

บทความทันวิชาการ

กลายาโคซิเลทาโปรตีน : นัยสำคัญทางคลินิก

นันทยา ชนะรัตน์*

เป็นที่ทราบกันมานานกว่า 30 ปีแล้วว่า ภาวะเม็ดเลือดแดงของคน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน A₀, F และ A₂ นอกจากนี้ยังมีฮีโมโกลบิน A_{minor} ซึ่งเคลื่อนที่ได้เร็วในสนามไฟฟ้า (Fast moving hemoglobin, FMH) และ FMH นี้จะสูงขึ้นผู้ป่วยเบาหวาน ในปี ค.ศ. 1968 Schroder และ Holmquist⁽¹⁾ ได้สรุปเรื่องราวเกี่ยวกับ HbA_{1c} ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ FMH ที่มากที่สุดและมีค่าคงที่คือประมาณ 5-7% ในคนปกติว่ามีโครงสร้างประกอบด้วย aldehyde หรือ ketone ต่อกับปลาย N- ของกรดอะมิโนของ β -chain ของฮีโมโกลบินโดยปฏิกิริยาของ Schiff base และคาดว่ามีความสัมพันธ์คล้ายกับ long chain aliphatic lipid และในปีเดียวกัน Rahbar ได้รายงานว่าผู้ป่วยเบาหวานมี HbA_{1c} เพิ่มขึ้นประมาณเท่าตัวของคนปกติ และต่อมาได้มีรายงานพบว่าส่วนที่ต่อกับปลาย N-valine คือ hexose และมีการศึกษากันต่อมาอีกมากมายถึงปฏิกิริยา nonenzymatic glycosylation ที่เกิดกับฮีโมโกลบินและโปรตีนต่างๆ โดยขึ้นกับจำนวน valyl และ lysyl residue ในโครงสร้างเป็นสำคัญ

ความสนใจของแพทย์และนักเคมีคลินิกเกี่ยวกับ glycosylated protein (g-protein) สรุปได้เป็น 2 ด้านคือ

ก. การศึกษาโปรตีนที่มีอายุสั้นหรือปานกลางได้แก่ g-Hb โดย Trivelli และคณะในปี ค.ศ. 1971⁽²⁾ และต่อมาคือ g-albumin⁽³⁻⁵⁾ เพื่อใช้เป็นดัชนีเกี่ยวกับการควบคุมโรคเบาหวาน ปัจจุบันได้นำมาใช้กันค่อนข้างมาก

ข. การศึกษาโปรตีนที่มีอายุยาว หรือโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง เพื่อความสัมพันธ์กับการเกิด

เบาหวานเรื้อรัง และใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึง aging process ได้เช่น lens crystalline, คอลลาเจน และเมมเบรนของโกลเมอรูลัส เป็นต้น

ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโน โดยเฉพาะ lysine และ valine กับน้ำตาลที่มีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ ได้มีรายงานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1912 และนักเคมีอาหารรู้จักกันมานาน Maillard หรือ Browning reaction ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมี 3 ขั้นตอนด้วยกันคือ

1. การรวมตัว (Condensation) ระหว่างกรดอะมิโนของโปรตีน กับหมู่อัลดีไฮด์ของ reducing sugar เกิดเป็น Schiff base (Aldimine) และมีน้ำเกิดขึ้น 1 โมเลกุล จากนั้นจะเกิดการเรียงตัวใหม่ (Amadori rearrangement) โดย cyclization และ isomerization เกิดเป็นสารประกอบ 1-amino-1-deoxy-2-ketose หรือ ketoamine ปฏิกิริยาขั้นตอนนี้ aldopentose จะเกิดได้ดีกว่า aldohexose และ disaccharide

2. การตัดกรดอะมิโน ออกจากสารประกอบที่เกิดขึ้น ตามด้วยปฏิกิริยา dehydration, cyclization, dehydration หรือ amine condensation เกิดเป็น hydroxymethylfurfural, reductones, dehydroreductones และ α -dicarbonyls และถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นจะเกิด dehydration ของกรดอะมิโนไปเป็นอัลดีไฮด์และมี pyrrole, pyrazine และ sugar degradation product เกิดขึ้น เป็น aromas ในกระบวนการปรุงอาหาร

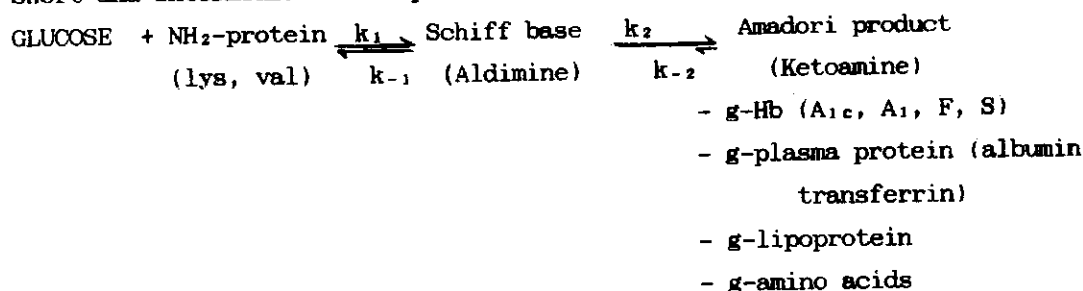
* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

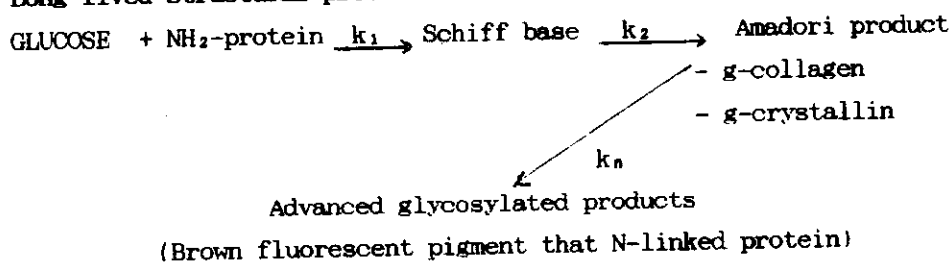
3. เป็นปฏิกิริยา polymerize ของสาร
ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนที่ 2 กลายเป็นสารสีน้ำตาลซึ่ง

อาจจะละลายหรือไม่ละลายน้ำก็ได้ จนโปรตีนที่มี
อายุยาว แสดงถึง aging process

Short and intermediate life protein :



Long lived structural protein :



ในร่างกาย สามารถพบสาร aldimine และ ketoamine ได้ โดยเพิ่งเริ่มมีรายงานกัน มากในระยะ 10 ปีเศษมานี้ จนเมื่อเล็ดแดง กลูโคส กาแลคโตส และ phosphorylated derivatives ของมันจะทำปฏิกิริยากับ terminal valine ของ α - และ β -Hb chain และกับ valyl, lysyl และกรดอะมิโนอื่นๆ ที่มี E-NH₂ หมอสรซึ่งอาจจะไม่ชัดปลายสุด ของโซ่ก็ได้ แต่เกิดน้อยกว่า ได้แก่ α -lys 7, α -lys 16, α -lys 40, α -lys 61, β -lys 8, β -lys 17 และ β -lys 66 เกิดเป็น glycosylated และ galactosylated ฯลฯ ของโปรตีน ขั้นตอนจะเกิดเป็น reversible schiff base (aldimine) ซึ่งไม่คงตัว เช่น β -N-valyl-1-deoxyglucose (Glucosyl-valine) จากนั้นจะเกิด Amadori rearrangement ไปเป็น relatively reversible

1-deoxy-2-ketose Hb adduct (Ketoamine, β -N-valyl-1-deoxyfructose หรือ ที่เรียกว่า fructosamine) หมอ valine จะเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่ากรดอะมิโนอื่นและเมื่อกลายเป็น ketoamine จะมี isoelectric point ลดลงทำให้เป็น HbA_{1c} แยกออกมาจาก HbA₁ ได้หลายวิธี ส่วน α -valine เกิดได้น้อยกว่า และเมื่อเกิดแล้วก็แยกจาก HbA₁ ได้ไม่ชัดเจน

Abraham และคณะ (6) ได้ใช้ Biorex cation exchange column ที่ 4 °ซ และ Na₂PO₄ gradient สามารถแยก Hb ที่มี protein-bound ketoamine เป็นส่วนต่างๆ ตามลำดับ ดังนี้

A1a1

A1a2

A1b1

A1b2

A1b3

A1c เป็นส่วนที่พบมากที่สุด ประมาณ 5%

A1d1

A1d2

A1d3 พบประมาณ 40% ของ HbA1c

ทั้ง HbA1c และ HbA1d3 จะเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน และ HbA1c จะใช้เป็นดัชนีที่ดีกว่า ประมาณ 10% ของ HbA1c จะอยู่ในรูปของ pre-HbA1c และอัตราการเกิดของ HbA1c และระดับของมันจะขึ้นอยู่กับระดับของกลูโคส, ระยะเวลาที่มีกลูโคสสูง และอายุของเม็ดเลือดแดง

Hb และโปรตีนปกติทุกตัวสามารถเกิด glycosylation ได้ เช่นเดียวกับ myoglobin แม้ว่าจะมี terminal valine โดยอาจเกิดที่ไลซีน ในคนพบ myoglobin ที่ถูก glycosylated ได้โดยเฉลี่ยประมาณ 2.3%

สำหรับอัลบูมินซึ่งเป็นโปรตีนในพลาสมา (มีอายุ ครึ่งชีวิต 20 วัน) เป็นตัวที่ได้รับความสนใจมากที่สุด พบว่า Lys-199, 525 มีค่า pKa ต่ำ จึงเกิด glycosylation ได้ง่ายกว่าที่อื่น และที่ Lys-199 เป็นจุดที่มีการรวมตัวกับ acetylsalicylate (แอสไพริน) ได้ดีเดียว ดังนั้น แอสไพรินจึงสามารถยับยั้งการเกิด glycosylation ของอัลบูมินได้ถึง 50% ในปี ค.ศ. 1979 สามารถแยกอัลบูมิน ออกจากซีรัมของคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวาน พบว่ามีค่า 8% และ 16% ตามลำดับ โปรตีนอื่นที่ศึกษากันคือ transferrin และ ceruloplasmin ซึ่งมีอายุครึ่งชีวิต 8 และ 4 วันตามลำดับ

Glycosylated fibrinogen และ fibrin มีการศึกษากันทั้งภายในและภายนอก ร่างกาย โดยเมื่อมีการแข็งตัวของเลือด Factor VIII จะทำหน้าที่เป็น transglutaminase ทำให้เกิด intermolecular cross-link ระหว่างกลูตามีนและไลซีน กับไฟ

บรินโมเลกุลถัดไปเพื่อทำหน้าที่โปรตีนคงตัวอยู่ แต่เมื่อเกิด glycosylation จะทำหน้าที่ตำแหน่งไลซีนไม่กว้างจึงไม่สามารถรักษาสภาพคงตัวนี้ได้(๖)

ในไลโปโปรตีนพบว่าการ glycosylate มากในส่วนของ low density lipoprotein (LDL) และพบได้นาน high density lipoprotein (HDL) ด้วย(๘)

โปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงรวมทั้ง spectrin มีการศึกษาพบการ glycosylation ร่วมกับการทำหน้าที่ผิดปกติไปจากปกติ เช่นเดียวกับการ glycosylate โปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดขาว เกร็ดเลือด ลิ้มฟิชย์ และมาโครฟาจ จะมีความสัมพันธ์กับการทำหน้าที่ของมันด้วย

การ glycosylate โปรตีนของ lens crystallin เป็นที่น่าสนใจมาก(๙) เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีอายุยาว ทั้ง α - , β - และ γ -crystallins จะเกิดการรวมตัวกันระหว่างโมเลกุลและลดคุณสมบัติในการละลายลง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดต้อ (Cataracts) และโรคอื่นๆ ในผู้ป่วยเบาหวานหรือผู้สูงอายุ

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีอายุยาวอีกตัวหนึ่ง และเป็นโปรตีนที่มีมากในคน โดยพบใน fibrillar protein และ connective tissue ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผิวหนัง ผนังกะดูเอ็น และหลอดเลือด โครงสร้างและการทำงานของมันเป็นขึ้นกับ intra- และ intermolecular linking ของเส้นคอลลาเจน ที่เกิดจากการมีไลซีน และ hydroxylysine residue เมื่อเกิด glycosylate จึงมีผลต่อการ cross-linking(๑๐)

