ผลของวิตามิน ซี ต่อการเกิด HEINZ BODY ในเม็ดเลือดแดงพร่องเอ็นไซม์-กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ในคนไทยภาคเหนือ

อรพินธ์ ไชยารัศมี วท.บ., M.T. (ASCP) *
ชวดี วิสิฐพงศ์พันธ์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) **

บทคัดย่อ

ในผู้ป่วยที่พร่องเอ็นไซม์-กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6-PD) เมื่อได้รับยาประเภทออกซิไดซ์ จะเกิดการทำลายของเม็ดเลือดแดงในเส้นเลือด โดยทำให้เกิด Heinz Body ได้ รายงานนี้ได้ศึกษาผลของวิตามิน ซี ต่อการเกิด Heinz Body ในผู้ป่วยพร่องเอ็นไซม์ G-6-PD และพบว่าวิตามิน ซี ที่ความเข้มข้น 0.5 - 2 mM สามารถยับยั้งการเกิด Heinz Body จากการกระตุ้นด้วย Acetylphenyl hydrazine (APH) ได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของวิตามิน ซี สูงขึ้น ความสามารถในการยับยั้งจะลดลง รายงานนี้ให้ข้อสังเกตว่า ผลของวิตามิน ซี ต่อผู้ป่วยพร่องเอ็นไซม์ G-6-PD ในคนไทยซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิด Gd มหิดล มีผลเช่นเดียวกับที่ Winterbourn (1979) ได้เคยรายงานไว้ ในผู้ป่วยพร่องเอ็นไซม์ของคนผิวดำ ซึ่งส่วนใหญ่เป็น Gd A^-

บทนำ

กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (G-6-PD) เป็นเอ็นไซม์ประเภทออกซิโดรีดัคเทส มีความสำคัญต่อขบวนการสลายตัวของน้ำตาล โดยผ่านทาง Hexose monophosphate (HMP) Shunt การพร่องเอ็นไซม์นี้เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรม[1] ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติในหน้าที่ในการเปลี่ยน กลูโคส-6-ฟอสเฟต ไปเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนท รวมทั้งความแข็งแรงของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดงลดลง ผู้ป่วยพร่องเอ็นไซม์อาจเกิดภาวะโลหิตจางโดยการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงเนื่องจากใช้ยาได้ เพราะไม่สามารถเปลี่ยน GSSG ไปเป็น GSH ได้ จึงมีการออกซิเดชั่นของ Methemoglobin ไปเป็น intermediate Choleglobin, haemichrome และในที่สุดเป็น Heinz Body ซึ่งตกตะกอนในเม็ดเลือดแดง[2] มีผู้รายงานว่า วิตามิน ซี สามารถป้องกันการเกิด Heinz Body ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยผิวดำที่พร่องเอ็นไซม์ G-6-PD[3] และยังมีผู้รายงานอีกว่า ในผู้ป่วยที่พร่องเอ็นไซม์นี้ เมื่อได้รับวิตามิน ซี ปริมาณสูงจะเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงในเส้นเลือดได้[4,5] G-6-PD ในคนไทย วิจารณ์ พานิช[6] ได้รายงานไว้มี

---

* ภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี้ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Bull Chiang Mai AMS
Vol 16, No 3, September 1983.

Variant ของเอ็นไซม์ G-6-PD ถึง 18 ชนิด แต่ชนิดที่พบบ่อยในคนที่พร่องเป็นชนิด Gd มหิดล และในคนนิโกรที่พร่องเอ็นไซม์นี้ส่วนใหญ่พบชนิด Gd A^- รายงานนี้เพื่อศึกษาผลของวิตามิน ซี ต่อการเกิด Heinz Body ในผู้ป่วยพร่องเอ็นไซม์ในคนไทย ซึ่งมีชนิดที่แตกต่างไปจากคนผิวดำว่าเป็นเช่นไร

วัสดุและวิธีการ

1. การวัดเอ็นไซม์ G-6-PD

เก็บเลือดด้วยสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA และเก็บไม่เกิน 1 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบ นำมาทดสอบวัดระดับเอ็นไซม์ โดยใช้วิธี Methylene blue reduction[7], และวิธีการทดสอบด้วยการเรืองแสง[8]

