

วารสาร  
เทคนิคการแพทย์  
เชียงใหม่

กท. 42  
กท.



BULLETIN OF  
CHIANG MAI  
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2534

VOLUME 24 NO 1 JANUARY 1991 ISSN 0125-5347

## ปณิธานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นมหาวิทยาลัยแห่งแรกในส่วนภูมิภาค  
จัดตั้งขึ้นตามนโยบายของรัฐและเจตนารมณ์ของประชาชนในภาคเหนือ  
ให้เป็นศูนย์กลางทางวิชาการและวิชาชีพชั้นสูง  
เพื่ออำนวยประโยชน์แก่ท้องถิ่นและประเทศชาติโดยรวม

มหาวิทยาลัยแห่งนี้ เป็นแหล่งสะสม ค้นคว้า วิจัย และถ่ายทอดความรู้  
ตามหลักการแห่งเสรีภาพทางวิชาการ โดยยึดมั่นในสัจธรรมและคุณธรรม  
เพื่อความ เป็นเลิศทางวิชาการ การประยุกต์เผยแพร่และการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม  
บัณฑิตแห่งมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พึงฝึกฝนงานการฝึกตน เป็นผู้มีรู้จริง คิดเป็น ปฏิบัติได้  
สามารถครองตน ครองคน ครองงาน ด้วยมโนธรรมและจิตสำนึกต่อสังคม

เลขที่ \_\_\_\_\_  
เลขทะเบียน AMG ๑380  
วันที่ เดือน ปี 16 ก.ค. ๗๑

## วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

<b>วัตถุประสงค์</b>	เพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการสาขาเทคนิคการแพทย์ รังสีเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และสาขาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับทางด้าน วิทยาศาสตร์สุขภาพ	
<b>เจ้าของ ที่ปรึกษาภาคินศาสตร์ ที่ปรึกษา</b>	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โทรศัพท์ 221829 นายแพทย์ชัยโรจน์ แสงอุดม สนอง ไชยารัตน์ เนตร สุวรรณภานุสน์ สนธิ มกรแก้วเกษร ประสิทธิ์ ชนะรัตน์	
<b>บรรณาธิการ รองบรรณาธิการ กองบรรณาธิการ</b>	เดชา ร่มไทรย์ วารุณี คณาชีวะ รุจจาภา นุ่มสังข์ เพ็ญศรี วรภุมล ระวีวรรณ รัชติเจริญรัตน์ พรทิพย์ วัฒนาวีหวัส	สิชล สงค์ศิริ จันจรี ศิริวิทยาการ ศุภร สดะพาหะ สมาลัย วัจวรรณรัตน์ วิยะดา ศักดิ์ศรี
<b>ผู้จัดการ ฝ่ายจัดการ</b>	จรียา กาทอง ถวัล เรนทร มนัส ศรีสัตบุตร	ธวัช พัยคณา สนั่น นันตะเสน
<b>ฝ่ายทะเบียน ผู้ช่วยฝ่ายทะเบียน แพทย์ ศิลปกรรม กำหนดออก พิมพ์</b>	รัตนา สาคร นันทยา งามสัตย์ สุภาพร นิลเกษ บรรลือ สวมสร ราย 4 เดือน (มกราคม, พฤษภาคม, กันยายน) โรงพิมพ์โรงพยาบาลสวนปรุง เชียงใหม่	

