธี Microcolumn cation exchange chromatography เปรียบเทียบระหว่าง ค่าของคนปกติ และผู้ป่วยภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ชนิดที่ 1 ชนิดที่ 1 ชนิดที่ 1 และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของฮีโมโกลบินเอ₁ และค่าร้อยละของเรดิคัลโซลซัยด์ด้วย

วัตถุประสงค์และวิธีการ

ประชากรที่นำมาศึกษาเป็นคนไทยสุขภาพปกติ ได้แก่ นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ 40 คน เป็น

ชาย 20 ราย และหญิง 20 ราย อายุระหว่าง 20-30 ปี, และผู้ป่วยภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ชนิดที่ 1 ชนิดที่ 1 ชนิดที่ 1 อายุระหว่าง 20-40 ปี 20 ราย ซึ่งเกิดจากอโรคีต่อมมุน 7 ราย จากกาได้รับยา 9 ราย, Congenital spherocytosis 3 ราย และ Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria 1 ราย ผู้ที่นำมาศึกษามีระดับโดยเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน 10.24 ± 2.77 กรัม/ดล. ฮีมาโตครีท ร้อยละ 31.18 ± 8.02 และจำนวนเม็ดเลือดแดง 3.04 ± 0.85 x 10¹² เซลล์/ลิตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผู้ป่วยฮีโมโกลบินอี เทรต 7 ราย และ เบต้า ธาลัสซีเมีย เทรต 3 ราย โดยมีระดับฮีโมโกลบินเฉลี่ย 11.87 ± 1.44 กรัม/ดล. ฮีมาโตครีท ร้อยละ 35.12 ± 3.75 และจำนวนเม็ดเลือดแดง 4.96 ± 0.74 x 10¹² เซลล์/ลิตร ทุกรายอยู่ในสภาพปกติ มีระดับฮีโมโกลบินเอ₁ ปกติ ไม่เป็นเบาหวาน และไม่เคยได้รับการให้เลือดมาก่อนในระยะ 4 สัปดาห์

การศึกษา เริ่มด้วยการเก็บเลือดจากหลอดเลือดดำร้อยละ 10 มล. ใส่สารอัติที่เอ็กส์เลือดแข็งตัว ทำการตรวจหาระดับฮีโมโกลบินเอ₁ โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Boehringer Mannheim สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน ซึ่งใช้วิธี Microcolumn cation exchange chromatography ทดสอบซ้ำ 2 ครั้งในหลอดตัวอย่างแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ค่าทางโลหิตวิทยาอื่นที่ศึกษาได้แก่ ระดับฮีโมโกลบิน, ฮีมาโตครีท, ลักษณะ เม็ดเลือดแดงบนสไมร์รีย้อมด้วยสีไรท์และค่าร้อยละของเรดิคัลโซลซัยด์ โดยวิธีมาตรฐาน⁽⁹⁾ นับจำนวนเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ หาระดับฮีโมโกลบินเอ₁ โดยวิธี alkaline denaturation⁽¹⁰⁾ แยกชนิดฮีโมโกลบินโดยวิธี starch gel electrophoresis ใน Tris-borate-EDTA บัฟเฟอร์, pH 8.6, และย้อมด้วยสี O-dianisidine⁽¹¹⁾ หาค่าร้อยละของฮีโมโกลบินแต่ละ

ชนิด โดยการชะออกจากเซลล์โลหะซีเตภาย
หลังจากการแยก (12)

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงระดับฮีโมโกลบิน เอ₁
(ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในเม็ด
เลือดแดงของคนสุขภาพปกติ, ผู้ป่วยภาวะโลหิต
จางชนิดฮีโมกลินดีก, ฮีโมโกลบิน อีเทรต และ

เบต้า ธาลัสซีเมีย เทรต ซึ่งเห็นได้ว่าระดับฮีโม
โกลบิน เอ₁ เฉลี่ยในกลุ่มผู้ป่วยภาวะโลหิตจาง
ชนิดฮีโมกลินดีก มีค่าต่ำกว่าปกติ อย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติ ($p < 0.00001$) โดยที่ทุกรายจะได้
ค่าต่ำกว่าเกณฑ์ปกติส่วนระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ใน
ฮีโมโกลบิน อี เทรต และ เบต้า ธาลัสซีเมีย
เทรต อยู่ในเกณฑ์ปกติ