Glycosylation ของ myeline protein ทั้งระบบประสาทส่วนปลายและส่วนกลาง อาจมีผลต่อการทำงานของระบบประสาท

อินซูลิน และฮอร์โมนของต่อมพาราไทรอยด์ เป็นโปรตีนที่มีไลซีนและวาซีนมาก แต่เนื่องจากมีอายุสั้น จะพบ ketoamine ได้จำนวนน้อย จึง

ยังไม่เป็นที่สนใจกันแพร่หลาย (12)

การศึกษาการดัดแปรและแปรรูปของ glycosylated และขับออกทางปัสสาวะโดยวิธีการวิเคราะห์การดัดแปรใน NaBH₄-reduced hemolysate พบว่าปกติมี glycosylated lysine 67-86% และในผู้ป่วยเบาหวานจะมีระดับสูงกว่าประมาณ 1.5 เท่า

ในผู้ป่วยที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง มีการพบการเกิด galactosylation ของ LDL ด้วย

คุณสมบัติของโปรตีนที่เปลี่ยนไปหลังจากถูก glycosylate

1. ฮีโมโกลบิน พบว่าหลังการรวมตัวระหว่าง β -val 1 กับกลูโคสใน HbA_{1c} ทำให้รวมตัวกับ 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) ไม่ได้ การจับปล่อยกับออกซิเจนเปลี่ยนไป HbA_{1c} จับกับออกซิเจนได้มากขึ้น (13) ส่วน HbA_{1d3} ที่กลูโคสเกาะกับ α -val 1 และมี β -val 1 วางอยู่จึงรวมกับ 2,3-DPG ได้ oxygen dissociation curve เหมือนกับ HbA₀

2. โปรตีนในพลาสมา

ก. อัลบูมิน ปกติจะมีตำแหน่งที่รวมตัวกับสารต่างๆ ได้มากมาย เช่น กลูโคส กรดไขมัน อิสระ บิลิรูบิน หรือยาต่างๆ เป็นต้น เมื่อถูก glycosylate จะมีคุณสมบัติในการละลายและการเคลื่อนตัวในโครมาโตกราฟีเปลี่ยนไป แต่การทำหน้าที่อื่นยังคงเดิม เมื่อโปรตีนในซีรัมสดทำปฏิกิริยากับ ¹⁴C-glucose แล้วตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก แยกด้วยอีเล็กโตรโฟเรซิสจะพบ ¹⁴C สูงสุด (55-58%) ที่ส่วนของอัลบูมินและ แอลฟา-1 กลูบูลิน (3)

ข. ไลโปโปรตีน ส่วน แคมมาโกลบูลินจะมีไขมันเป็นจำนวนมาก จึงเกิด glycosylate ได้มาก ทำให้คุณสมบัติในการช่วยยาคั่งเลือดแข็งตัวลดลง และทำให้ไลโปโปรตีนถูกย่อยโดยพลาสมินลดลงได้ 10-90% (14)

ค. LDL ปกติจะถูก glycosylate ประ

มาณ 2% แต่ในผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มเป็น 5% ทำให้ lysine residue มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป LDL สลายตัวลดลง 5-25% รายที่ควบคุมระดับน้ำตาลมาได้อาจลดลงถึง 8-27% ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการมีโคเลสเตอรอลสูงในผู้ป่วย

ง. โปรตีนอื่นๆ ในพลาสมาสามารถเกิด glycosylate ได้เช่นกัน แต่ไม่ค่อยมีรายงานการเปลี่ยนแปลงการทำงานหรือคุณสมบัติ ที่น่าสนใจคือ ทรานสเฟอร์ริน ซึ่งมีอายุครึ่งชีวิตเพียง 8 วัน สามารถใช้เป็นดัชนีติดตามระดับน้ำตาลย้อนหลังระยะสั้นได้

3. โปรตีนในเม็ดเลือดแดง โดยเฉพาะในเมมเบรนและ spectrin เมื่อเกิด glycosylation จะทำให้รูปร่างเปลี่ยนและอายุสั้นลง
4. โปรตีนที่มีอายุยาว Lens crystallin หรือเมมเบรนโปรตีนอื่น เช่น อัลฟาดีน คอเลสเตอรอล และไมอีลิน เมื่อเกิด glycosylation พบว่าอัตราการหมุนเวียน (turnover rate) เปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่จะเกิดสารสีน้ำตาล ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบอก กระบวนการของความแก่ได้ เช่น การเกิดต่อ หลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis) และการหนาตัวของเมมเบรนโกลเมอรูลัส เป็นต้น

วิธีการทำวิจัยทางเคมีและโปรตีน

1. การเก็บตัวอย่างเลือดและวิธีการตรวจ

การเจาะเก็บเลือด ทำได้ทั้งวิธี ตั้งแต่การเจาะจากปลายนิ้ว หลอดเลือดดำหน้าแขน หรือที่อื่นๆ สามารถเติมสารกันเลือดแข็งได้ เช่น เฮปาริน EDTA หรือซีเตรท ตัวอย่างเลือดสามารถนำมาตรวจได้ทั้งกลัยเคมิคโปรตีน และฮีโมโกลบิน โดยผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องอดอาหารมาก่อน และจะเจาะเลือดเวลาใดก็ได้ แต่ควรเลี้ยงเวลาหลังอาหารซึ่งพลาสมาขึ้นเนื่องจากโคเลสเตอรอล ทำให้ง่ายต่อการทดสอบได้ แต่ถ้าต้องการทำ oral glucose tolerance test หรือตรวจระดับน้ำตาลด้วย ก็จำเป็นต้องอดอาหารก่อน

วิธีการส่วนใหญ่ที่อ้างถึงในคลินิกควรจะนำ

ตัวอย่างมาตรวจหาปริมาณทันที แต่ถ้าทำไม่ได้ ควรเก็บไว้ ถ้าเป็นเลือด (whole blood) ควรเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4 °C ไม่เกิน 6 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ หรือมีฉะนั้น ควรทำเป็น hemolysate และกำจัดส่วนที่เป็นเซลล์ออกเสียก่อน เพื่อมิให้ผลการตรวจผิดไป ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งการเพิ่มขึ้นหรือลดลง ดังนี้

- การเพิ่มขึ้น เนื่องจากความชุ่นจากไขมันหรือมีเปลือกผิวของเม็ดเลือดแดง (stroma) หรือกลูโคสิสเริธอยู่ หรืออาจมีการสร้าง Hb-breakdown product หรือมีการรวมตัวระหว่างฮีโมโกลบินกับ oxidised glutathione เป็น HbA_{1d} ซึ่งเมื่อทำ short cation column chromatography จะเคลื่อนตัวไปพร้อม กับ HbA_{1a+b}

- การลดลงเนื่องจาก aldimein สลายตัว ดังนั้น ถ้าใช้วิธีที่ตรวจส่วน aldimein ก็จะ ทำให้ได้ค่าผิดพลาด ปัจจุบัน จึงนิยมทำในส่วน ของ ketoamine โดยทำเป็นรูป hemolysate หรือ dialyse ตัวอย่างตรวจก่อนเพื่อกำจัดกลูโคสิสเริธและอาจเติมน้ำยา sulfhydryl เช่น cysteine ลงไปใน hemolysate แล้วเก็บที่ 4 °C หรือถ้าจะหดยังชั้นก็ให้เก็บที่ -20 ถึง -80 °C

2. การเตรียมตัวอย่างตรวจ

มีหลายวิธีด้วยกัน สำหรับวิธีที่ง่ายเป็นมาตรฐาน สามารถใช้ได้กับวิธีการตรวจส่วนใหญ่คือการปั่นแยกพลาสมาออกโดยเร็ว ล้างเม็ดเลือดแดง 1-3 ครั้งด้วยน้ำเกลือเพื่อกำจัดกลูโคส จากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยน้ำยา hypotonic แล้วแยกส่วนที่เป็นเปลือกผิวออกไป ส่วนการตรวจกลัยเคโรโปรตีนในพลาสมา เตรียมตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก แล้วนำไปทดสอบ ถ้าเป็นการหาในส่วนของอัลบูมิน มีหลายวิธีสำหรับการเตรียมอัลบูมินให้บริสุทธิ์ วิธีที่แนะนำคือการใช้โครมาโตกราฟีของ Curling และคณะ (15) แล้ววัดส่วนที่เป็นกลัย

เคตด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี หรือการทำให้เกิดสีกับกรด thiobarbituric (TBA) สามารถประยุกต์ใช้ได้กับการตรวจกลัยเคโรโปรตีนชนิดอื่น เช่น โฟบรินเจน โกลิโปรตีน และโปรตีนของเนื้อเยื่อต่างๆ

สำหรับวิธีการตรวจที่ไม่สามารถแยกแยะระหว่าง aldimein และ ketoamine ควรกำจัดส่วนที่เป็น aldimein หรือ labile fraction ออกก่อน ซึ่งทำได้หลายวิธี ได้แก่ การอุ่นเม็ดเลือดแดง กับน้ำเกลือ หรือบัฟเฟอร์ที่ไม่มีกลูโคส นาน 12 ชั่วโมง หรือถ้าใช้กรดเฉพาะเพื่อสลาย aldimein ก็จะใช้เวลาน้อยลง เช่น borate หรือ acetate buffer 0.2-0.6 โมลาร์ ที่ pH 5-6 นาน 30 นาที และปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมีเพื่อสลาย aldimein เช่น semicarbazide 30 mM กับ aniline 12 mM หรือ sodium acetate buffer saline pH 5 นาน 30 นาที

3. วิธีการหาปริมาณ

วิธีการมีหลายอย่าง สำหรับงานทั่วไปที่ต้องการความรวดเร็วและแม่นยำ เดิมมีการใช้คอลัมน์สลับแบบ cation exchange กันมาก แต่ต้องกำจัด aldimein ออกก่อน ต่อมามีการดัดแปลงใช้ m-aminophenyl boronic acid เป็น affinity chromatography medium ทำให้การตรวจหา HbA₁, HbA_{1c} ได้จำเพาะ และแม่นยำขึ้น งานงานที่มีสิ่งส่งตรวจจำนวนมากๆ สามารถดัดแปลงใช้กับเครื่องอัตโนมัติ เช่น Automated high-pressure liquid chromatography, Agar gel electrophoresis ต่อกับ scanning densitometer เป็นต้น

วิธีอ้างอิงสำหรับการทำ gHb ใช้ Original long column cation exchange resin (2) ที่ใช้แยกฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมงทำให้ HbA_{1c} แยกออกจาก FHH ได้ชัดเจน แต่ไม่เหมาะสำหรับงานทางคลินิก จึงมีการดัดแปลงใช้คอลัมน์สั้นๆ โดย Trivelli ใน

ปี ค.ศ. 1977 เริ่มใช้กระบอกฉีดขนาด 20 มล. ยาว 5 ซม. ใช้เวลาประมาณ 2.5 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีการปรับปรุงให้ดีขึ้นเรื่อยๆ เพื่อพยายามให้มีการแยกตัวให้ดีขึ้น มีความแม่นยำ ทำได้ไว และง่ายต่อการเตรียมเรซินและบัฟเฟอร์ ทั้งการใช้ minicolumn (เป็นคอลัมน์ที่สั้น) และ microcolumn (เป็นคอลัมน์ที่แคบ) พบว่าวิธีที่คัดแปลงมานี้มีปัญหาความแปรปรวนเนื่องจากอุณหภูมิ โดยถ้าทำที่ 22-24 °C จะได้ผลสอดคล้องกับ macocolumn แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น 1 °C จะทำให้ HbA_{1c} เพิ่มขึ้น 0.5-1.0% ชัดเจนว่าทำให้สำเร็จรูปจึงมักบอกวิธีปรับแก้หรือบอกค่า factor ไว้ด้วย บางทีอาจใช้การปรับอุณหภูมิให้เป็น 23 °C อันอาจนำหรือใช้ระบบน้ำไหลเวียนรอบๆ บริเวณที่ทำ การคัดแปลงที่ทำได้เร็วขึ้น คือใช้การปั่นที่ 150-200 g 1 นาทีหลังจากหยอด hemolysate ลงบนเรซิน สามารถทำได้ 16 ตัวอย่าง ภายใน 15-30 นาที หรือการใช้เครื่อง high-pressure liquid chromatography⁽¹⁶⁾ โดยใช้ cation exchange resin เช่น Biorox 70 หรือสารอื่น เป็นวิธีที่ไวมากสำหรับการหา gHb หรือ g-protein อื่นๆ มี reproducibility ดี ใช้ตัวอย่างน้อย ทำได้ไว และคัดแปลงง่ายกับเครื่องอัตโนมัติ ค่าความเที่ยงดีทั้ง intra- และ inter-assay มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนประมาณ 1-3% ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตเครื่องมือจำหน่าย เช่น Beckman Instrum. Inc., Gilson Medical Electronics, Hewlett-Packard, LKB Instrum, Perkin-Elmer Instrum, Pharmacia, Shimadzu และ Waters เป็นต้น