2. การทดสอบการเกิด Heinz Body

นำเลือดมากระตุ้นด้วย APH (100 มก./100 มล. ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ซึ่งเตรียมใหม่ใช้ภายใน 30 นาที แล้วนำไปอุ่นที่ 37°ซ. นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจวัด Heinz Body โดยใช้ วิธีย้อมสีด้วย Crystal violet[9] และวิธีวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร[10] โดยวัดค่า Absorbance (A) ครั้งแรกก่อนปั่นให้เป็น A_1 แล้วนำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้ววัดค่า A ของน้ำใสส่วนบนเป็น A_2 หาค่าความขุ่น $(\Delta A) = A_1 - A_2$

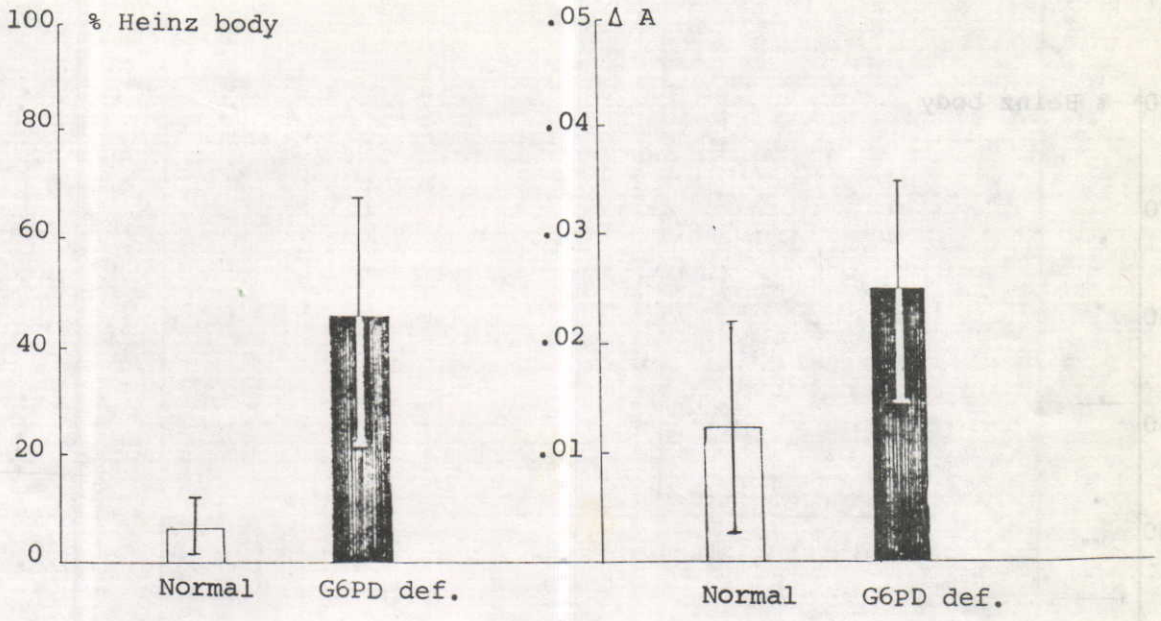
3. การทดสอบผลของวิตามิน ซี ต่อการเกิด Heinz Body

นำเลือดผู้ป่วยที่พร่องเอ็นไซม์มากระตุ้นด้วย APH ตามวิธีข้างต้น และเติมวิตามิน ซี ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่ 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10 mM ลงในแต่ละราย แล้วนำมาตรวจวัด Heinz Body ด้วยวิธีทั้งสอง