**BULLETIN OF CHIANG MAI  
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES**

---

- OFFICIAL PUBLISHER** : Faculty of Associated Medical Sciences,  
Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
- OBJECTIVE** : Bull Chiang Mai AMS (ISSN 0125-5347) publishes original research reports, reviews, editorials, notes, letters to editor and abstracts. Manuscripts relevant to any and all aspects of medical technology, radiologic technology, occupational therapy and physical therapy are welcome.
- HONORED CONSULTANT** : Chairong Saeng-Udom, M.D.
- CONSULTANTS** : Sanong Chaiyarasamee  
Netr Suwankrughasn  
Sanit Makornkawkeyoon
- EDITOR IN CHIEF** : Prasit Chanarat
- ASSOCIATE EDITOR** : Decha Romcai
- BOARD OF EDITORS**
- |                         |                           |
|-------------------------|---------------------------|
| Warunee Kunachiwa       | Sichon Songsiri           |
| Rujapa Nimsung          | Junjaree Siritwittayakorn |
| Pensri Vannareumol      | Suporn Sutabaha           |
| Rawewan Choatcharoenrat | Sumalai Vangvannarath     |
| Pornpip Watanawittawas  | Wiyada Saksri             |
- BUSINESS MANAGER** : Jariya Kathong
- MANAGER STAFFS**
- |                    |                |
|--------------------|----------------|
| Tavil Rantorn      | Tawat Payakkha |
| Manus Srisuttaboot | Sanun Nuntasen |
- REGISTRA** : Ratana Sakorn
- ASSISTANT REGISTRAR** : Nuttaya Jaisat
- TREASURER** : Supaporn Nilakesh
- ILLUSTRATOR** : Bhanleur Samosorn
- PUBLISHED** : Tertially (January, May, September)
- SUBSCRIPTION** : Subscriptions are to be prepaid; and rates per year :  
\$ US 15 for all outsides.
- EDITORIAL OFFICE** : All correspondence should be addressed to the editor  
Prasit Chanarat  
Faculty of Associated Medical Sciences,  
Chiang Mai University, Thailand 50002

# วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือน มกราคม 2534

## สารบัญ

	หน้า
<b>บทบรรณาธิการ</b>	
Zinc Protoporphyrin : นัยสำคัญในการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเหล็ก และตะกั่ว เป็นพิษ นันทยา ชนะรัตน์ และ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์	1
<b>บทความปริทัศน์</b>	
ทัศนปัจจุบันเกี่ยวกับปรีดีมาน้ำสภาวะ นันทยา ชนะรัตน์	9
<b>นิพนธ์ต้นฉบับ</b>	
ความหนาแน่นและการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ ศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์ สุชาดา ไชยสวัสดิ์ สนอง ไชยรัตน์ และ ดำรงค์ พิทยานนท์	29
การพัฒนาการตรวจวัดด้วยเทคนิคอิมมูโนโอฟิแอฟฟินิตี Affinity Chromatography นันทยา ชนะรัตน์ สันทัต ขอพทธานภพ และ ไมตรี สุทธิจิตต์	37
Zinc Protoporphyrin ในหญิงมีครรภ์ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ บุญเกียรติ แซ่ตั้ง สนอง ไชยรัตน์ และ นันทยา ชนะรัตน์	47
<b>บันทึก</b>	
การควบคุมคุณภาพภายในของการตรวจสอบแผ่นสเมียร์เลือด ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ และ สุชาดา ไชยสวัสดิ์	53
<b>ถาม-ตอบ</b>	63

**BULLETIN OF CHIANG MAI  
ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES**

Volume 24    Number 1    January 1991

---

**CONTENTS**

	<b>PAGE</b>
<b>Editorial</b>	
Zinc Protoporphyrin : Clinical Significance in Diagnosis of Iron Deficiency Anemia and Lead Poisoning Nantaya Chanarat and Prasit Chanarat	1
<b>Review</b>	
Current Concept of Urinary Protein Nantaya Chanarat	9
<b>Research Articles</b>	
Platelet Density and Aggregation in Thalassemia Prasit Chanarat, Siriluk Wangpitakwong, Suchada Chaisawadi Sanong Chaiyarasamee and Damrong Pintanond	29
Development of Affinity Chromatography Column for Glycated Hemoglobin Determination Nantaya Chanarat, Santad Khobudhanuparb and Maitree Suttajit	37
Zinc Protoporphyrin in Pregnancy Prasit Chanarat, Boonkiat Sae-Tung, Sanong Chaiyarasamee and Nantaya Chanarat	47
<b>Note</b>	
Internal Quality Control of Blood Smear Prasit Chanarat and Suchada Chaisawadi	53
<b>Question-Reply</b>	63