เมื่อมีการค้นพบว่า boryl-substituted cellulose หรือ chromatographic supports อื่นๆ สามารถเกิดปฏิกิริยาเป็นสารเชิงซ้อนกับน้ำตาลได้ จึงมีการเสนอแนะให้ใช้ boronate ซึ่งมี high affinity ต่อ 1,2-cis diol ซึ่งมีอยู่ใน ketoamine แต่ในน้ำ

aldimine เช่นใน dihydroxyboryl-substituted cellulose หรือ polyacrylamide หรือ m-aminophenyl boronic acid เกาะบน agarose bead⁽¹⁷⁾ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ให้ผลแม่นยำ และมีความเที่ยงมากกว่าวิธี ion exchange เป็นวิธีที่นิยมกันมาก ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตเป็นชุดสำเร็จรูปจำหน่าย เช่น Pierce, Isolab เป็นต้น วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่นิยมใช้กันคือ เซลลูลอสอะซีเตท, agar และ agarose อดีหลักที่ HbA_{1c} มีประจุลบมากกว่า HbA₀ จึงมี isoelectric point (pI) ต่างไปประมาณ 0.1 pH unit⁽¹⁸⁾ ดังนั้น การหาปริมาณจึงทำได้ค่อนข้างยากด้วยวิธีธรรมดา มีการดัดแปลงให้แผ่นพลาสติก รองใต้เซลล์ลอสอะซีเตท และเติม dextran sulfate ลงในบัฟเฟอร์ ทำให้หมักเคลือบรวมกับ non-gHb จึงเร่งการเคลื่อนที่เรียกว่า Mobile affinity electrophoresis ใช้เวลาในการแยกประมาณ 40 นาที ในปี ค.ศ. 1977 มีการใช้ agar, agarose และ polyacrylamide gel โดยเติม active ligand ลงไปใน gel matrix แต่รายละเอียดยังมีรายงานน้อย การใช้ agar gel electrophoresis ใน matrix ที่มีประจุลบจำนวนหนึ่งซึ่งจะไปรวมกับ Hb ที่มีประจุต่างๆ กัน HbA_{1c} ซึ่งมีประจุลบมากกว่า HbA₀ จะวิ่งไปทางซ้ายมากกว่า การประยุกต์ใช้ pI ต่างๆ กันใน polyacrylamide gel หรือ Isoelectric focusing ทำให้มีการแยกตัวชัดเจนกว่าวิธีอื่นๆ ซึ่งใช้หลักการแยกตัวจากขนาดหรือประจุ ชุดสำเร็จรูปที่จำหน่ายจะใช้ ampholine หรือ pharmalyte pH 6-8 และ 7.9 พบว่าการใช้ flat bed electrophoresis โดยใช้ thin layer (0.5 มม.) polyacrylamide gel slab และ pH gradient 1 หน่วยระหว่าง 6.5-7.5 จะทำให้แยกตัวได้ดีกว่า

วิธีการทางภูมิคุ้มกัน Immunoassay เป็นวิธี

ทั้งความจำเพาะ และความไวสูง แต่การศึกษา
กันน้อย สำหรับการศึกษาปริมาณ HbA_{1c} (19) ทำ
โดยเตรียมแอนติซีรัมของแกะต่อ HbA_{1c} บริสุทธิ์
จากคน เมื่อทำการ adsorb เพื่อเพิ่มความจำ
เพาะต่อ HbA_{1c} และเกิดปฏิกิริยาน้อยที่สุดต่อ
HbA₀ พบว่ามีปฏิกิริยาไม่เฉพาะ สามารถจับกับ
HbA_{1a} และ HbA_{1b} 5% และ 10% ตามลำดับ
นอกจากแอนติซีรัมจากแกะแล้ว ยังมีรายงานการ
ใช้แอนติซีรัมจากกระต่ายด้วย

วิธี Photometry ใช้ปฏิกิริยาระหว่างน้ำ
ตาลที่หมักจนเป็นสารสีน้ำตาล กับกรดอะมิโนจะ
เกิดสารสีน้ำตาล (Maillard reaction)
เมื่อถูกย่อยด้วยกรดจะเปลี่ยนเป็น 5-hy-
droxymethylfurfural (HMF) ซึ่งเมื่อทำปฏิ
กิริยาต่อกับ 2-Thiobarbituric acid
(TBA) จะเกิดสารที่มีสีเหลือง ดูดกลืนแสงที่ประ
มาณ 440 นาโนเมตร สามารถหาปริมาณได้ทั้ง
g-protein และ g-Hb สารมาตรฐานที่ใช้คือ
fructose, 1-deoxy -1-morpholino-D-
fructose, HMF, lyophilized และ puri-
fied HbA_{1c} วิธีนี้มีความสัมพันธ์กับความแปร
ปรวนของ within และ between assay
เท่ากับ 2.8% และ 2.6% ที่ความเข้มข้น 7%,
3.2% และ 4.0% ที่ความเข้มข้น 13.6% ตาม
ลำดับ มีรายงานวิธีใช้ phenol-sulfuric
acid ซึ่งค่อนข้างอันตรายเนื่องจากต้องใช้พิษของ
ถึง 80% และกรดกำมะถันเข้มข้น แต่จากราย
งานอ้างว่าวิธีนี้มีความไวและความน่าเชื่อถือมาก
กว่าวิธีใช้ TBA (20)

การออกซิไดซ์น้ำตาลที่หมักแอลกอฮอล์ และเอป-
ซิลอนของโปรตีนด้วย periodate แล้ววัดการ
เรืองแสงที่เกิดขึ้นเนื่องจากฟอร์มาลดีไฮด์ เป็น
การวัดทั้ง aldimine และ ketoamine แต่
มีข้อเสียเหมือนกับวิธี short column ion
exchange chromatography ที่ต้องกำจัดส่วน
aldimine ออกก่อน (21)

วิธีที่เฉพาะสำหรับ gHb คือการเติม ino-

sitol hexaphosphate หรือ phytic acid
เพื่อไปรวมกับ 2,3-DPG ในโมเลกุลของ Hb ที่
ไม่ได้รวมกับน้ำตาล ทำให้การดูดกลืนแสงเปลี่ยน
ไปเป็น 560 และ 633 นาโนเมตร และสัมพันธ์
กันทางกลับกับ gHb หรือการเติม haptoglo-
bin เพื่อรวมกับ gHb เป็นสารเชิงซ้อน แล้ววัด
เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธี fluorometry

การหา g-protein ในซีรัมอาจทำได้โดยวิธี
ความสามารถของ ketoamine หรือ fructo-
samine ในการรีดิวซ์ของ nitroblue te-
trazolium salt (NBT) ที่ pH 10.8 ให้เป็น
สีของ formazan ทำได้รวดเร็วประมาณ 75
รายต่อชั่วโมง โดยมีความเที่ยงดีมาก ค่าสัมประ
สิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับประมาณ 2% (22)

การเปรียบเทียบผลระหว่าง gHb และ g-
protein พบว่า plasma fructosamine จะ
เป็นตัวแยกกลุ่มคนเป็น และไม่เป็นเบาหวานได้ดี
กว่า และเชื่อว่าจะเป็นตัวชี้เฉพาะต่อ g-pro-
tein มากกว่า เช่นการวัด g-albumin มีข้อดี
คืออัลบูมินมีปริมาณมากในพลาสมา เกินกว่า 60%
และอายุครึ่งชีวิตของอัลบูมินมีประมาณ 20 วันทำ
ให้เอนกการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลย้อนหลัง
ไปประมาณ 2-4 สัปดาห์ ส่วนโปรตีนอื่นๆ มักจะ
เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารหรือเป็น acute
phase response protein หรือเป็น coag-
ulation factor ที่มีค่าปกติช่วงกว้าง มีหน้าที่
และอายุต่างๆ กัน

Hayashi และ Makino ได้เสนอวิธี flu-
orometry (23) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายสำหรับการวัด
g-albumin โดยใช้ Dansylated phenyl
boronic acid [N-(5-dimethyl-amino-1-
naphthalene sulfonyl)-3-aminoben-
zene boronic acid] จะมี emission spec-
tra เปลี่ยนไปเมื่อรวมกับ cis-diols โมลิ
เลกุลของ Hb ทำให้อัตราปริมาณได้โดยตรงจาก
การวัด excitation และ emission maxi-
mum ที่ 330 และ 490 นาโนเมตรตามลำดับ

และกล้ามเนื้อหัวใจ มีค่าต่ำกว่าวิธี furosine HPLC จะตรวจวัดได้ (0.06 นาโนโมล ของ กลูโคส/มก.ของเนื้อเยื่อสด) และการมี α -amino acid ในปัสสาวะ พบว่ามีค่าเฉลี่ย 2.8 ไมโครโมล/24 ชั่วโมง/น้ำหนักตัว 1 กก.) ประกอบด้วยไขมันเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 67-86%

การเปลี่ยนแปลงของกลัยเคโรโปรตีน เกิดขึ้นในภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง มี glucose intolerance หรือมีภาวะน้ำตาลสูง-ต่ำ เป็นบางระยะ ทำให้เกิด glycosylation ได้มากกว่าปกติถึง 2-3 เท่า เช่น α Hb ปกติมีประมาณ 4-8% อาจเพิ่มขึ้นเป็น 20-30% โดยการเกิดเป็น ketoamine จะเกิดอย่างช้าๆ และย้อนกลับได้เล็กน้อย เมื่อระดับน้ำตาลเปลี่ยนไป ค่า α Hb จะถึงระยะคงที่ใน 3-4 สัปดาห์

ความสำคัญของการช่วยวินิจฉัยเบาหวาน

การศึกษากลัยเคโรโปรตีน มักจะทำโดยมีจุดประสงค์เพื่อ

1. เพื่อเป็นประวัติในการช่วยวินิจฉัยเบาหวาน
 2. ศึกษาเพื่อควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึม ได้แก่
 - ภาวะแทรกซ้อนของเบาหวาน
 - การเจริญของวัย (Aging)
 - การศึกษาอาการทางคลินิกเฉพาะโรค
- ในคน การศึกษากลัยเคโรโปรตีน แบ่งเป็น

3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่มีอายุสั้น เช่นเมดเลือดแดง, transferrin (อายุครึ่งชีวิต 8 วัน), อัลบูมิน (อายุครึ่งชีวิต 20 วัน)
2. กลุ่มที่มีอายุปานกลาง ได้แก่ โปรตีนของหัวใจ เซลล์เม็ดเลือดแดง และอีโมโกลบิน ซึ่งมีอายุประมาณ 120 วัน
3. โปรตีนที่มีอายุยาว ได้แก่ คอลลลาเจน, อีลาสติน, lens crystallin, ไมอิติน เป็นต้น

กลัยเคโรโปรตีน

ค่า HbA_{1c} (ketoamine) เป็นเปอร์

เซ็นต์ จะบอกถึงระยะเวลาในการมีกลูโคสระดับหนึ่ง จนพลาสมา หรือระดับกลูโคสอิสระในเม็ดเลือดแดง เนื่องจากการสร้าง α Hb แบบต่อเนื่องตลอดอายุของเม็ดเลือดแดง การศึกษา Biokinetic นอก ร่างกาย เกี่ยวกับการสร้าง และการสลายตัวของ ketoamine พบว่าจะเกิดระยะคงที่ของ HbA_{1c} ในเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์หลังจากการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคส การวิจัยสารเคมีทำให้เกิดเบาหวานในสัตว์ทดลองที่มีอายุเม็ดเลือดแดง และระดับน้ำตาลใกล้เคียงกับของคนเช่น สุนัข พบว่า HbA_{1c} เพิ่มขึ้นจากปกติ $2.81 \pm 0.35\%$ ไปเป็น $6.52 \pm 0.76\%$ เมื่อทำให้เกิดเบาหวานนาน 26 สัปดาห์