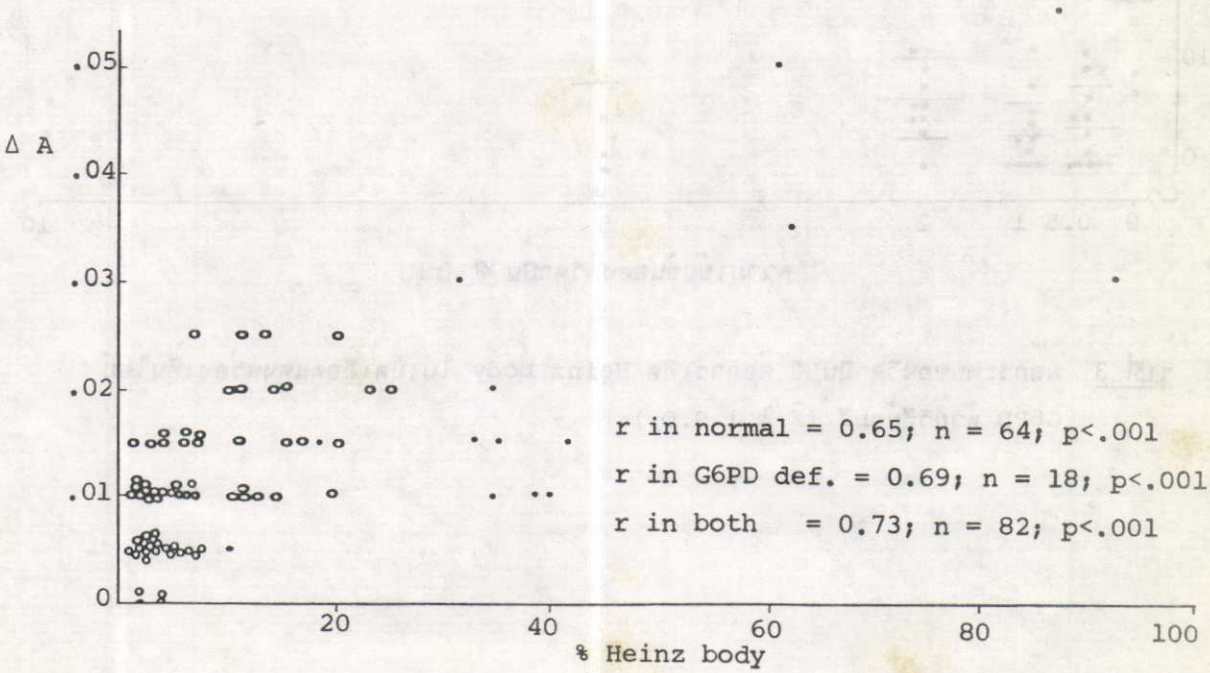
ผลการทดลอง

จากคนไข้ในโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ 82 ราย พบว่ามีผู้ป่วยพร่องเอ็นไซม์ 15 ราย (18.2 %) โดยวิธี methylene blue reduction และพบ 18 ราย (21.9 %) โดยวิธีตรวจการเรืองแสง

การเกิด Heinz Body จากการกระตุ้นด้วย APH ในคนปกติ และคนพร่องเอ็นไซม์ที่ตรวจพบโดยวิธีวัดการเรืองแสง พบว่า ค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm 1$ S.D.) ของ Heinz Body ด้วยวิธีย้อมด้วย crystal violet ในคนปกติจะต่ำกว่าในคนที่พร่องเอ็นไซม์อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบ 6.99 ± 5.37 ในคนปกติ ต่อ 45.3 ± 22.5 ในคนพร่องเอ็นไซม์ และพบว่าการเกิด Heinz Body ด้วยวิธีวัดความขุ่นที่ 700 นาโนเมตร ค่า Δ A ในคนปกติ จะต่ำกว่าในคนพร่องเอ็นไซม์