บทบรรณาธิการ

**ZINC PROTOPORPHYRIN : นัยสำคัญ**

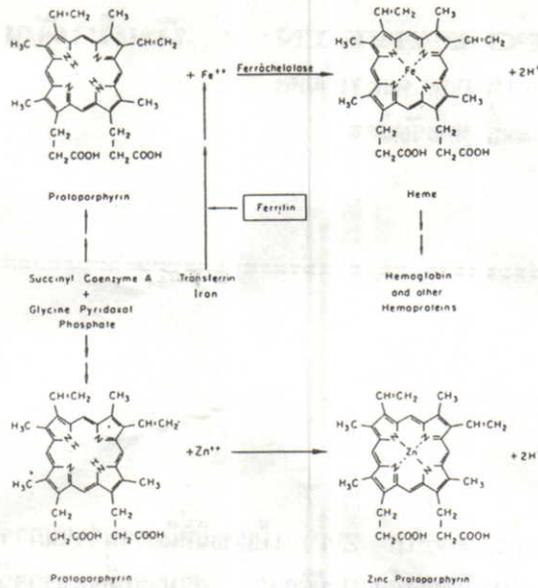
งานการตรวจวินิจฉัยภาวะพร่องเหล็กและตะกั่วเป็นพิษ  
นันทยา ชนะรัตน์\* และ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์\*\*

Zinc protoporphyrin (ZPP) เป็นดัชนีที่มีความไวในการบ่งชี้ภาวะเหล็ก  
ในร่างกายน การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ สามารถที่จะตรวจวัดอัตราส่วนของ  
ZPP ต่อ heme (เพื่อการวินิจฉัยภาวะโลหิตจางจากการพร่องเหล็ก (Iron defi-  
ciency anemia) ซึ่งการตรวจวัดนี้ มีวิธีการที่สามารถทำได้รวดเร็ว ง่าย  
และราคาไม่สูงนัก โดยวัดการเรืองแสงของ ZPP ที่เพิ่มขึ้น ในเลือดที่เจาะจาก  
ปลายนิ้ว ด้วยเครื่องวัดการเรืองแสงโดยตรง นอกจากนี้ ZPP ยังมีค่าสูงในผู้ป่วย  
ภาวะตะกั่วเป็นพิษเรื้อรัง (Chronic lead poisoning) ซึ่งการทดสอบดังกล่าวนี้  
เหมาะสมอย่างยิ่ง ที่จะใช้เป็น การทดสอบกรอง เพื่อค้นหาภาวะโลหิตจางจากการพร่อง  
เหล็ก และภาวะตะกั่วเป็นพิษเรื้อรัง

ในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดง จะมี  
การสร้างฮีม (Heme) โดยการรวมตัวของ  
Ferrous ion กับ Protoporphyrin IX  
และมี Ferrochelatase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา  
(รูปที่ 1) นอกจากนี้ เมื่อมี Zn อยู่ด้วย จะมี  
การรวมตัว (Chelation) ระหว่าง Zn กับ  
protoporphyrin เป็น Zn protoporphyrin  
(ZPP) ในภาวะปกติจะมี Zn อยู่ในร่าง  
กายจำนวนเล็กน้อย ดังนั้นจึงมี protopor-  
phyrin ส่วนน้อยในเม็ดเลือดแดงที่จับกับ Zn  
อยู่ (ดูแผนภาพที่ 1) และทำให้ protopor-  
phyrin ที่รวมกับ Zn แล้วไม่สามารถรวมตัวกับ

เหล็กได้ (Non-functioning metallopor-  
phyrin) เมื่อมีภาวะพร่องเหล็กเกิดขึ้น Zn จะ  
มีการรวมตัวกับ protoporphyrin เกิด ZPP  
ได้มากขึ้น ระดับของ ZPP ในเม็ดเลือดแดงจึง  
สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะการพร่องเหล็กได้

- \* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก  
\*\* อาจารย์ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



**รูปที่ 1** ขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาการสร้างฮีม แสดงภาวะพร่องเหล็ก จะมีสังกะสีไปเกิดปฏิกิริยาแทนที่เหล็ก

ในผู้ป่วยตะกั่วเป็นพิษ จะมีการสังเคราะห์ฮีมลดต่ำลง เนื่องจากตะกั่วสามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการสังเคราะห์ฮีม ได้แก่ d-aminolevulinic (ALA) synthase, ALA dehydrase, Heme synthetase, porphobilinogen deaminase, erythroporphyrinogen decarboxylase และ coproporphyrinogen oxidase ALA dehydrase จะถูกยับยั้งได้ชัดและเห็นได้ชัดเจนกว่าตัวอื่นๆ ผลของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้ ทำให้หิมสารต้นกำเนิดของฮีม คั่งในร่างกายน ได้แก่ d-aminolevulinic acid, coproporphyrin ซึ่งทั้งนี้ในเลือดและปัสสาวะ และ free erythrocyte protoporphyrin คั่งในเม็ด