ผลการศึกษาในคนปกติ 10 คนอายุ 21-39 ปี มีค่า HbA_1 $6.8 \pm 0.56\%$; 10 คน อายุ 44-57 ปี มีค่า HbA_1 $6.5 \pm 0.99\%$; ผู้ป่วยเบาหวาน type I, II ที่เป็นหนุ่ม มีค่า HbA_1 $16.24 \pm 3.23\%$ และ $13.39 \pm 2.70\%$ เมื่อได้รับการรักษา มีค่า HbA_1 $17.92 \pm 1.56\%$ และ $12.71 \pm 1.62\%$; ผู้ป่วยเบาหวาน 15 คน เมื่อทำการรักษาระดับน้ำตาลมี $HbA_1 = 12.6 \pm 0.8\%$ เมื่อหยุดยา 3 สัปดาห์ มี $HbA_1 = 15.2 \pm 0.8\%$ ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 22 เมื่อให้ยาใหม่ทั้งสัปดาห์ที่ 20 มี $HbA_1 = 14.1 \pm 0.95$ และ $12.3 \pm 0.8\%$ ที่สัปดาห์ที่ 24 และ 28 ตามลำดับ

ระดับ α Hb จะสะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสที่ผ่านเข้าไปในเม็ดเลือดแดงในระยะ 5-8 สัปดาห์ที่ผ่านมา และแสดงถึงการสนองตอบต่ออาหาร หรือยาที่รักษาผู้ป่วยในระยะดังกล่าว ดังนั้น จึงควรตรวจวัดระดับ α Hb ห่างกันอย่างน้อย 4-6 สัปดาห์

การรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิด NIDDM มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้ HbA_{1c} กลับสู่ค่าปกติในช่วง upper limit แต่ผู้ป่วยเบาหวานชนิด IDDM ควรเลี้ยงเนื่องจากอาจจะทำให้เกิดภาวะน้ำตาลต่ำในเลือดได้ การตรวจวัดระดับ HbA_{1c} จะบอกได้ ถึงภาวะการรักษาตัวของผู้ป่วย ขณะอยู่ที่

บ้าน และบอกภาวะผู้ป่วย ได้ดีกว่าการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด หรืออินซูลินในปัสสาวะเพียงอย่างเดียว

การตรวจ labile gHb

ตั้งแต่มีการพบปฏิกิริยาการสร้าง gHb เมื่อประมาณปี ค.ศ. 1975-1977 ว่ามี 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเกิดอย่างรวดเร็วและย้อนกลับได้ ได้สาร aldimine ขั้นที่ 2 เกิดอย่างช้าๆ และย้อนกลับได้เพียงเล็กน้อย ให้สาร ketoamine ซึ่งจะคงตัวอยู่ตลอดอายุของเม็ดเลือดแดง (50)

การตรวจโดยวิธี cation exchange chromatography คอลัมน์สั้นที่ไม่ได้กำจัดส่วน labile ออกก่อน จะทำให้ค่าที่สะท้อนการบอกระดับน้ำตาลที่ 1-2 เดือนย้อนหลัง เนื่องจากประมาณ 10% ของทั้งหมดจะอยู่ในรูปที่สลายตัวได้ง่าย และถ้าเป็นผู้ป่วยที่มีระดับน้ำตาลเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาหรือใน IDDM อาจมีถึง 40% ดังนั้น การตรวจรูปที่สลายตัวง่ายโดยวิธีต่างๆ เช่นวัด gHb รวม ด้วยวิธีคอลัมน์สั้น แล้ววัด ketoamine ด้วย TBA ผลต่างที่ได้จะเป็น pre-HbA_{1c} หรือการทำ HbA_{1c} ก่อนและหลังการกำจัดรูปที่สลายง่ายทุก 3-7 วัน จะลดความจำเป็นในการตรวจวัดระดับน้ำตาลลงได้

Glycosylation ของฮีโมโกลบินรูปหลากหลาย

ผู้ป่วยเบาหวานที่มีฮีโมโกลบินรูปหลากหลาย พบได้หลายเชื้อชาติและภูมิประเทศ ปัจจุบันมีมากกว่า 400 ชนิด แต่ที่พบบ่อยได้แก่ HbS และ HbC เช่นในคนอเมริกัน, อัฟริกันผิวดำ, คนอินเดียจากแผ่นดินใหญ่ หรือในเกาะปาปัวนิวกินี, คนที่มีถิ่นกำเนิดแถบเมดิเตอร์เรเนียน ประมาณ 5-20% จะเป็น heterozygous ของ HbS หรือ C และอาจมีปริมาณสูงถึง 45% ของฮีโมโกลบินทั้งหมด การตรวจวัด gHb ด้วยวิธี TBA จะให้ผลถูกต้องที่สุด เพราะเป็นการวัดโดยรวมๆ แต่ถ้าเป็นวิธีที่อาศัยการแยกส่วนจะทำให้ค่าต่ำลง เนื่องจากจะวัดได้แต่ HbA_{1c} หรือ HbA₁ และถ้าใช้วิธี Affinity chromato-

graphy หรือ Affinity electrophoresis หรือ Isoelectric focusing โดยใช้ immobilized pH gradient อาจสามารถแยกและหาปริมาณ gHb ของรูปหลากหลายแต่ละส่วนได้ เช่นใน HbA_{1c}, HbS_{1c}, HbC_{1c}, HbF_{1c} เป็นต้น

กลัยเคทาโปรตีน

กลัยเคทาโปรตีนและอัลบูมิน

เนื่องจากอินซูลินสำหรับใช้มีกลัยโคสักระยะ อยู่ ดังนั้นจึงเกิด glycosylation ได้ตลอดเวลา การเก็บตัวอย่างตรวจทั้งวันโดยไม่กำจัดกลัยโคสออกก่อนจะทำให้ได้ค่าที่ผิดพลาด การแยกกลัยโคสทำได้โดยการ dialyze หรือตกตะกอนโปรตีนเก็บไว้จนรูปตะกอน หรือละลายในสารละลายที่ไม่มีกลัยโคส

วิธีการหา g-protein ทำได้ง่าย แต่มีปัญหากับการแปลผลค่อนข้างลำบากเนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดมีความแตกต่างของอายุครึ่งชีวิต, จำนวนไลซีนและวาเลอีน และความสามารถในการรวมตัวกับสารอื่น

McFarland และคณะ (36) ได้ศึกษาในคนปกติ 20 คนพบว่ามีความ g-protein เฉลี่ยประมาณ 0.63-1.31 นาโนโมล/มก.โปรตีน ต่างกับผู้ป่วยเบาหวาน 29 คนที่มีระดับ 1.54-3.97 นาโนโมล/มก.โปรตีน Kennedy และคณะศึกษาคนปกติ 82 คนได้ค่า 0.1-0.65 (เฉลี่ย 0.32) และผู้ป่วยเบาหวาน 107 คน มีค่า 0.2-1.5 (เฉลี่ย 0.74) นาโนโมล/มก.โปรตีน

ตัวอย่างที่ง่าย อาจเป็นเลือดจากหลอดเลือดดำหรือจากหลอดเลือดฝอยที่ปลายนิ้ว และอาจขับไว้บนกระดาษกรองก็ได้ซึ่งจะทำให้มีความแปรปรวนต่างๆ กัน สำหรับการศึกษา g-protein ส่วนใหญ่ใช้อัลบูมิน เป็นตัวควบคุมเบาหวานระยะสั้น Guthrow ให้ค่าปกติ $7.0 \pm 1.7\%$ โดยวิธี Carboxymethyl cellulose chromatography และ $8.3 \pm 2.2\%$ โดยวิธี TBA ส่วนผู้ป่วยเบาหวานให้ค่า $12.8 \pm 29.7\%$ จากทั้งสอง

วิธี เนื่องจากอัลบูมินถูก glycosylate ได้มากกว่า Hb และมีเวลาครึ่งชีวิตสั้นกว่า จึงเป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลได้ดีกว่า การเกิด glycosylation ของอัลบูมินที่ตำแหน่ง lys-525 เกิดได้ประมาณ 50% ทำให้โครงสร้างและการทำหน้าที่ของอัลบูมิน ต่างไปจากเดิม และการเกิดที่ lys-199 ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิด acetylation ได้ด้วย การกั้นแอสไพรินปริมาณมาก เช่นในระหว่างการรักษา Rheumatoid arthritis จะพบว่าระดับ g-albumin สูงขึ้นผิดปกติเมื่อวัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี หรืออิเล็กโตรโฟเรซิส แต่วิธี isoelectric focusing สามารถแยกกลัยโคอัลบูมินออกจาก acetylated albumin ได้

วิธีการหาปริมาณ g-albumin ที่เฉพาะมีหลายวิธี เช่นการใช้ Affinity chromatography, Isoelectric focusing, mobile affinity electrophoresis และ TBA ที่ใช้กรดทำหุ้ม pH = 1 ย่อยนาน 8 ชั่วโมงที่ 115°C เพื่อให้เกิด HMF แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ TBA 12.5 มิลลิโมลต่อลิตร 50 นาที เพื่อให้เกิดสี การต้มกับกรดอาจลดเวลาลงเหลือเพียง 2 ชั่วโมงโดยอาศัยความดันช่วยหรือใช้ autoclave วิธีที่หุ้มแผ่นยาและทำไดรูดเร็ว คือการใช้ affinity agarose-boronate column แล้ววัด g-albumin ที่แยกได้กับรูป ketoamine หรือปริมาณอัลบูมินเป็นเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนรวม การศึกษา g-albumin ควรทำทุก 3 สัปดาห์

ทรานสเฟอร์รินและโปรตีนย่อยอื่นๆ

ทรานสเฟอร์ริน มีอายุครึ่งชีวิตประมาณ 8 วัน ดังนั้นจึงใช้เป็นตัวแทนระดับน้ำตาลย้อนหลังในระยะสั้น (51)

Fibronectin สามารถรวมกับ cell matrix และ basement membrane component เมื่อถูก glycosylate จะทำให้ความสามารถลดลง

การวัด g-transferrin และโปรตีนย่อยอื่นๆ ยังมีการศึกษากันน้อย

ไลโปโปรตีน

ในผู้ป่วยเบาหวานมีการเปลี่ยนแปลงของสารอื่นร่วมด้วย เช่น มักจะมีโคเลสเตอรอล, LDL เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการมีระดับน้ำตาล และการเกิด glycosylation ที่สูงขึ้น และเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

ทั้ง LDL และ HDL มีไลซีนอยู่ด้วย จึงเกิด glycosylation ได้เช่นเดียวกับ apolipoprotein AI (Apo AI), Apo B, Apo CI, และ Apo E ใน LDL มีไลซีนประมาณ 40% เมื่อเกิด glycosylation จะทำให้การนำเข้าสู่เซลล์ของ LDL ผ่านทาง LDL receptor ลดลง ในคนปกติจะเกิด glycosylation ที่ไลซีนประมาณ 2% แต่ในเบาหวานจะเกิด 2-5% และการสลายตัวลดลง 5-25% ทำให้มีการคั่งของ LDL ในพลาสมาและโคเลสเตอรอลคั่งตามเนื้อเยื่อต่างๆ สำหรับ HDL จะมีการสลายตัวเร็วขึ้นเมื่อเกิด glycosylation ที่ไลซีนประมาณ 15% ดังนั้น อาการที่ตามมาของผู้ป่วยเบาหวาน คือความสามารถในการทำงานของ LDL receptor ลดลงด้วย

ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด

ไฟบริโนเจน เกิด glycosylation ได้ที่ส่วนแอมมาที่มีไลซีนเป็นจำนวนมาก (7)

Activated F XIIIa ซึ่งมี transglutaminidase activity และเป็นตัวรักษาสภาพของก้อนไฟบริน โดยการเชื่อมต่อของ glutamine และไลซีนระหว่างโมเลกุลไฟบรินที่อยู่ถัดไป การเกิด glycosylation ที่ไลซีนจะทำให้การคงสภาพเสียไป และไฟบรินจะถูกย่อยที่หมู่ไลซีน ทำให้เกิดการ glycosylate ต่อไปได้ก็ความสามารถของพลาสมา ในการสลายไฟบรินก็ลดลงด้วย

Antithrombin III มีหมู่ไลซีนจำเพาะสำหรับรวมกับเฮปารินในการเป็นตัวยับยั้งที่สำคัญ

ของ serine-protease plasma coagulation factor การเกิด glycosylation จะลดการรวมตัวตรงตำแหน่งโลซิน กับเฮปาริน มีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้ง thrombin ลดลง ร่างกายจะพบกระบวนการนี้ในผู้ป่วยเบาหวาน IDDM การมี antithrombin I และไฟบรินลดลงนี้จะหายไปถ้าทำ heparin infusion การมีไฟบรินต่ำ และภาวะหลอดเลือดแข็งเป็นภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นนานๆ โดยอาจเกิดจากผลของ glycosylation ไปยับยั้งการสลายตัวของไฟบรินโดยพลาสมิน และการกระตุ้นการทำงานของ antithrombin III โดยเฮปาริน