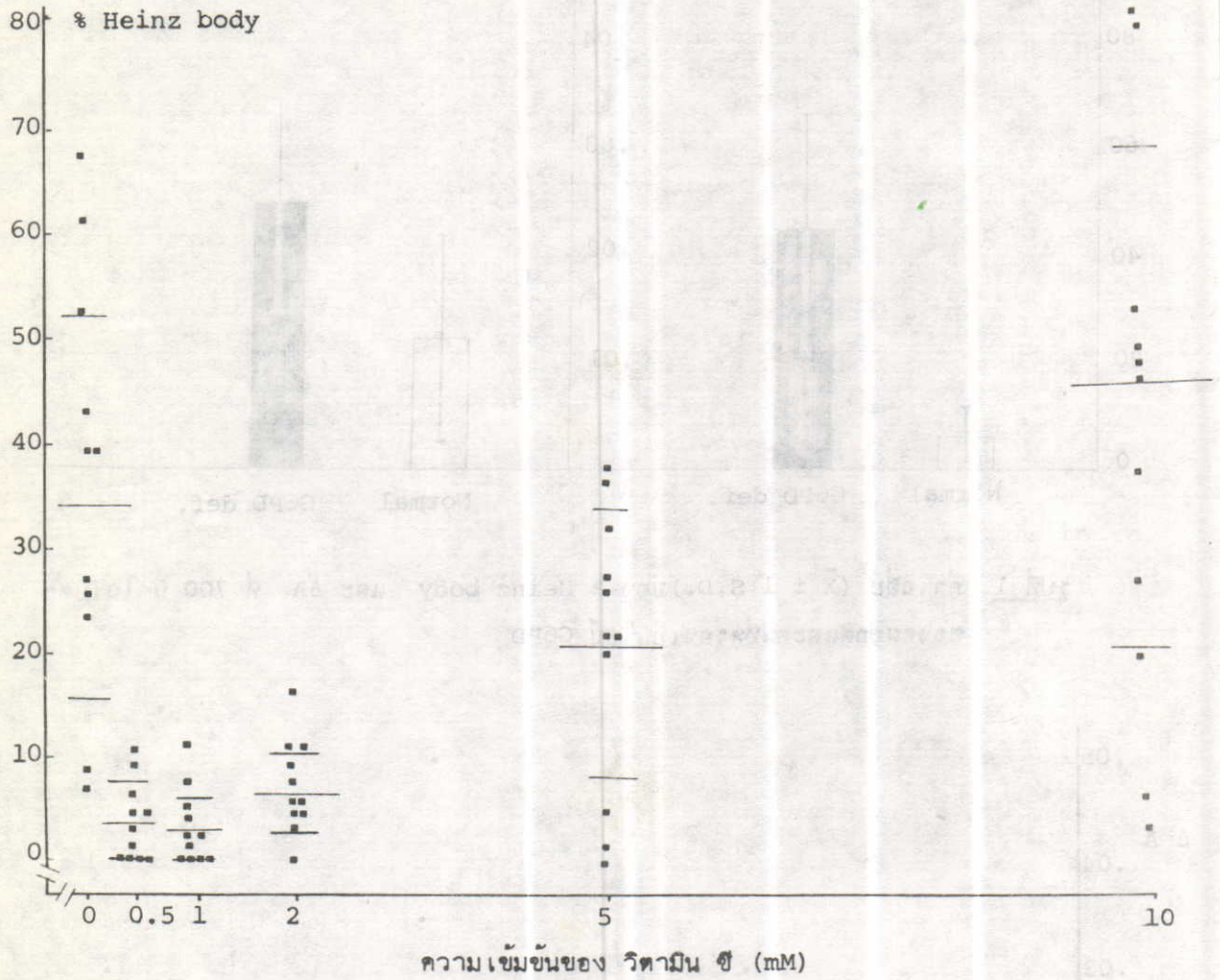


รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm 1$ S.D.)ของ % Heinz body และ ΔA ที่ 700 นาโนเมตร ของคนปกติและคนที่พร่องเอ็นไซม์ G6PD