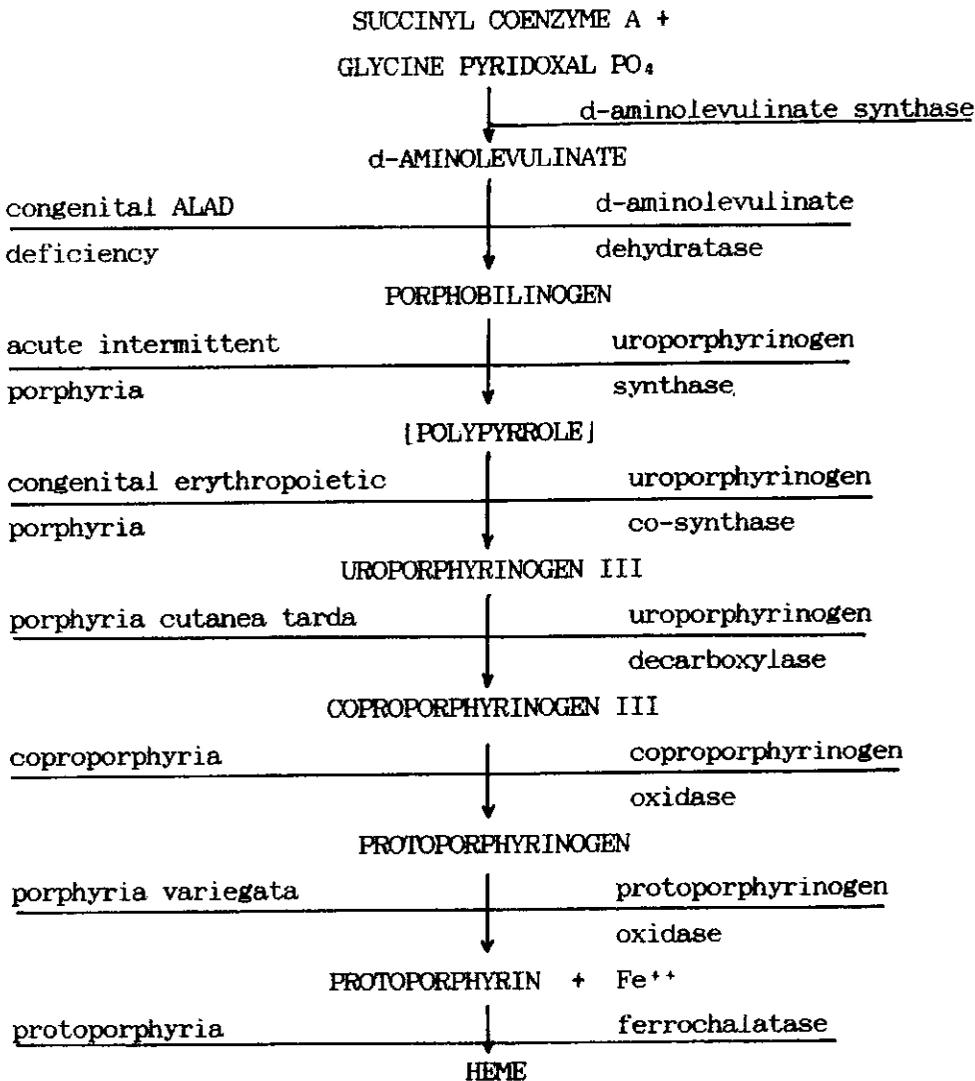
เลือดแดง นอกจากนั้น เอนไซม์ pyrimidine-5' nucleotidase จะถูกยับยั้งการทำงานทำให้การ depolymerization ของ ribosomal RNA ใน reticulocyte เกิดขึ้นไม่ได้ทำให้เกิด Basophilic stippling ในเม็ดเลือดแดง เช่นเดียวกับที่พบในผู้ป่วย Hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency การสังเคราะห์ของ  $\alpha$ - และ  $\beta$ -globin chain ในผู้ป่วยตะกั่วเป็นพิษ จะพบความผิดปกติได้เหมือนกัน