เมมเบรนโปรตีน

เม็ดเลือดแดง มีรายงานครั้งแรกในปี

ค.ศ. 1976 พบการ glycosylation ของซากเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยเบาหวาน 18 ราย เพิ่มเป็น 2 เท่าของคนปกติและสัมพันธ์กับระดับ HbA_{1c} การเปรียบเทียบโปรตีนในเมมเบรนแต่ละรายโดยใช้ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ไม่พบว่ามี selective glycosylation ที่ชัดเจน แต่พบเพิ่มชัดเจนในผู้ป่วยเบาหวานชนิด IDDM จำนวน 12 ราย (11.3 ± 0.7 นาโนโมล HMF/มก.โปรตีน) เทียบกับคนปกติ 10 คน (4.9 ± 0.3 นาโนโมล HMF/มก.โปรตีน; $p < 0.001$) และสัมพันธ์ทางบวกกับสารเคมีบางชนิดในเลือด เช่น g-plasma protein, HbA_{1c} และ FBS

โปรตีนสำคัญในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงได้แก่ spectrin⁽⁵²⁾ ซึ่งมีโลซิน 6.8% เมื่อเทียบกับ แอลฟา-อีโมโกลบิน มี 7.8% และ เบต้า-อีโมโกลบินมี 7.6% spectrin มีหน้าที่ทำให้ผิวเม็ดเลือดแดงมีความเหนียว ยึดเหนี่ยวเพื่อทำให้อุณหภูมิร่างกายคงได้ เมื่อมี glycosylation เพิ่มขึ้นจะไปยับยั้ง transglutamination ของโปรตีนเช่นเดียวกับที่เกิดในไฟบรินจนทำให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัวมากและกลับ

สู่สภาพเดิมได้ยากขึ้น ภาวะนี้พบได้ในเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่และเป็นตัวกระตุ้นเลือดผู้ป่วยเบาหวานและสัมพันธ์กับการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง

เซลล์เอ็นโดทีเลียมและโปรตีนอื่นๆ

ภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญของเบาหวานอีกชนิดหนึ่งคือ โรคของ microcirculation ได้แก่ ที่โกลเมอรูลัส และเรตินา⁽⁵³⁾ การสามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้ จะป้องกันหรือลดความรุนแรงของ microangiopathy มีการศึกษาในเอ็นโดทีเลียมของผนังหลอดเลือดฝอยของหนูที่ epididymal fat พบว่า g-albumin จะถูกจับโดยกระบวนการ pinocytosis ของเซลล์ ซึ่งโปรตีนก็ถูก glycosylate เช่นกัน กระบวนการแบบนี้ทำให้เกิดขนานนอกหลอดเลือดเนื่องจากมี g-albumin ระดับสูงๆ ของผู้ป่วยเบาหวานที่มี microvascular leakage นานๆ จะเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด microangiopathy

Glomerular basement membrane (GBM) protein⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾

อาการทางไต เป็นภาวะแทรกซ้อนสำคัญของเบาหวานโดยเฉพาะชนิด IDDM จะพบภาวะไตวายได้ถึง 40% หลังจากมีอัลบูมินรั่วออกมาประมาณ 7-10 ปีพบว่า 50% มักจะตาย McVerry และคณะ หดลงจืด g-plasma protein ในหนูปกติ 7 ตัวทดสอบซ้ำ 12 ครั้ง พบว่า 5 หนูมี GBM หนาขึ้นเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Cohen และคณะ ได้รายงานยืนยันต่อมาแบบเดียวกัน แต่ก็มีบางรายงานที่ขัดแย้งโดยพบว่าอัลบูมินปกติก็สามารถรวมตัวกับ GBM ได้ทั้งในหนูปกติและหนูที่เป็นเบาหวาน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาภายนอกร่างกายพบว่า nonenzymatic glycosylation ของ GBM จะเพิ่มขึ้นไม่เพียงแต่อัลบูมินและ IgG แต่จะเกิดกับโปรตีนทั้งหมดใน GBM ด้วย

การศึกษานี้เด็กที่เป็นเบาหวาน 18 คน (ปกติ 40 คน) และอีก 20 คนที่มีโปรตีนรั่วออกมาทางปัสสาวะ (ปกติ 10 คน) เมื่อวัด GBM

แอนติเจน โดย immunoelectrophoresis กับ anti-human GBM จากกระด้าง พบว่า 11 ใน 18 และ 10 จาก 20 มี alpha-1 mobility ส่วนที่เหลือและกลุ่มปกติจะเป็น alpha-2 mobility แต่เมื่อศึกษาโดยการปล่อยให้เกิดปฏิกิริยากับกลูโคสภายนอก ร่างกาย GBM ของเด็กปกติจะทำให้ alpha-1 mobility เมื่อตรวจ GBM จากศพที่ตายมาแล้ว 2-3 ชั่วโมง พบว่ามี ketoamine ที่มีกลูโคสเกาะอยู่ด้วย นอกจากนั้นผู้ป่วยเบาหวานที่มี HbA_{1c} เกิน 10% จะมี GBM จำนวนที่สภาวะเปลี่ยนแปลง มากกว่าคนที่ HbA_{1c} มากกว่า 10% ดังนั้น การที่มีกลูโคสในระดับสูงจะ ทำให้ GBM เปลี่ยนแปลงซึ่งมีผลต่อทำให้เกิดโรค renal angiopathy ในผู้ป่วยเบาหวาน

ปริมาณอัลบิมินในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวานจะค่อยๆเพิ่มขึ้น แต่อัตราส่วนที่ glycosylate จะลดลง ซึ่งอาจอธิบายได้จากการทดลองเตรียม GBM โดยย่อยด้วย nonspecific protease จะเกิดได้น้อยกว่าอย่างอัลบิมินที่ถูก glycosylate เมื่อเทียบกับตัวอย่างปกติ และคาดว่าภาวะนี้คงจะเกิดขึ้นในร่างกายด้วย

ใน IDDM ที่มีอาการของเรตินา เมื่อให้อินซูลินเข้าไปอย่างรวดเร็ว พบว่ามี microalbuminuria ลดลง (น้อยกว่า 1 กรัมต่อวัน) แต่ถ้าให้โดยการฉีดตามปกติ จะไม่เปลี่ยนแปลง ในระยะ 8 เดือน ซึ่งอาจเป็นไปได้อาจเนื่องจากการรักษาหรือควบคุมแบบรวดเร็ว จะทำให้เกิดโรคของไตช้าลง

โปรตีนของลูกนัยน์ตา

การ glycosylate โปรตีนที่มีอายุยาวหรือโปรตีนที่เป็นโครงสร้างนี้ มีผลทำให้เกิด post-Amadori product เป็นสารสีน้ำตาลซึ่งคงตัว มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอายุ และอาจเข้าเป็นตัวบ่งบอก ปรากฏการณ์ของกระบวนการของความแก่ได้ ซึ่งพบว่าผู้ป่วยเบาหวานจะเกิดเร็วขึ้น

การเกิดต่อกระดูก และโรคของเรตินา สามารถยับยั้งได้ โดยการควบคุมระดับน้ำตาลใน

เลือด การมีน้ำตาลสูงอยู่นานๆจะทำให้เกิดต่อได้เนื่องจาก

ก. มีการสร้าง sorbitol จากกลูโคสขึ้นมาเป็นจำนวนมาก โดยมี aldose reductase ในเลนส์ เป็นตัวช่วย ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย enzyme inhibitor sorbinil

ข. Nonenzymatic glycosylation ของ lens protein และ แอลฟา, เบต้า, แกมมา และ เดลต้า crystallins

เนื่องจากเลนส์ ไม่มีการหลุดลอกของเซลล์หรือโปรตีน ดังนั้นเลนส์จึงเป็นโปรตีนที่มีอายุมากที่สุดของสัตว์ทุกชนิด และนิวเคลียสจะมีอายุเท่ากับอายุของคนหรือสัตว์นั้น การเกิดต่อทำให้เลนส์ขึ้นเนื่องจากการรวมตัว (aggregate) ของโปรตีนในเลนส์และมีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้น

ในเลนส์ของคนปกติหรือในคนที่เป็ต่อกระดูกเนื่องจากสูงอายุ จะมีการ glycosylate เช่นเดียวกัน และเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานเป็น 2 เท่าคือประมาณ 35% ดังนั้น การเกิด glycosylation มีข้อสำคัญของการเป็นต่อ Lee และคณะพบว่า glycosylation เกิดขึ้นที่โปรตีนในเลนส์ส่วนนอก มีได้เกิดในนิวเคลียส Pirie พบสารสีเหลืองน้ำตาลในนิวเคลียสของต่อ การตรวจจากเลนส์ 660 อันที่เป็นต่อพบว่า 25% มีสีเหลืองเรียบ และ 29% มีสีน้ำตาลเข้มตรงกลาง และเมื่อแยกโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายน้ำและเกาะกันโดยไม่ใช้ disulfide bond พบว่าสารสีน้ำตาลที่แยกได้มีส่วนที่เข้าโปรตีน มีการดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลตที่ 325-355 นาโนเมตรและเรืองแสงได้มากกว่า 400 หรือใกล้ 450 นาโนเมตร มีลักษณะคล้ายโปรตีนของ Amadori product ตัวหนึ่ง และสามารถตรวจพิสูจน์สารเรืองแสงที่ได้ตัวหนึ่งคือ 2-(2-furo-syl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 278 นาโนเมตร และค่อนข้างสูงที่ 330-335 นาโนเมตร และเลเยลงมาถึงช่วงคลื่นแสงที่มองเห็นได้ จึงมีสีเหลืองปน

น้ำตาล และเรืองแสงที่ 440 นาโนเมตร สารนี้จะจับกับ 2 peptide amino-N-atom จากไลซีนและกลูโคสอีก 2 ตัว

มีข้อเสนอแนะว่า ภาวะผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นต่อ เลนส์จะมี ketoamine ของ cortical crystallin สูงกว่าน้ำตาลซึ่งมีอายุมากกว่าส่วน post-Amadori product ซึ่งอยู่บริเวณ cortex จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นน้ำตาลเลว ยิ่งมีลิซีนของเลนส์เพิ่มมากขึ้นหรือมี imidazole หรือสารใกล้เคียงมาก แสดงว่ามีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง กับกลูโคสปริมาณสูงๆ มานานปี

โรคของเรตินา พบได้ในพื้นที่ผู้ป่วยเบาหวาน 33% จากชายและหญิงอย่างละ 69 คน และมี gHb 12.5% ส่วนคนที่ไม่มียโรคของเรตินามี gHb 11.3% นอกจากนั้นยังพบว่า ถ้าควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดดีหัดจะสามารถชะลอการเกิดอาการของเรตินาหรือทำให้หยุดอาการ การควบคุมนี้ต้องตรวจสอบทั้ง HbA_{1c} และ น้ำตาลในเลือด

การมีกลูโคสเพิ่มขึ้นจะทำให้มีการสร้างคอลลาเจน และมี glycosylation เพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากการยับยั้งการเกิด lysyl-derived cross-linked collagen ตามปกติ ดังนั้นจะมี glycosylation ที่ epsilon amino acid ของไลซีนในคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่เมื่อเกิด Amadori compound จะมี polymerization และ dehydration (Maillard reaction) กลายเป็นสารที่มีความสามารถในการละลายลดลง มักเกิดที่ basement membrane ของหลอดเลือดฝอยบริเวณเรตินา

คอลลาเจน

มีการศึกษาจากเล็บ ผิวหนัง เส้นผม เป็นต้น ดังนี้

การวิเคราะห์ Furosine:- สกัด fructose-lysine จากโปรตีนในเล็บ พบว่าผู้ป่วยเบาหวาน มีระดับสูงกว่าปกติประมาณ 2 เท่า

การตรวจผิวหนังศพ :- 33 ราย มีค่าปกติ 0.72 ± 0.012 ไมโครโมลของ fructosamine มก. ผิวหนังสด Lyons และ Kennedy รายงานว่าคอลลาเจนของผิวหนังเกิด glycosylation เพิ่มขึ้นในเบาหวาน IDDM และ Buckingham และคณะ พบว่าในเด็กที่เป็นเบาหวานที่ไม่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดมี glycosylation ที่ผิวหนังเพิ่มเป็น 13 เท่า ทำให้มีลักษณะคล้าย sclerodema syndrome ผิวหนังเป็นมัน มีการแนะนำให้ทำการศึกษาผิวหนังเป็นรายปี สำหรับผู้ป่วยเบาหวาน IDDM หรือพหุอาการทางไตร่วมด้วย หรือมีการติดเชื้อหรือมีอาการแทรกซ้อนอื่นร่วมด้วย โดยวิธีตัวอย่างเนื้อเยื่อสดประมาณ 200 มก.