ตารางที่ 1 แสดงระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ และค่าร้อยละของเรติคิวโลซัยต์ในคนสุขภาพปกติ ผู้ป่วยภาวะ
โลหิตจางชนิดฮีโมกลินดีก ผู้ป่วยฮีโมโกลบิน อีเทรต และผู้ป่วยเบต้า ธาลัสซีเมีย เทรต

Subject	No.	HbA ₁ (%)		Reticulocyte (%)
		$\bar{X} \pm SD$	Range	$\bar{X} \pm SD$
Normal	40	6.74 \pm 0.58	5.65-8.34	0.61 \pm 0.31
Hemolytic anemia	20	4.81 \pm 0.64*	3.44-5.54	6.44 \pm 5.57**
HbE trait	7	6.58 \pm 0.94	5.75-8.14	1.12 \pm 0.58
β Thalassemia trait	3	7.22 \pm 0.11	7.14-7.35	0.96 \pm 0.33

* $p < 0.00001$; ** $p < 0.05$

สำหรับค่าร้อยละของเรติคิวโลซัยต์ พบว่า
มีค่าสูงกว่าปกติ ในกลุ่มผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิด
ฮีโมกลินดีก ($p < 0.05$) ส่วนในผู้ป่วยฮีโมโกล
บิน อี เทรต และ เบต้าธาลัสซีเมียเทรต มีค่าใกล้
เคียงกับปกติ (ตารางที่ 1) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์
ระหว่างระดับของฮีโมโกลบิน เอ₁ และค่า
ร้อยละของเรติคิวโลซัยต์ในคนปกติ และผู้ป่วย
ภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมกลินดีก พบว่าไม่มีความ
สัมพันธ์กัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ
 -0.090 ($p > 0.05$) และ -0.144 ($p >$
 0.05) ดังในรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

วิจารณ์

ผลจากการศึกษาพบว่าระดับฮีโมโกลบิน เอ₁
ในเม็ดเลือดแดงของคนสุขภาพปกติมีค่าใกล้เคียง
กับรายงานอื่น (13-15) สำหรับฮีโมโกลบิน เอ₁

ในผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมกลินดีก มีระดับต่ำ
กว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.00001$)
ซึ่งตรงกับรายงานของ Panzer และคณะ (13)
ซึ่งให้เหตุผลว่า เม็ดเลือดแดงที่มีอายุสั้นเนื่อง
จากการแตกทำลายมากในผู้ป่วยภาวะโลหิตจาง
ชนิดฮีโมกลินดีก มีระยะเวลาการรวมตัวระหว่าง
น้ำตาลและฮีโมโกลบินสั้นลง เป็นผลให้ระดับฮีโม
โกลบิน เอ₁ ต่ำลง ในการศึกษาผู้ที่ เป็นพาหะ
ของโรคซึ่งได้แก่ ฮีโมโกลบิน อี เทรต และ
เบต้า ธาลัสซีเมีย เทรต พบว่ามีระดับฮีโมโกล
บิน เอ₁ ปกติ เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับค่าร้อยละของ
เรติคิวโลซัยต์ ในกลุ่มพาหะของโรคดังกล่าวซึ่ง
ได้ค่าใกล้เคียงกับปกติ จึงช่วยสนับสนุนว่ามีผู้ที่
เป็นพาหะของโรค ฮีโมโกลบิน อี และพาหะของ
โรคเบต้า ธาลัสซีเมีย มีอายุของเม็ดเลือดแดง
ปกติ (16) จึงมีการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง

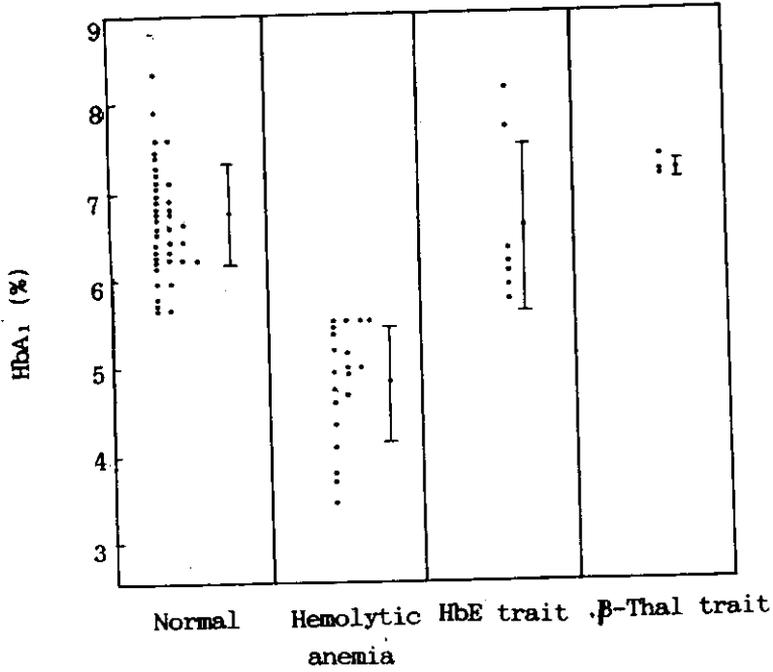


Figure 1 Distribution of HbA₁ in normal, Hemolytic anemia and β Thalassemia trait

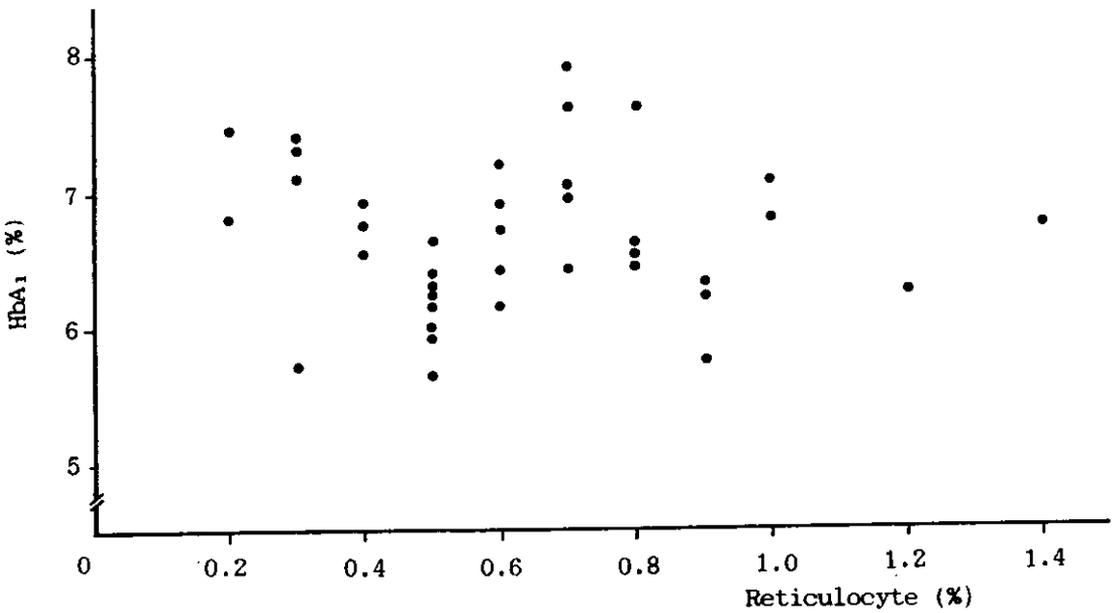


Figure 2 Correlation of HbA₁ level and percentage of reticulocyte in normal person.