การมีภาวะโลหิตจาง ในผู้ป่วยตะกั่วเป็นพิษเรื้อรัง ถ้าเป็นในผู้ใหญ่อาการจะไม่รุนแรงนัก แต่ถ้าเป็นในเด็กจะรุนแรงกว่า จะเห็นเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็กและตีตสีจางลง ลักษณะ basophilic stippling ในเม็ดเลือดแดงอาจจะ

หายหรือละเอียดก็ได้ และจำนวน granule อาจแตกต่างกันได้ ใช้น้ำย้อม EDTA อาจมีผล ทำให้ basophilic stippling นั้นหายไปได้ Polychromatic cell ต่ำอ่อนและ

stippling จะพบได้น้อยกว่า เมื่อศึกษาการจับกลุ่ม (aggregate) ของ ribosome มีลักษณะผิดปกติในไขกระดูกจะพบ ring sideroblast ได้บ่อย

แผนภาพที่ 1 แสดงการสร้างขึ้นผ่านการสร้าง porphyrin

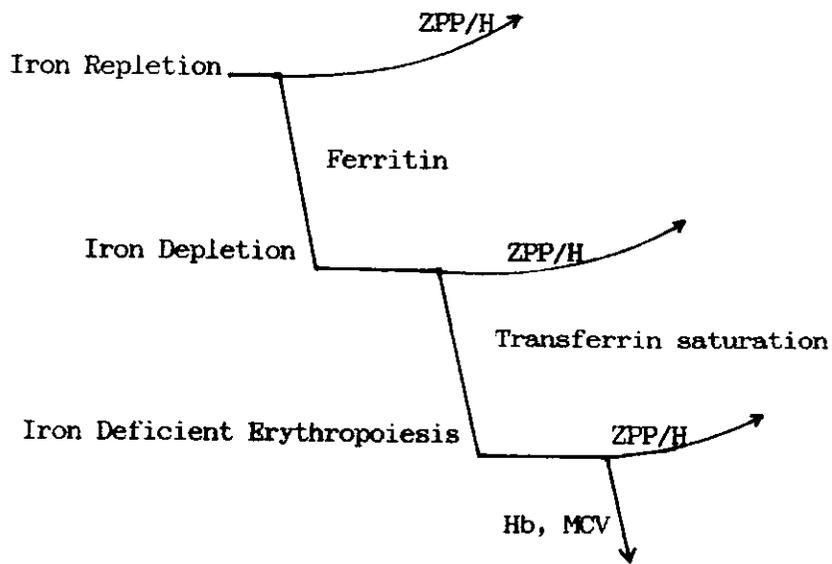


การมีภาวะตะกั่วเป็นพิษ จะยับยั้ง ferro-chelatase ทำให้ ferrous ion รวมตัวกับ protoporphyrin ไม่ได้ ดังนั้นจะมี protoporphyrin อิสระสำหรับรวมตัวกับสังกะสีแทน พบว่าระดับสังกะสีในเนื้อเยื่อของร่างกาย ไม่ว่าจะน้อยหรือมีมากขึ้น ก็ไม่สัมพันธ์กับปริมาณนี้ เนื่องจากการรวมตัวนี้ ใช้ปริมาณสังกะสี จำนวน น้อยมาก

ภาวะโลหิตจางเนื่องจากการพร่องเหล็ก มีสาเหตุจากภาวะทุโภชนาการ ที่เป็นปัญหาสำคัญ อย่างหนึ่งสำหรับประชากรทั่วไป พบว่าประมาณ 20% ของคนทั่วโลก หรือจำนวนหลายร้อยล้านคน ที่มีการพร่องเหล็ก โดยไม่ขึ้นกับอายุ หรือภาวะทางเศรษฐกิจ ทำนองเดียวกัน การเกิดพิษจากสารตะกั่ว ก็นับว่าเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพคนทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในปัจจุบัน มลพิษจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อากาศ ควันเสียจากเครื่องยนต์ โรงงาน สี และอื่นๆ ทำให้คนเราได้รับพิษจากตะกั่วได้ตลอดเวลา ปัญหาพิษตะกั่วจะรุนแรงขึ้นถ้าผู้ป่วยเป็นเด็ก ซึ่งจะทำให้เกิดความผิดปกติ