กลูโคสปกติจะเกิดปฏิกิริยาตรง epsilon-amino ของไลซีน หรือ hydroxylysine ในคอลลาเจน เมื่อเป็นเบาหวานจะยับยั้งการรวมตัวระหว่างโมเลกุลและการเกิด covalent bridge กับ Schiff baseที่ไม่ได้มาจากกลูโคส ระหว่างการเจริญตัวของคอลลาเจน ผลคือจะยับยั้งการเกิดเส้นใยคอลลาเจน และลดความสามารถในการละลาย ลดภาวะการงายต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ collagenase ซึ่ง Lyons และ Kennedy ได้เสนอว่า ประการหลังนี้ เกิดจากการ glycosylate ล้างหน้าของสารสุดท้าย เมื่อเส้นใยคอลลาเจนเกิด cross-link ก็จะสามารถเกิด glycosylation

อัลบูมินและ IgG สามารถรวมกับ g-collagen ได้ดีกว่าคอลลาเจนธรรมดาถึง 4 เท่า ทำให้เกิดสารเชิงซ้อน โครงสร้างเปลี่ยนแปลงเกิดการทำลายเนื้อเยื่ออย่างเรื้อรังตามมา ทำนองเดียวกัน ระหว่างกระบวนการ glycosylation ของคอลลาเจน LDL จะเกาะกันแบบ covalent ทำให้เร่งการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งในผู้ป่วยด้วย

ผลของอายุผู้ป่วยเบาหวานและระยะเวลาการมีระดับน้ำตาลสูงในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน

จะทำให้มี α -collagen สีน้ตาลมากขึ้น ลดการละลายของคอลลาเจน มีการเรืองแสงที่ 405 นาโนเมตรเพิ่มขึ้น และมีสารสีเหลืองคั่งโดยมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 340 นาโนเมตรต่อมาเมื่อศึกษาจากการผ่าตัดที่ insoluble dura mater พบว่าสารสีเหลือง (ดูดกลืนแสงที่ 350 นาโนเมตร) จะเพิ่มขึ้นตามอายุและเร็วขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน เมื่อเอาคอลลาเจนจากเอ็นหางหนู (เรืองแสงที่ 440 นาโนเมตร) มาทำปฏิกิริยากับกลูโคสความเข้มข้น 100 มิลลิโมลลาร์ 19 วัน จะมีการดูดกลืนแสงและเรืองแสงเหมือนสารสีน้ำตาลดังกล่าว ซึ่งอาจจะเป็นตัวเดียวกันกับที่พบในเนื้อของลูกนัยน์ตา และสามารถแยกได้จากอัลบินีนสีน้ำตาลและโพลีโลซีน

โปรตีนของเส้นประสาท

ผู้ป่วยเบาหวานประมาณ 25% จะมีอาการทางเส้นประสาท ส่วนใหญ่แสดงลักษณะทางไฟฟ้าผิดปกติที่เส้นประสาทส่วนปลาย บางรายพบการเกิด glycosylation ขึ้นที่ myelin sheath ของระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย อาการทางประสาทในผู้ป่วยเบาหวาน รักษาให้หายได้เมื่อควบคุมระดับน้ำตาลจนเลือดได้ดี และอัตราการส่งสัญญาณไฟฟ้าของ motor nerve ที่ลดลงจะบอกระดับการมีน้ำตาลในเลือดสูงของผู้ป่วยได้

การทดสอบการกรองสำหรับวินิจฉัยเบาหวาน

การมี HbA_{1c} และ ketonuria ร่วมกันระดับน้ำตาลในเลือด เป็นตัวคาดคะเนที่แม่นยำพอสมควรในการวินิจฉัยเบาหวานทั้งชนิด IDDM และชนิด NIDDM โดยไม่ต้องทำ GTT ซึ่งบางครั้งอาจไม่ชัดเจนหรือบางครั้งเมื่อต้องทำ GTT ซ้ำอีกก็ควรทำ HbA_{1c} ตามไปด้วย

บางรายงานกล่าวว่า HbA_{1c} หรือ HbA₁ ไม่เพียงพอสำหรับเป็นข้อตัดสินในการวินิจฉัยเบาหวาน หรือค่าที่ได้อาจไม่ชัดเจน ซึ่งการศึกษาที่ได้นี้ยังไม่สอดคล้องกัน ก็อาจเนื่องมาจากวิธีการที่ศึกษาต่างกัน หรือการหาชนิดของสารต่างกัน

ทำหยังไม่สามารถสรุปผลที่แน่นอนได้

การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

ผู้ดูแลหรือรักษาผู้ป่วยเบาหวาน ควรทำความเข้าใจและยอมรับว่า การที่สามารถควบคุมเมตาบอลิซึมของผู้ป่วยได้ดี จะลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ การควบคุมนี้ต้องอาศัยการตรวจเลือดหรือปัสสาวะ เพื่อประกอบกับการวินิจฉัยขึ้นหรือยาลดระดับน้ำตาลในเลือดให้พอเหมาะ หรือการรักษาแบบอื่น ๆ ที่ทำได้ เช่นการตรวจวัด α -protein หรือสารที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา glycosylation ตอนที่สอง

การควบคุมระยะสั้น ได้แก่การตรวจวัด labile pre HbA_{1c} (มีอายุหลายวัน), α -ferritin (อายุ 8 วัน) และ α -albumin (อายุ 20 วัน) ซึ่งจะสามารถบอกภาวะน้ำตาลย้อนหลังไปได้ 1-2 สัปดาห์ ถึง 2-4 สัปดาห์

การแยกเม็ดเลือดแดงโดยการปั่น หรือแยกตามความหนาแน่น พบว่า 10% ขึ้นบนเป็นเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน มีอายุ 0-10 วัน เมื่อนำมาหาปริมาณสารดังกล่าวสามารถบอกภาวะน้ำตาลกลีโคเซียมกับปัจจุบันได้ (56)

การตรวจสอบที่นิยมทำกัน คือ α -albumin เป็นวิธีที่ดี สะดวก และเหมาะสม โดยเฉพาะในหญิงมีครรภ์, โรคเม็ดเลือดแดงแตก, เมื่อมี HbF และระหว่างการรักษาควบคุมเมื่อมีน้ำตาลสูงมาก

การควบคุมระยะปานกลาง ใช้อย่าง Hb (ketonuria) เป็นตัวควบคุมในระยะ 5-8 สัปดาห์ ดังนั้น จะเจาะเลือดไม่บ่อยนัก ประมาณ 2-3 เดือนต่อครั้ง

มีการศึกษาประโยชน์ของการตรวจ α Hb มากมาย ที่น่าสนใจคือในเบาหวานชนิด IDDM และในเบาหวานที่เป็นชั่วคราวเนื่องจากมีการติดเชื้อ แผลไฟไหม้ หลังผ่าตัด ภาวะตั้งครรภ์ และสามารถให้ผู้ป่วย เจาะเลือดปลายนิ้วด้วยตนเอง แล้วขับถ่ายบนกระดาษกรองก่อนจะนำพบแพทย์ ทำให้นักแพทย์ทราบผลได้เร็วขึ้นเมื่อตรวจผู้ป่วย

การควบคุมระยะยาว ได้แก่การตรวจ g-collagen ของผิวหนังหรือเล็บทุก 12 เดือน สามารถบอกการควบคุม และการเกิด post-Amadori product หรือการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองเมื่ออายุมากขึ้น โดยเฉพาะในเบาหวาน จะเปลี่ยนเร็วขึ้น

ความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อน

เมื่อวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวานแล้ว ประมาณ 1 ใน 3 หรือน้อยกว่าของผู้ป่วยมักจะเกิดอาการแทรกซ้อน ได้แก่อาการทางประสาท ไต เรตินา และหลอดเลือด มีการพบว่า เมื่อมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานๆ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อที่ไม่ไวต่ออินซูลิน เช่น เลนส์ เม็ดเลือดแดง จะเป็นบริเวณเริ่มต้นและเป็นมากกว่าที่อื่น

ความสัมพันธ์กับภาวะทางคลินิกอื่นๆ

1. กับภาวะของน้ำตาลในเลือด แบ่งเป็น

ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง การมีน้ำตาลสูงในเลือดเป็นช่วงเวลาสั้นๆ เมื่อมีโรคบางอย่าง ก็มีรายงานการพบ HbA_{1c} หรือ HbA₁ เพิ่มขึ้นรายหึ่งมีความทนน้ำตาลกลูโคสเสียไป, ระยะก่อนที่จะแสดงอาการเบาหวาน, น้ำตาลในเลือดสูงเนื่องจากมีความเครียด, โรคหลอดเลือดหัวใจ หรือการมีฮอร์โมนผิดปกติ เช่นมี growth hormone สูง, Cushing's syndrome, โรคอ้วน หิมีหรือไม่มีอาการเบาหวาน การรับประทานยาสีขาวชนิด thiazide นานๆ และน้ำว่าควรใช้การตรวจ g-albumin มากกว่าอย่างอื่น

ภาวะน้ำตาลต่ำในเลือด มีหลายสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลต่ำลงเป็นเวลานานๆ ได้ แต่สาเหตุที่ทำให้เกิดแบบระยะยาวมีไม่มากนัก เช่น Neonatal hypoglycemia, insulinoma (Nesidioblastosis), Adrenocortical and pituitary failure, malnutrition และ liver necrosis (cirrhosis), glycogen storage disease type I และ galactosemia

การวินิจฉัย insulinoma มีผู้เสนอแนะว่า

HbA₁ เป็นตัวที่บอกได้แม่นยำกว่าระดับน้ำตาลในเลือด แต่ทั้งน้ำตาลและ HbA₁ อาจจะไม่ลดลงเสมอไป ดังนั้น ควรจะดูว่ามีอินซูลินสูงในเลือดมากกว่า

Glycogen storage disease (GSD) หรือ von Gierke's disease มี HbA_{1c} ต่ำใน galactosemia ซึ่งไม่สามารถสลายกาแลคโตส ทำให้ระดับกาแลคโตสมีสัมพันธ์กับกลูโคสในเลือดซึ่งจะลดต่ำลง ดังนั้นจะเกิด galactosylated albumin สูงกว่าปกติได้ถึง 3 เท่า

2. กับภาวะโรคอื่นๆ

โรคของเม็ดเลือดแดง ภาวะโรคเม็ดแดงชนิดฮีโมลิติกเนื่องจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน, hereditary spherocytosis จะพบระดับ gHb ลดลงมากกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็นผู้ป่วยอื่น หรือคนปกติ ($3.9 \pm 0.1\%$ กับ $7.0 \pm 0.7\%$ และ $6.7 \pm 0.7\%$, $p < 0.0005$)

ระดับ gHb ในคนที่ไม่เป็นเบาหวานจะบอกถึง อัตราการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง ย้อนหลังทำให้อาจไม่จำเป็นต้องตรวจวัดอายุของเม็ดเลือดแดงอีกต่อไป

ในบางโรคเช่น โรคไตเรื้อรัง, ฆ่าตัดเปลี่ยนไต, pernicious anemia, rheumatoid arthritis และ hemolytic anemia ที่มีอายุของเม็ดเลือดแดงสั้นลง (Cr⁵¹-half life น้อยกว่า 15 วัน) จะมี gHb 4.0-6.85 เทียบกับปกติ 7.3% ส่วนผู้ป่วยเบาหวานที่รักษาด้วยยาที่มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เช่น dapson จะมี gHb 4.2% และเป็น 3.7% ในเดือนต่อมา ช่วงค่าระดับสูงของปกติโดยวิธี microcolumn chromatography เท่ากับ 8.5% และสัมพันธ์กับอายุ เนื่องจากการเกิด ketoamine เป็นขั้นตอนที่ช้า เม็ดเลือดแดงอ่อนจะมี gHb ดังและมีมากขึ้นเมื่อแก่ตัว

ใน gHb มีน้ำตาลไปแทนที่ 2,3-DPG ทำให้มีความสามารถในการจับกับออกซิเจน เพิ่มขึ้น เป็นผลทำให้เกิดภาวะ ขาดออกซิเจนในเนื้อเยื่อ

และคล้ายกับภาวะ polycythemia ในผู้ป่วยเบาหวาน แต่ระดับเท่าที่พบในผู้ป่วยทั่วไป ยังไม่ทำให้เกิดอาการชัดเจน