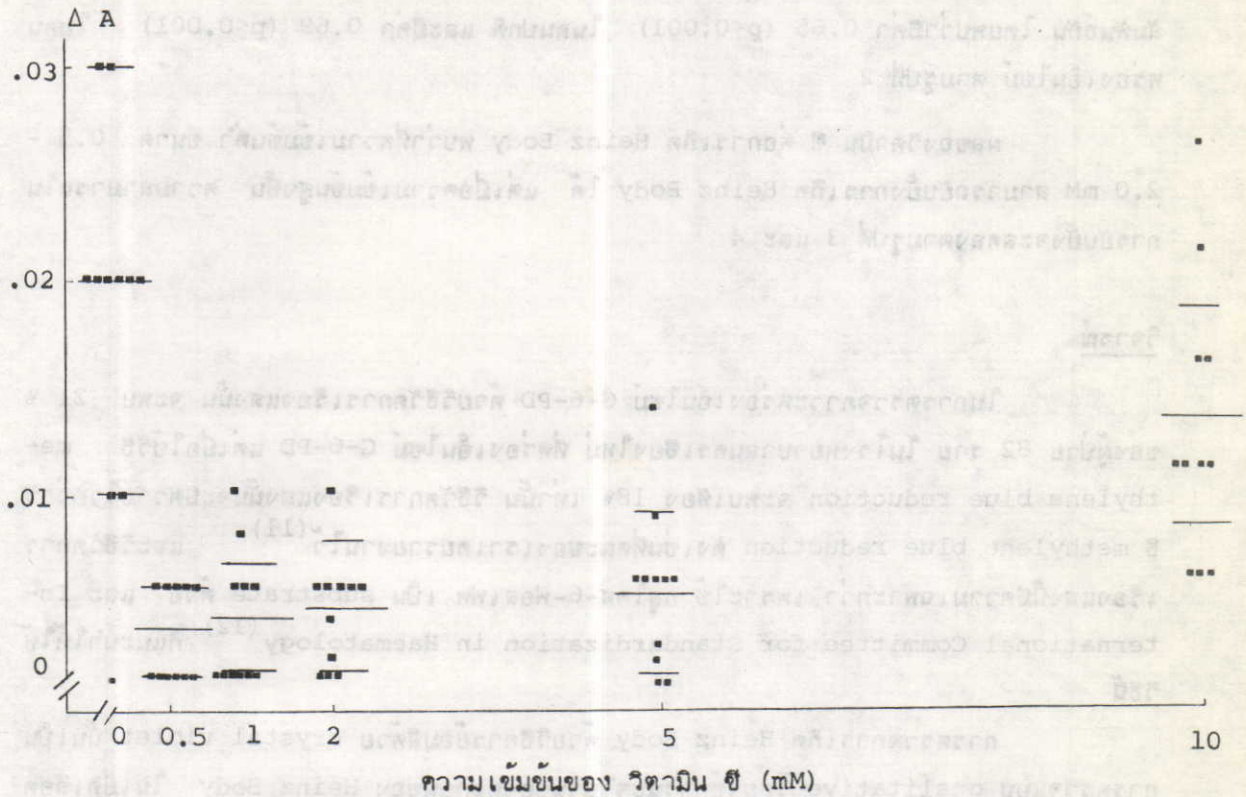


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ของ % Heinz body ด้วยวิธีการย้อมสี กับ ΔA ด้วยวิธีวัดความขุ่น ในคนปกติ (O) และคนที่พร่องเอ็นไซม์ G6PD (•)

Bull Chiang Mai AMS
Vol 16, No 3, September 1983.



รูปที่ 3 ผลกระทบของวิตามิน ซี ต่อการเกิด Heinz body ในเม็ดเลือดแดงพร่องเอ็นไซม์ G6PD ด้วยวิธีย้อมสี ($\bar{X} \pm 1$ S.D.)



รูปที่ 4 ผลกระทบของวิตามิน ซี ต่อการเกิด Heinz body ในเม็ดเลือดแดงพร่องเอ็นไซม์ G6PD ด้วยวิธี Δ A ที่ 700 นาโนเมตร ($\bar{X} \pm 1$ S.D.)

Bull Chiang Mai AMS
Vol 16, No 3, September 1983.

เช่นเดียวกัน (0.012 ± 0.01 ต่อ 0.025 ± 0.01) ตามรูปที่ 1

การทดสอบการเกิด Heinz Body ด้วยวิธีการย้อมสี และวัดความขุ่น พบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยพบว่ามีค่า 0.65 ($p<0.001$) ในคนปกติ และมีค่า 0.69 ($p<0.001$) ในคนพร่องเอ็นไซม์ ตามรูปที่ 2

ผลของวิตามิน ซี ต่อการเกิด Heinz Body พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ขนาด 0.5 - 2.0 mM สามารถยับยั้งการเกิด Heinz Body ได้ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ความสามารถในการยับยั้งจะลดลงตามรูปที่ 3 และ 4