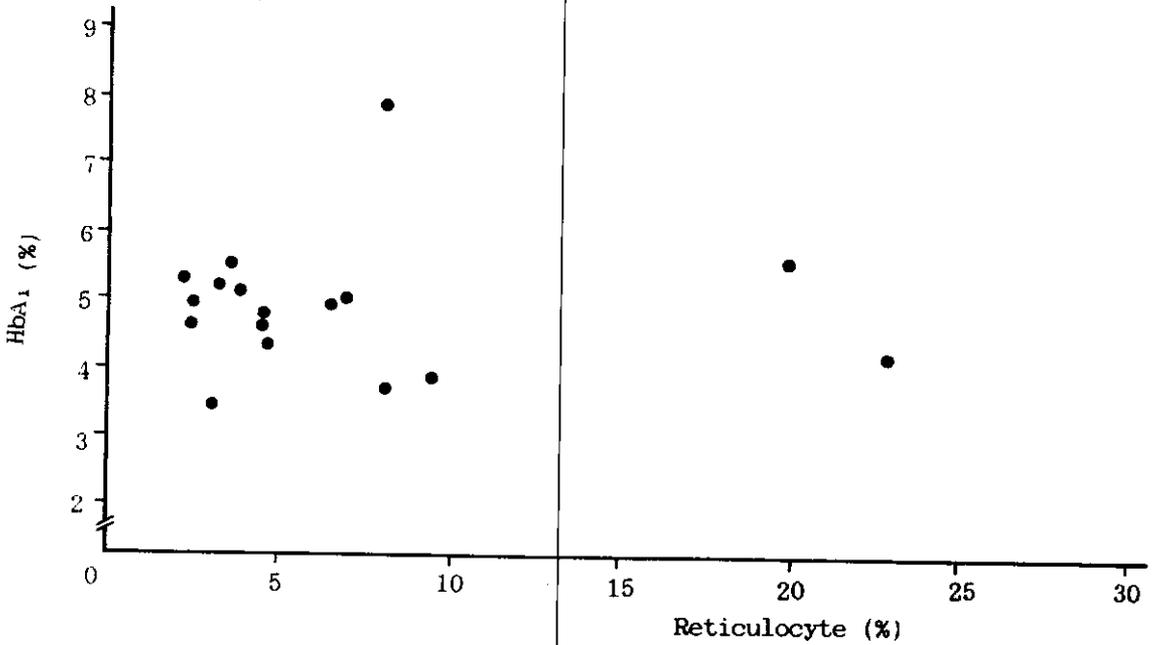


Figure 3 Correlation of HbA₁ level and percentage of reticulocyte in hemolytic anemia patients.

น้อยมากหรือไม่มีเลย (17) ดังนั้นระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ จึงสามารถบ่งชี้ถึงความรุนแรงของการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในร่างกายได้เนื่องจาก มีความสัมพันธ์โดยตรงกับอายุของเม็ดเลือดแดง (13)

ในผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติก ซึ่งมีความร้อยละของเรติคิวโลซัยต์สูงกว่าปกติ จะมีระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ต่ำกว่าปกติ แต่ฮีโมโกลบิน เอ₁ เทรด และเบต้าธาลัสซีเมีย เทรด ซึ่งมีค่าร้อยละของเรติคิวโลซัยต์ใกล้เคียงกับปกติ จึงมีระดับของฮีโมโกลบิน เอ₁ ปกติ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าระดับของ ฮีโมโกลบิน เอ₁ มีความสัมพันธ์กับอายุของเม็ดเลือดแดงในเมื่อมีระดับน้ำตาลในเลือดปกติ โดยเม็ดเลือดแดงที่มีอายุนั้นจะมีระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ต่ำ ส่วนการที่ระดับของฮีโมโกลบิน เอ₁ ในผู้ป่วยภาวะโลหิตจางชนิดฮีโมลิติกไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติกับค่าร้อยละของเรติคิว

โลซัยต์ ($r = 0.144, p > 0.05$) เช่นเดียวกับในคนปกติ ($r = 0.090, p > 0.05$) นั้นอาจเนื่องจาก ตัวอย่างเลือดที่นำมาหาระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ไม่ได้แยกเอาเฉพาะเรติคิวโลซัยต์มาทำการทดสอบ และเม็ดเลือดแดงในระยะตัวแก่และเรติคิวโลซัยต์ที่มีอายุต่างๆ กันจะมีระดับของฮีโมโกลบิน เอ₁ แตกต่างกันได้ (๘)