ในภาวะโลหิตจาง เนื่องจากการขาดเหล็ก มักมี gHb เพิ่ม อาจเท่ากับผู้ป่วยเบาหวาน แต่จะลดลงเมื่อรักษา ซึ่งมีข้ออธิบายต่างๆ กันได้หลายแบบ

ฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ หลายอย่างที่มีลักษณะประจุคล้ายกับ HbA_{1c} หรือ HbA₁ ดังนั้น จึงไม่สามารถแยกออกจากกันโดย คอลัมน์โครมาโตกราฟีหรืออิเล็กโตรฟอรีซิส เช่น FMH (HbF, S, C) อาจต้องมีการทดสอบเพื่อหาชนิดของฮีโมโกลบินด้วย

โรคอื่นๆ

1) Cystic fibrosis มีรายงานผู้ป่วย 34 ราย อายุ 1.5-20 ปี มีค่า HbA_{1c} สูงชัดเจน $7.97 \pm 1.16\%$ เทียบกับเด็กปกติ 150 คน เท่ากับ $6.8 \pm 0.8\%$ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการมีการสนองตอบต่ออินซูลินลดลงและ ความทนน้ำตาลกลูโคสเสียไป

2) การได้รับสารสเตียรอยด์ คนที่คุมกำเนิดด้วย ethynylestradiol-norethisterone จะทำให้ HbA₁ ลดลงมากกว่าคนที่ใช้ barrier หรือ antiestrogen เนื่องจากเอสโตรเจนสังเคราะห์มีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง โดยอาจมีผลต่อ portal insulin : glucagon ratio

Oxlund และคณะพบว่าการรักษา corticosteroid ในหนู 14 หรือ 60 วันจะทำให้คอลลาเจนของผิวหนังบริเวณ lumbar มีความแข็งแรงมากขึ้น แต่การรักษา 120 วัน จะมีความหนาและปริมาณคอลลาเจนลดลง แต่ไปเพิ่มปริมาณกลูโคสที่ไปเกาะกับ epsilon amino acid ของไลซีนในคอลลาเจน

3) ภาวะอัลบูมินในเลือดต่ำ เช่น Chronic malnutrition หรือ kwashiorkor จะมีอัลบูมินในซีรัมลดลงมากถึง 1.5-2.5 กรัม/ดล.

ค่า g-albumin เป็นเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนรวมหรือต่อ มก.อัลบูมิน จะลดลงในคนที่น้ำตาลในเลือดต่ำ และ g-lysine ในปัสสาวะจะลดลงประมาณเท่ากับช่วงค่าต่ำของคนปกติอายุเท่ากัน

4) การรักษาด้วย salicylate HbF ถูก acetylate ภายในร่างกาย ซึ่งสามารถพบ gHbF ได้โดยวิธี isoelectric focusing ถ้ากินแอสไพรินปริมาณมาก นานๆ ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่จะมีการแย่งกันเกิดระหว่างปฏิกิริยา acetylation และ glycosylation ที่ไลซีนหรือวาเลอีน พบว่าอัลบูมิน คอลลาเจนชนิด I และ IV ถูก acetylate ง่ายกว่าที่อื่น การตรวจสอบจะต้องเป็นวิธีที่จำเพาะต่อ ketoamine linkage มิฉะนั้น จะไม่สามารถบอกถึงระดับกลูโคสในระยะที่ต้องการ และสารพวกตัวที่ถูก acetylate หรือ glycosylate จะมีโครงสร้างและหน้าที่ผิดไปจากเดิม

5) การมีสารเชิงซ้อนอิมมูน เนื่องจาก การรวมตัวระหว่างอัลบูมินและ IgG กับ g-collagen จะเกิดมากขึ้นกว่าคอลลาเจนธรรมดาถึง 4 เท่า ทั้งอัลบูมินและ IgG เมื่อรวมกับ g-collagen แล้วยังมีความสามารถในการเกิดสารเชิงซ้อนอิมมูนเฉพาะที่ได้ เมื่อมีแอนติบอดีหรือแอนติเจนอิสระ นอกจากนั้น แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ g-LDL สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยเบาหวาน ทำให้การกำจัด LDL เกิดได้มากขึ้น การเกิด glycosylation ของโปรตีนที่อยู่ในพลาสมาและโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง อาจทำให้คุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น และเกิดเป็นแอนติบอดีต่อตัวเองกลับไปทำปฏิกิริยากับ g-lysine ได้อีก ดังนั้น แอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะไม่เพียงทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจำเพาะ เท่านั้น แต่อาจจะเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ g-protein อื่นๆ ได้อีก มีผลทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อแบบเรื้อรัง ในผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นมานานๆ ได้

6) DNA ทั้งกลูโคสและ glucose-6-phosphate สามารถเกิดปฏิกิริยากายนอกร่าง

ภายใต้กับ DNA ให้สารสีน้ำตาลซึ่งทำให้ DNA มีโครงสร้างและการทำหน้าที่เปลี่ยนไป เนื่องจากกรดนิวคลีอิกเป็นสารที่มีอายุยาวนานเซลล์ระยะพักการคั่งของสารสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น อาจจะสัมพันธ์กับการหลากรูปทางพันธุกรรมที่ลดลง ของสิ่งที่มีชีวิตอายุมาก การ glycosylate กรดนิวคลีอิกนี้ ยังมีการศึกษากันน้อย แต่อาจมีความสำคัญอย่างมากก็ได้

7) ฮอร์โมนอินซูลิน α -insulin สามารถเตรียมขึ้นได้ โดยมีความสามารถในการทำงานน้อยกว่าธรรมชาติประมาณ 20% แต่มีอายุนานกว่า ดังนั้น อาจไม่เกิด glycosylation ในร่างกายหรือเกิดน้อยมาก มีการทดลองใช้สารเชิงซ้อนอินซูลินกับ concanavalin A พบว่ามีความคงตัวได้นานมาก

8) เอนไซม์ มีเอนไซม์หลายชนิด เช่น β -N-acetyl-D-glucosaminidase (EC.3.2.1.30), Ribonuclease A (EC.3.1.27.5), Sulfhydryl protease, Cathepsin (EC. 3.4.22.1) เมื่อปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับกลูโคส จะทำให้เกิดพันธะเป็นเอนไซม์ลดลงหรือหายไป เนื่องจากเกิด reversible co-valent intermediate (aldimine และ ketoamine) ที่บริเวณ active site epsilon amino acid อย่างไรก็ตาม ส่วนใหญ่เอนไซม์อายุครึ่งชีวิตสั้นในร่างกาย ดังนั้น การเกิด glycosylation จึงมีจำกัด และอาจหยุดอยู่เพียงการเป็น aldimine

3. ไตวาย มีหลายรายงานที่พบว่า HbA_{1c} เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ทั้งที่เป็นและไม่เป็นเบาหวาน ซึ่งไม่เกี่ยวกับภาวะเมตาบอลิซึมของผู้ป่วย HbA_{1c} ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยยูเรียไม่ได้เป็นผลจาก glycosylation ของฮีโมโกลบินเท่านั้น แต่จะมี carbamylation ของฮีโมโกลบินที่ตำแหน่งเดียวกัน ด้วยโดยสารไซยาเนตที่มาจากยูเรีย เมื่อตรวจวัด α Hb ด้วยวิธี TBA หรือ affinity chromatography พบว่ามี HbA_{1c}

เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และอาจพบร่วมกับการมีความทนน้ำตาลกลูโคสเสียไปหรือเม็ดเลือดแดงมีอายุน้อยลง หรือภาวะกรดในร่างกายน้อย

ในผู้ป่วยเบาหวาน ที่มีอัลบูมินรั่วออกมาทางปัสสาวะ ตามด้วยภาวะไตวาย จะพบ α -amino acid ในปัสสาวะเพิ่มขึ้น และโปรตีนในปัสสาวะจะเป็นส่วนที่ถูก glycosylate มากขึ้น โดยเฉพาะอัลบูมิน

Zawada รายงาน คนที่เปลี่ยนไต 24 ราย เบาหวาน 2 รายและผู้ที่กำลังรักษาด้วยไดอัลไฮม 34 ราย (4 รายเป็นเบาหวาน) ค่า HbA_{1c} โดยวิธี affinity chromatography จะเพิ่มขึ้นชัดเจนเมื่อเทียบกับคนปกติ ซึ่งขัดแย้งกับบางรายงานที่พบ α Hb ลดลงในคนที่ผ่าตัดเปลี่ยนไตหรือไตวายแต่สอดคล้องกับในกรณีเม็ดเลือดแดงมีอายุน้อยลง

คนที่ทำ peritoneal dialysis ติดต่อกันนานๆ การใช้สารละลายที่มีกลูโคส 4.25% จะทำให้ระดับน้ำตาลในพลาสมา สูงขึ้นได้ 5.5 มิลลิโมลต่อลิตร ภายใน 4 ชั่วโมงและทำให้อินซูลินเพิ่มขึ้น ดังนั้น HbA_{1c} จึงอาจเพิ่มได้ชั่วคราว แต่จะไม่พบปรากฏการณ์ ถ้าใช้กลูโคสในสารละลายเพียง 1.5%

4. ภาวะตั้งครรภ์ หญิงที่มีประวัติเบาหวานแล้วตั้งครรภ์ จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการตายของแม่และเด็กในครรภ์หรือทารกที่เกิดใหม่ ในหญิงมีครรภ์ปกติจะมีเบาหวานร่วมด้วย จะพบว่าระยะแรกมี α Hb เพิ่มขึ้น แล้วลดลงในช่วงระยะ 3 เดือนสุดท้าย โดยอาจจะมีค่าต่ำกว่าคนที่มีเพศ และอายุเดียวกันที่เป็นเบาหวาน โดยทั่วไป ถ้าคนน้ำตาลในเลือดสูงได้จะลดอัตราการเสี่ยงดังกล่าวได้ มีรายงานว่า เด็กที่อยู่ในครรภ์หรือเด็กเกิดใหม่ที่มีรูปร่างไม่สมประกอบมักจะเกิดจากแม่ที่มี HbA_{1c} หรือ HbA₁ สูง ส่วนแม่ที่เป็นเบาหวานในระยะเริ่มต้น แล้วควบคุมให้น้ำตาลลดลงในระยะหลัง เด็กจะเกิดการไม่สมประกอบได้บ่อยลง อัตราการเกิด macrosomia และความผิดปกติของเม

ดาบลิสม เช่น มีลิบริบ์สูงหรือน้ำตาลต่ำในเด็ก จะพบได้บ่อยขึ้น ถ้าแม่มี HbA_{1c} สูง

มีบางรายงาน ศึกษาเกี่ยวกับ HbA_{1c} ใน เลือดจากสายสะดือ สรุปได้ว่า แม่ที่เป็นเบาหวานจะมีน้ำตาลในมดลูกสูงด้วย ดังนั้นเด็กจะมี HbF_{1c} และน้ำหนักแรกเกิดสูงมากกว่าการที่แม่สามารถควบคุมเบาหวานได้

หญิงมีครรภ์ทั่วไป จะพบอาการเบาหวานใน ระหว่างตั้งครรภ์ได้ประมาณ 1-2% ซึ่ง gHb อาจจะไม่ชัดเจนหรือการขึ้น HbA_{1c} อย่าง เดียว หรือร่วมกับการทดสอบความทนน้ำตาลกลูโคส (1 ชักหลอด 50 กรัม) แต่อย่างไรก็ตาม หญิงที่เป็นเบาหวานและอ้วนจะพบ HbA_{1c} สูง ขึ้น (8.77 ± 1.03%) เมื่อเทียบกับหญิงมีครรภ์ ที่อ้วนแต่ไม่เป็นเบาหวาน

การศึกษาผู้ป่วยหญิงมีครรภ์ที่มีประวัติ pre-diabetes 180 ราย พบว่า 21 ใน 33 คนที่เป็นเบาหวานในระยะตั้งครรภ์จะมี gHb เพิ่มขึ้น และครึ่งหนึ่งของกลุ่มนี้ จะให้เด็กที่มีน้ำหนักตัว แรกคลอดสูง Pollack และคณะ ศึกษาระดับ gHb ในแม่ที่มีเด็กตัวโตกว่าปกติ พบว่าน่าจะเป็น ประโยชน์ในการตรวจระยะหลังคลอดสำหรับราย ที่เป็นเบาหวานที่ยังไม่พบอาการ