วิจารณ์

ในการตรวจภาวะพร่องเอ็นไซม์ G-6-PD ด้วยวิธีวัดการเรืองแสงนั้น จะพบ 21 % ของผู้ป่วย 82 ราย ในโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ ที่พร่องเอ็นไซม์ G-6-PD แต่เมื่อใช้วิธี methylene blue reduction จะพบเพียง 18% เท่านั้น วิธีวัดการเรืองแสงนั้นจะมีความไวกว่าวิธี methylene blue reduction ดังเช่นที่คณะของเราเคยรายงานไว้[11] และวิธีวัดการเรืองแสงนี้มีความเฉพาะกว่า เพราะใช้ กลูโคส-6-ฟอสเฟต เป็น substrate ด้วย และ International Committee for Standardization in Haematology[12] ก็แนะนำให้ใช้วิธีนี้

การตรวจการเกิด Heinz Body ด้วยวิธีการย้อมสีด้วย crystal violet นั้นเป็นการตรวจแบบ qualitative โดยใช้การนับจำนวนของตะกอนของ Heinz Body ในเม็ดเลือดแดงที่มากกว่า 5 จุดขึ้นไปเป็นผลบวก ข้อดีของการย้อมสีนี้ คือ ทำได้สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องการเครื่องมือพิเศษ แต่อาจมี inclusion ชนิดอื่นปะปนได้ ส่วนวิธีวัดความขุ่นนั้นเป็นวิธี quantitative วัดปริมาณของ Heinz Body ที่เกิดขึ้นทั้งหมด แต่มีข้อเสียคือ อาจจะมี red cell stroma ปะปนได้ แต่ทั้งสองวิธีนี้ก็พบว่ามีความสัมพันธ์กัน ตามรูปที่ 2

ในเม็ดเลือดแดงเมื่อถูกกระตุ้นด้วย APH (PhNHNAc) ในเม็ดเลือดแดง oxyhaemoglobin ในรูปของ superoxoferrihaemoglobin ($Hb^{3+}O_2^-$) จะถูกเปลี่ยนไปเป็น methemoglobin ในขณะเดียวกันก็เกิด acetylphenylhydrazyl radical ($APH^{\cdot}$) และจะทำปฏิกริยาต่อเนื่องกันไปตามสมการ[10]

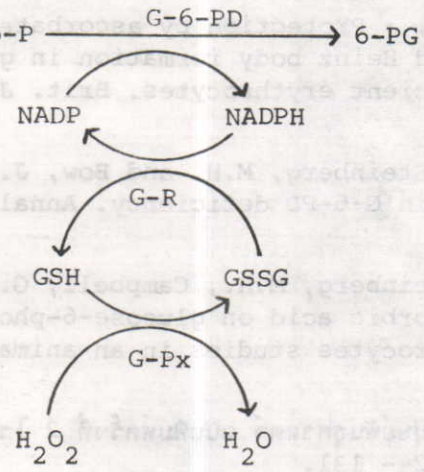
$$Hb^{3+}O_2^- + APH + H^+ \longrightarrow Hb^{3+}H_2O_2 + APH^{\cdot}$$

$$APH^{\cdot} + Hb^{3+}O_2^- \longrightarrow Hb^{3+}H_2O_2 + PhN{=}NAc$$

$$APH^{\cdot} + O_2 \longrightarrow O_2^{-\cdot} + H^+ + PhN{=}NAc$$

$$APH^{\cdot} + O_2^{-\cdot} + H^+ \longrightarrow O_2 + APH$$

พิษของ APH radical, superoxide ($O_2^{-\cdot}$) จะทำให้ oxyhaemoglobin เปลี่ยนไปเป็น methemoglobin, haemichrome และเกิด Heinz Body ในที่สุด ในภาวะปกติ เมื่อเม็ดเลือดแดงถูกกระตุ้นด้วย APH นั้น เอ็นไซม์ G-6-PD จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกริยาการเปลี่ยน กลูโคส-6-ฟอสเฟต (G6P) ไปเป็น 6 -ฟอสโฟกลูโคเนต (6-PG) ปฏิกริยานี้จะให้ NADPH ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิด reduced glutathione (GSH) ดังสมการ