จึงเห็นได้ว่า การหาระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ในเม็ดเลือดแดงนอกจากจะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการวินิจฉัย และติดตามผลการรักษาโรคเบาหวานแล้ว ผลจากการศึกษาวิจัยยังช่วยสนับสนุนว่าระดับฮีโมโกลบิน เอ₁ ที่ต่ำลงใช้เป็นเครื่องชี้ว่ามีภาวะเลือดจางเกิดขึ้น เนื่องจากเม็ดเลือดแดงแก่กว่าหรือมีอายุนั้นได้ อย่างไรก็ตามการหาปริมาณฮีโมโกลบิน เอ₁ โดยวิธี Microcolumn cation exchange chromatography จะให้ค่าสูงเกินความเป็นจริงในผู้ป่วยที่มีระดับฮีโมโกล

บินเอพอง (18) จะเน้นการหาปริมาณฮีโมโกลบิน เอ₁ โดยวิธีนี้ จึงต้องคำนึงถึงระดับของฮีโมโกลบินเอพด้าย

กิตติกรรมประกาศ ขอขอบคุณ คุณบุศรา แซ่โจ้ว สาขาโลหิตวิทยา และ คุณจุฬาลักษณ์ ภิรมลตรี หน่วยระบาดวิทยาคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ช่วยงานการแยกชนิดและหาค่าร้อยละ ของ ฮีโมโกลบิน และกรรมวิธีวิเคราะห์ค่าสถิติให้ เอกสารอ้างอิง

1. Stevens VJ, Vlassara H, Abati A, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1977; 252: 2998-3002.
2. Bunn HF, Gabby KH, Gallop PM. The glycosylation of haemoglobin : Relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978; 200: 21-27.
3. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984; 310: 341-346.
4. Gabbay KH, Hastly K, Breslow JL, et al. Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 859-869.
5. McDonald MJ, Shapiro R, Bleichman M, et al. Glycosylated minor components of human adult hemoglobin: purification, identification and partial structural analysis. *J Biol Chem* 1978; 253: 2327-2331.

6. Horton BF, Huisman THJ. Studies on the heterogeneity of hemoglobin. VII Minor hemoglobin components in hematological diseases. *Br J Haematol* 1965; 11: 296-304.
7. Bunn HF, Haney DN, Kamin S, et al. The biosynthesis of human haemoglobin A_{1c} : Slow glycosylation of haemoglobin in vivo. *J Clin Invest* 1976; 57: 1652-1659.
8. Fitzgibbons JF, Kohler RD, Jones RT. Red cell age related changes of haemoglobin A_{1a+b} and A_{1c} in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1976; 58: 820-824.
9. กนกนาก ชูบุญญา, ทัดนัย เลื่อนาค, สรุต ฒ สงขลา. คู่มือการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการ เล่ม 1. โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ, 2528; 52-56, 100-104, 115-119.
10. Betke K, Marti HR, Schlicht I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature* 1959; 184: 1877-1878.
11. Smithies O. An improved procedure for starch-gel electrophoresis : Further variations in serum proteins of normal individuals. *Biochem J* 1959; 71: 585-587.
12. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose ace-

HbA₁ in Hemolytic Anemia

- tate. J Clin Pathol 1965; 18: 790-792.
13. Panzer S, Kronik G, Lechner K, et al. Glycosylated haemoglobins (GHb) : an index of red cell survival. Blood 1982; 59: 1348-1350.
 14. Pulman G, Laker MF, Fail B, Alberti KGM. Haemoglobinopathies and glycosylated hemoglobin estimation. Br Med J 1984; 289: 1001-1002.
 15. Saitta G, Catalano C, Artenisio AC. Glycosylated haemoglobin in carriers of β thalassemia trait. Br Med J 1984; 289: 1382-1383.
 16. Kaplan E, Zuelzer WW. Erythrocyte survival studies in childhood: II. Studies in Mediterranean anemia. J Lab Clin Med 1950; 36: 517-523.
 17. Weatherall DJ, Clegg JB. The β -thalassaemias. In : The thalassaemia syndromes. 3rd ed. Blackwell Scientific Publication, 1981.
 18. Krause JR, Stolz V, Campbell E. The effect of hemoglobin F upon glycosylated hemoglobin determinations. Am J Clin Pathol 1982; 78: 767-769.

Siriporn Kuptamethi

Dept. of Clinical Microscopy,
Faculty of Medical Technology,
Mahidol University,

Bangkok 10700

THAILAND