ทางสมอง มีรายงานในสหรัฐอเมริกาว่าเด็กมากกว่า 6 แสนคน จำเป็นต้องรับการตรวจระดับตะกั่วด้วยสำหรับการตรวจสุขภาพประจำปี ซึ่งการจะพบอาการโลหิตจาง จากการพร่องเหล็กเกิดขึ้น ต้องอาศัยระยะเวลาช่วงหนึ่ง ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะแรก เมื่อมีการลดลงของ storage iron แต่ยังมีเหล็ก ที่ได้รับมาจากทางอื่นเพียงพอ ก็ยังสามารถสร้างเม็ดเลือดแดงได้ตามปกติ แต่ระยะนี้ถ้าตรวจไขกระดูก หรือ ferritin ในซีรัม จะพบว่ามียกระดับลดลง ในปัจจุบันจะใช้ระดับ ZPP ร่วมด้วย เนื่องจาก ZPP/Heme ratio (ZPP/H) จะเปลี่ยนแปลงในระยะที่กำลังเกิดภาวะพร่องเหล็ก (รูปที่ 2) เมื่อเหล็กในไขกระดูกลดลงก่อนที่ภาวะโลหิตจางจะปรากฏ ดังนั้นระดับ ZPP/H สามารถใช้บอกภาวะพร่องเหล็กได้ใน Iron deficiency erythropoiesis ทุกระยะ นอกจากนั้น ZPP/H จะคงตัว ไม่ลดต่ำลงเมื่อมีภาวะติดเชื้อมีขึ้นกับอายุ เพศ หรือเปลี่ยนแปลงตามเวลาเหมือนระดับเหล็กในซีรัม



รูปที่ 2 ลำดับการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างเกิดภาวะพร่องเหล็ก

ระยะที่ 2 คือ ระยะที่มีการสร้างเม็ดเลือดลดลงเมื่อพร่องเหล็กเมื่อยังได้รับเหล็กอยู่บ้าง การสร้างเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนจะลดลง ระยะนี้ระดับฮีโมโกลบิน ยังไม่เห็นการลดลงชัดเจน แต่จะชัดเจนขึ้นเมื่อเหล็กที่สะสมในร่างกาย ถูกใช้ไปหมดแล้ว ถ้าตรวจวัดระดับ transferrin saturation และ blood cell indices จะลดลงโดยเฉพาะ MCV

ระยะที่ 3 จะพบระดับฮีโมโกลบิน ลดลงชัดเจน เม็ดเลือดแดงจะมีขนาดเล็กและติดสีจางลง

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อวินิจฉัยภาวะพร่องเหล็ก มีการทำหลายวิธี ทั้งนี้ต้องพิจารณาวิธีการรักษาประกอบกันด้วย ได้แก่

1. Serum ferritin ระดับ ferritin ที่ต่ำกว่า 12 นาโนกรัม/ดล. แสดงถึงการเกิดภาวะพร่องเหล็ก อาจทำร่วมกับการเอาไขกระดูกมาขย้อมดูเหล็ก ปัญหาของการทำ ferritin คืออาจพบระดับปกติ หรือ เพิ่มขึ้นได้ในผู้ป่วยภาวะพร่องเหล็ก เมื่อมีการแทรกซ้อนจากการติดเชื้อ, malignancies หรือ chronic inflammation disease อื่นๆ และ ferritin บอกไม่ได้ ถึงความรุนแรงของภาวะพร่องเหล็กที่สะสมในร่างกาย ดังนั้นจึงควรมีการทำทดสอบอื่นร่วมไปด้วย เช่น ZPP, %transferrin saturation, hemoglobin เป็นต้น