ระดับ g-albumin หรือ g-protein จะ ลดลงประมาณ 50% หรือมากกว่า หลังจากควบคุมเมตาบอลิสมได้ประมาณ 4 สัปดาห์ และตรงข้ามกับอัตราการลดลงของ gHb ในผู้ป่วยเหล่านี้ ก็จะน้อยกว่าและไม่ได้บอกถึงการที่ผู้ป่วยมีอาการ ดีขึ้น จนกระทั่ง 12 สัปดาห์ผ่านไปแล้ว แต่ถ้าทำ ร่วมกับการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดเป็นระยะจะดีขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมีอาการเบาหวานเกิดขึ้นในระยะแรกๆ ของการตั้งครรภ์

ความสำคัญกับกระบวนการของความแก่

การเกิด post-Amadori product และ สารสีน้ำตาล แสดงถึงการมีระดับกลูโคสปกติ ตลอดอายุ แต่ถ้ามีกลูโคสสูงขึ้น อัตราการเกิด สารดังกล่าวจะเร็วขึ้น ketoamine ที่เกิดขึ้นจะ

ไปยับยั้งการเกิด cross-link ที่เกิดขึ้นระหว่าง คอลลาเจนหรือ crystallin หรือใยอีลาสติน ทำให้โครงสร้าง และการทำหน้าที่ของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างเปลี่ยนไป และสารที่เกิดขึ้นจะไวต่อการย่อยด้วย protease มากขึ้นจึงเกิดการสลายตัวของคอลลาเจน ซึ่งมีผลต่อไปทำให้การสมานแผลในผู้ป่วยเบาหวานและคนสูงอายุเกิดได้ช้าลง

g-collagen และ cryatallin เพิ่มขึ้นในคนสูงอายุและผู้ป่วยเบาหวานที่เป็นนานๆ ดังนั้น การตรวจอาจจะต้องจากสารสีน้ำตาล (ดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร และเรืองแสงที่ 440 นาโนเมตร) และสาร ketoamine

สาร aromatic heterocyclic ที่เกิดจากการรวมโมล 2 ตัว กับกลูโคส 2 ตัวเป็น 2-(2-furosyl)-4-(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole และ epsilon N-carboxy methyllysine พบเป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของ g-protein ซึ่งมีการศึกษากันบ้าง รวมทั้งการศึกษา Maillard product ที่มีอายุนานๆ แต่ยังไม่ถึงขั้นที่จะนำมาปฏิบัติกันได้ในชีวิตทั่วไป

บทสรุป

ในผู้ป่วยเบาหวาน จะเกิดมีกลัยเคโรโปรตีนในระดับสูงกว่าปกติ กลัยเคโรโปรตีนนี้จะมีผลต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ที่พบได้ในผู้ป่วย ได้แก่ ภาวะหลอดเลือดแข็ง, อาการทางตา, โรคไต, เนื้อสมองตาย และภาวะโรคติดเชื้อต่างๆ การตรวจวินิจฉัยโดยกลัยเคโรโปรตีน สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการให้ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว จึงควรที่จะได้นำไปใช้ในการช่วยวินิจฉัย และติดตามผลการรักษาผู้ป่วยเบาหวานกันต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Schroeder WA and Holmquist WR. In "Structural Chemistry and Molecular Biology". Rich A and Davidson N (eds). 1968, Free-

- man, San Francisco, pp 23-255.
2. Trivelli LA, Ranney HM and Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971; 284: 353-357.
 3. Day JF, Thorpe SR and Baynes JW. Nonenzymatically glycosylated albumin : In vitro preparation and isolation from normal serum. *J Biol Chem* 1979; 254: 595-597.
 4. Dolhofer R and Wieland OH. Glycosylation of serum albumin : Elevated glycosyl-albumin in diabetic patients. *FEBS Lett* 1979; 103: 282-286.
 5. Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR and Bayners JW. Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4258-4261.
 6. Abraham EC. Glycosylated Hemoglobin: Methods of Analysis and Clinical Application. Dekker, New York, 1985.
 7. McVerry BA, Thorpe S, Joe F, Gaffney PJ and Huehns ER. Non-enzymatic glycosylation of fibrinogen. *Hemostasis* 1981; 10: 261-270.
 8. Harding JJ. Nonenzymatic covalent posttranslational modification of proteins in vivo. *Adv Protein Chem* 1985; 37: 247-334.
 9. Mandel SS, Shin DH, Newman BL, et al. Glycosylation in vivo of human lens capsule (basement membrane) and diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 51-56.
 10. Schnider SL and Kohn RR. The effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glycosylation of human skin collagen. *J Clin Invest* 1981; 67: 1630-1635.
 11. Vlassara H, Brownlee M and Cerami A. Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5190-5092.
 12. Dolhofer R and Wieland OH. Preparation and biological properties of glycosylated insulin. *FEBS Lett* 1979; 100: 133-136.
 13. Ditzel J, Andersen H and Dangaard Peeders N. Oxygen affinity of hemoglobin and red cell 2,3-diphosphoglycerate in childhood diabetes. *Acta Pediatr Scand* 1975; 64: 355-361.
 14. Dunn PJ, Cole RA, Soelder JS and Gleason RF. Reproducibility of hemoglobin A_{1c} and sensitivity to various degrees of glucose intolerance. *Ann Intern Med* 1979; 91: 390-396.
 15. Curling JM, Burglof J, Lind-

- quist LO and Eriksson S. A chromatographic procedure for the purification of human plasma albumin. *Vox Sang* 1977; 33: 97-107.
16. Gruber CA and Koets MD. Quantitation of hemoglobin A_{1s+b} and hemoglobin A_{1c} by automated 'high performance' liquid chromatography. *Clin Chem* 1979; 25: 1970-1971.
17. Koenst MK and Edstrom RD. Determination of glycosylated hemoglobin : A laboratory experiment relevant to diabetes mellitus. *Biochem Ed* 1985; 13: 7-9.
18. Righetti P. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J Chromatogr* 1984; 300: 165-224.
19. Innanen VT and Becknagel F. Nonlabile hemoglobin A₁ estimated after sample preparation by ultrafiltration. *Clin Chem* 1981; 27: 1478-1479.
20. Standefer JC and Eaton RP. Evaluation of a colorimetric method for determination of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29: 135-140.
21. Gallop PM, Fluckiger R, Hannecken A, Mininsohn MM and Gabbay KH. Chemical quantitation of hemoglobin glycosylation : fluorometric detection of formaldehyde released upon periodate oxidation of glycohemoglobin. *Anal Biochem* 1981; 117: 427-432.
22. Johnson EN, Metcalf PA and Baker JR. Fructosamine : A new approach to the estimation of serum glycoproteins. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982; 127: 87-95.
23. Hayasi Y and Makino M. Fluorometric measurement of glycosylated albumin in human serum. *Clin Chim Acta* 1985; 149:13-19.
24. Bernstein RE. Nonenzymatically glycosylated proteins. In *Advances in Clinical Chemistry*. Vol 26, 1987, Spigel HE (ed). Academic Press Inc, p 1-78.
25. Schellekens APM, Sanders GTB, Thornton W and van Groenestein T. Sources of variation in the column-chromatographic determination of glycohemoglobin (HbA₁). *Clin Chem* 1981; 27: 94-99.
26. Simon M and Eissler J. Critical factors in the chromatographic measurement of glycohemoglobin (HbA₁). *Diabetes* 1980; 29: 467-474.
27. Walinder O, Ronquist G and Fager PJ. New spectrophotometric method for the determination of hemoglobin A₁ compared with a microcolumn technique. *Clin Chem* 1982; 28: 96-99.
28. Rosenthal PK, Vazquez DA and

- Seckinger DL. Determination of glycohemoglobins by a rapid patch separation. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 45-49.
29. Hayes EJ, Gleason RE, Soeldner JS, Wacks M and Blankstein L. Measurement of hemoglobin A₁ by liquid chromatography and agar electrophoresis compared. *Clin Chem* 1981; 27: 476-479.
 30. Menard L, Dempsey ME, Blankstein LA, Aleyassine H, Wacks M and Soeldner JS. Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A₁ by agar gel electrophoresis. *Clin Chem* 1980; 26: 1598-1602.
 31. Hall FM, Cook JGH and Gould BJ. An inexpensive, rapid and precise affinity chromatography method for the measurement of glycosylated hemoglobin. *Ann Clin Biochem* 1983; 20: 129-135.
 32. Basset P, Beuzard Y, Garel MC, and Rosa J. Isoelectric focusing of human hemoglobin. *Blood* 1978; 51: 971-982.
 33. Olesen HA, Sorensen S, Hansen PK and Molsted-Pedersen L. Hemoglobin A_{1c} in pregnant diabetic patients at delivery and hemoglobin F₁ in cord blood from their newborns. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44: 329-334.
 34. Cossu G, Manca M, Pirastru MG, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by isoelectric focusing in non-linear pH gradients. *J Chromatogr* 1984; 307: 101-110.
 35. Kennedy I, Mehl TD and Merimee TJ. Nonenzymatically glycosylated serum protein in diabetes mellitus. An index of short-term glycemia. *Diabetologia* 1981; 21: 94-98.
 36. McFarland KF, Catalano EW, Day JF, Thorpe SR and Baynes JW. Nonenzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* 1979; 28: 1011-1014.
 37. Urbanowski JC, Cohenford MA, Levy HL, Crawford JD and Dain JA. Non-enzymatically galactosylated serum albumin in a galactosemic infant. *N Engl J Med* 1982; 306: 184-186.
 38. Fairbanks VF and Zimmermann BR. Measurement of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography. *Mayo Clin Proc* 1983; 58: 770-773.
 39. Cole RA, Soeldner JS, Dunn PJ and Bunn HF. A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobins using high pressure liquid chromatography. *Metabolism* 1978; 27: 289-301.
 40. LaBella FS and Paul G. Structure of collagen from human tendon as influenced by age and

- sex. *J Gerontol* 1964; 20:54-59.
41. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, Fujimoto EK, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography. *Clin Chem* 1982; 28: 2088-2094.
42. Schoos R, Schoos-Barbette S and Lambotte G. Dosage of hemoglobin A_{1c} by isoelectric focusing. *Clin Chim Acta* 1978; 86: 61-65.
43. Simon M and Cuan J. Hemoglobin A_{1c} by isoelectric focusing. *Clin Chem* 1982; 28: 9-12.
44. Fischer RW, DeJong C, Voigt E, Berger W and Winterhalter KH. The colorimetric determination of HbA_{1c} in normal and diabetic subjects. *Clin Lab Haematol* 1980; 2: 129-138.
45. Menez JF, Meskar A, Lucas D, Darragon T, Floch HH and Bardon LG. Glycosylated hemoglobin and serum proteins : Semi-automated estimation. *Clin Chem* 1981; 27: 1947-1948.
46. Burrin JM, Worth R, Ashworth LA, Currie S and Alberti KGM. Automated colorimetric estimation of glycosylated haemoglobin. *Clin Chim Acta* 1980; 106: 45-50.
47. Dolhofer R and Wieland OH. Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus. *Diabetes* 1980; 29: 417-422.
48. John WG and Jones AE. Affinity chromatography : A precise method for glycosylated albumin estimation. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 79-83.
49. Yatscoff RW, Tavaarwerk GJM and MacDonald JC. Quantitation of nonenzymatically glycated albumin and total serum protein by affinity chromatography. *Clin Chem* 1984; 30: 446-449.
50. Paisey R, Hopton M and Hartog M. Correlation between skin glycosylation and glycemic control in human diabetes. *Clin Endocrinol* 1984; 20: 521-525.
51. Nathan DM, Dunn BS and Francis TB. Two commercial methods evaluated for estimating the labile fraction from the assay for glycated hemoglobin (glycohemoglobin). *Clin Chem* 1984; 30: 109-110.
52. Kemp SF, Horn TR and Creech RH. The use of glycosylated albumin (Gly-alb) and glycosylated transferrin (Gly-trans) as short-term markers of control in diabetes. *Clin Res* 1983; 31: 851.
53. McMillan DF and Brooks SM. Erythrocyte spectrin glycosylation in diabetes. *Diabetes* 1982; 34 (Suppl): 64-69.
54. Agard E and Bauer B. Platelet aggregation in Type I diabetes

- with and without proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmologica* 1987; 65: 358-362.
55. Schleicher E and Wieland OH. Changes in human glomerular basement membrane in diabetes mellitus. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 223-227.
56. Schober E, Pollak A, Coradello H and Lube G. Glycosylation of glomerular basement membrane in type 1 (insulin-dependent) diabetic children. *Diabetologia* 1982; 23: 485-487.

นันทยา ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)
ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่