G-R = Glutathione reductase

G-Px = Glutathione peroxidase

French, 1978[10] ได้รายงานว่า วิตามิน ซี (H_2A) และ GSH จะทำหน้าที่เป็น radical scavenger กำจัด APH radical ให้ลดลง มีผลทำให้ Heinz Body ลดลงในที่สุดดังสมการ

$$GSH + APH^{\cdot} \longrightarrow GS. + APH$$

$$2\ GS. \longrightarrow GSSG$$

หรือ

$$H_2A + APH \longrightarrow HA. + APH$$

$$2HA \longrightarrow H_2A$$

Winterbourn, 1979[3] ได้พบว่า วิตามิน ซี 0.5 - 2 mM สามารถยับยั้งภาวะพร่องเอ็นไซม์ G-6-PD ในเลือดคนอัฟริกาได้ รายงานนี้ก็พบเช่นเดียวกันว่าวิตามินซีระดับต่ำสามารถยับยั้งการเกิด Heinz Body ได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้น ความสามารถนี้จะลดลง เช่นเดียวกับที่ Campbell, 1975[4] ได้รายงาน ในผู้ป่วยที่พร่องเอ็นไซม์ G-6-PD ในคนอัฟริกา เมื่อได้รับวิตามินซี ขนาดสูง ก็จะทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกในเส้นเลือดได้.

เอกสารอ้างอิง

1. Erslev, A.J. and Gabuzda, : In Pathophysiology of Blood. W.B.Saunders Co., 2nd. ed., 1979, pp. 23-113.

2. Chan, T.K., Todd, D., and Tso, S.C. : Drugs-induced hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Brit. Med. J. 2 : 1227-1229, 1976.

3. Winterbourn, C.C. : Protection by ascorbate against acetylphenylhydrazine induced Heinz body formation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes. Brit. J. Hemat. 41: 245-252, 1979.

4. Campbell, G.D., Steinberg, M.H. and Bow, J.D. : Ascorbic acid induced hemolysis in G-6-PD deficiency. Annal Intern. Med. 82 : 810, 1975.

5. Udomratn, T., Steinberg, M.H., Campbell, G.D., and Oelshlegel,F.J. : Effects of ascorbic acid on glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency erythrocytes studies in an animal model. Blood 49 :417-475, 1977.

6. วิจารณ์ พานิช ใน มนุษย์พันธุศาสตร์ ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์พิฆเณศ กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2524 หน้า 122 - 131.

7. Brewer, G.J. : The methemoglobin reduction test for primaquine - type sensitivity of erythrocytes : A simplified procedure for detecting a specific hypersusceptibility to drug hemolysis. JAMA 180 : 386, 1962.

8. Dougherty, W.M. : An Introduction to Hematology. St. Louis, The C.V. Mosby Company, 2nd. ed. 1976, pp. 176-177.

9. Sam Frankel, S., Reitman, S., and Sonnenwirth, A.C. : In Clinical Laboratory Method and Diagnosis. Vol. I, 7th. ed., 1970, pp. 531 - 532.

10. French, J.K., Winterbourn, C.C. and Carrell, R.W. : Mechanism of oxyhemoglobin breakdown on reaction with acetylphenylhydrazine.Biochem. J. 173 : 19-26, 1978.

11. อรพินธ์ ไชยารัศมี และ สุรพร มาตระกูล : การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาระดับเอ็นไซม์ G-6-PD ระหว่างวิธี methylene blue reduction กับ Fluorescent spot test วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ 14 : 127-135, 2524.

12. Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C. : Lohr, G.W., Ramot,B., and Valentine, W.N. : International Committee for Standardization in Haematology : Recommended screening test for glucose -6- phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. Brit. J. Haemat. 43 :469 - 477, 1979.

A B S T R A C T

EFFECTS OF VITAMIN C ON G-6-PD DEFICIENT ERYTHROCYTES IN NORTHERN THAIS

Orapin Chaiyarasamee B.Sc., M.T. (ASCP) *
Chawadee Wisitpongpun B.Sc. (Med.Tech.) **

G-6-PD deficiency is the common causative of intravascular hemolysis during intercurrent illness upon exposure to oxidant drugs group. It was proposed that 0.5 - 2.0 mM of ascorbic acid could be used as an inhibitor of Heinz body formation induced by oxidative drugs as acetylphenylhydrazine (APH). This inhibition was decreased at high concentration of vitamin C. This paper pointed that the effect of vitamin C on Heinz body formation in G-6-PD deficient red cell in Thais (mostly type Gd Mahidol) was similar to G-6-PD deficiency in Africa (GdA-).

---

* Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

** Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University.