2. ZPP จะสัมพันธ์คล้ายกับ transferrin saturation ในภาวะที่สร้างเม็ดเลือดน้อยลงเนื่องจากการพร่องเหล็ก แต่ transferrin saturation มีข้อเสียเนื่องจากเป็นส่วนที่ไม่คงตัว อาจจะทำให้ค่าต่ำกว่าที่ควรจะเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรายที่มี inflammation เกิดขึ้นด้วย แต่ ZPP จะไม่สูงขึ้นจนกว่าจะมี iron

deficiency erythropoiesis เป็นเวลานานหลายสัปดาห์ และจะคงอยู่หลายสัปดาห์เช่นกัน หลังจากการรักษาจนหายแล้ว

ZPP จะสูงขึ้น ไม่เฉพาะในรายที่มีภาวะพร่องเหล็ก แต่จะพบในภาวะโลหิตจางจากโรคเรื้อรัง อื่นๆด้วย เช่น การติดเชื้อเรื้อรัง หรือ ภาวะไตวายเรื้อรัง ทั้งนี้เป็นเพราะ การปล่อยเหล็กออกจาก RE cell ถูกกักไว้ ตรงข้ามกับการพร่องเหล็กโดยทั่วไป ซึ่งมีการสะสมเหล็กในไขกระดูกเพิ่มขึ้นร่วมกับ ferritin ในซีรัม แต่ไม่สามารถนำไปใช้ในการสร้างเม็ดเลือด

มีการศึกษาการสะสมเหล็ก ในร่างกายพบที่จากโลหิต พบว่า มีการลดลงมากขึ้นตามความถี่ของการให้เลือด ระดับ free erythrocyte porphyrin (FEP) จะสัมพันธ์กันดีกับค่า ferritin แต่วิธีการทำของทั้งสองอย่างค่อนข้างยุ่งยากและการทำ ferritin สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ส่วนการทำ ZPP จะทำได้ง่ายกว่า และใช้ได้ดีสำหรับการทดสอบกรอง เพื่อตรวจภาวะเหล็กในร่างกายของผู้บริจาคโลหิต

นอกจากการแยกชนิดของ Microcytic anemia แล้ว ZPP ยังสามารถชี้แยกผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ออกจากภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดเหล็กด้วยเนื่องจาก ZPP จะมีค่าปกติในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

Lamona & Yamane ได้เสนอให้ใช้ ZPP ซึ่งเป็นสารเรืองแสงในเม็ดเลือดแดง เป็นตัวบอกถึงความรุนแรงของตะกั่วเป็นพิษ โดยวัดการเรืองแสงของสารในเม็ดเลือดแดงโดยตรง ด้วยเครื่อง Fluorometer พบว่า ZPP ในเลือดสัมพันธ์กันดีกับระดับตะกั่ว ZPP จะดูดกลืนแสงที่ 424 นาโนเมตร (Soret band) และมี fluorescence maxima ที่ 595 นาโนเมตร ซึ่งต่างจาก porphyrin ที่พบใน porphyrias

อื่น ๆ เช่น Erythropoietic protoporphyria และ Porphyria cutanea tarda สามารถทำการตรวจวัด การเรืองแสงของ ZPP ได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องเจาะหรือสกัดออกจากเลือดก่อน ด้วยเครื่องมือที่เรียกว่า Hematofluorometer วิธีที่ง่าย โดยหยดเลือดลงบนแผ่นกระจก เติมน้ำยาเพื่อให้เกิด reoxygenation แล้วเครื่องจะทำการวัด heme ซึ่งเป็นสารที่ดูดกลืนแสงช่วงนี้ด้วย ดังนั้น ความเข้มของการเรืองแสง จะแปรตามจำนวน ZPP ที่มีอยู่ต่อหน่วยของฮีโม หรือวัดเป็น ZPP/H

ratio การ absorb ZPP fluorescence โดยฮีโม จะมีน้อยมาก ส่วนการรบกวนจากสารอื่นที่มีอยู่ในเลือดทั่วไป ก็ถือว่ามีน้อยมากเช่นกัน ปริมาณ ZPP รายงานเป็นไมโครกรัม/ดล. ของ whole blood หรือถ้าจะเปรียบเทียบกับค่าฮีมาโตครีท ก็รายงานเป็น ไมโครกรัม/ดล. ของเม็ดเลือดแดง การมีผลลบลบมาปะปนอยู่ในตัวอย่าง อาจจะมีสารบางชนิดในผลลบลบมาซึ่งเรืองแสงได้ ดังนั้นค่าที่ได้จะสูงขึ้นเล็กน้อย อาจใช้วิธีการล้างเม็ดเลือดแดงก่อนทำการทดสอบ แต่ก็ไม่จำเป็นนัก การมีเม็ดเลือดแดงแตกปน หรือมีบิลิรูบิน หรือ riboflavin สูง จะทำให้เกิดค่าสูงเกินความเป็นจริง และในทางตรงข้าม เลือดซึ่งได้รับออกซิเจนไม่เต็มที่ ก็จะทำให้ค่าต่ำกว่าที่เป็นจริง ในเครื่องมือระบบนี้ มีน้ำยาที่เติมในตัวอย่างเลือด ซึ่งเป็นตัวให้ออกซิเจนเต็มที่แก่เลือดโดยเร็วก่อนทำการทดสอบ

ZPP/H ratio จะสัมพันธ์กันดีกับระดับ ferritin ในซีรัม, transferrin saturation, hemoglobin, MCV และ Red cell distribution width (RDW) และการตรวจวัดนี้ จะทำให้พบอุบัติการณ์ของการพร่องเหล็กได้มากขึ้นกว่าการตรวจแบบเดิมถึง 2 เท่าและเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้สารละลายกรดสกัดเอา

total non-heme protoporphyrin และการหาฮีโมโกลบินสำหรับฮีโม จะได้ความสัมพันธ์ของความสัมพันธ์ = 0.76 ซึ่งไม่ค่อนนัก เนื่องจากทั้งสองวิธีวัดสารคนละตัวกัน

ข้อดีของการวัด ZPP/H ratio โดย ProtoFluor คือราคาถูก และทำได้รวดเร็วกว่าการหา ferritin หรือ transferrin saturation นอกจากนี้ยังสามารถบอกภาวะตะกั่วเป็นพิษได้ดีกว่า เนื่องจากการวัดตะกั่วโดยตรงจะมีการรบกวนจากสารตะกั่วภายนอกได้

วิธีการทำ การวัด erythrocyte porphyrin ทำได้ 2 ทาง คือ การวัดทั้ง Zn chelate และ Free protoporphyrin หรือการวัดตัวใดตัวหนึ่ง

1. การวัดทั้ง ZPP และ FP โดยทั่วไป ใช้การสกัดเอา porphyrin ออกจากเลือดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีกรดด้วยเล็กน้อย เช่น กรดอะซิติกในเอธิลอะซิเตท ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนไปด้วยเหลือแต่ porphyrin อยู่ในสารละลาย แล้วจึงนำมาหาปริมาณโดยการวัดการเรืองแสงด้วยเครื่อง Fluorometer ใช้ extinction wavelength 405-425 นาโนเมตร และ emission filter 590-600 นาโนเมตร รายงาน protoporphyrin เป็นไมโครกรัม/ดล. ของเม็ดเลือดแดง หรือไมโครกรัม/กรัม ฮีโมโกลบิน

2. การวัด ZPP ทำได้โดยตรงโดยไม่ต้องสกัดออกจากเลือดก่อน โดยใช้ Hematofluorometer (Aviv Biomedical) ซึ่งออกแบบให้มีลักษณะเฉพาะเรียกว่า "Front surface illumination" แต่เนื่องจากแม้ว่า protoporphyrin และ Zn-chelate จะเรืองแสง แต่ก็ยังมีการดูดกลืนแสง (quenching) ได้

จากฮีโมโกลบิน ดังนั้น เครื่องมือนี้จึงต้อง calibrate โดยวิธีฮีโมโกลบินที่ทราบปริมาณแน่นอน คือซี 11.3 กรัม/ดล. เพื่อปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็นระบบ Internal standard และใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมเพื่อให้งานรวดเร็วขึ้น

วิธีทำ คัดเลือด 10 ไมโครลิตรหยดลงบนกระจกบางๆ แล้ววางในที่มืดอย่างของเครื่อง ถ้าเป็นเลือด ที่เจาะแล้วทำทันที ก็สามารถทำได้เลย แต่ถ้าเป็นเลือดที่เก็บแบบทั่วไปโดยใส่สารกันเลือดแข็ง ก็ควรจะต้อง reoxygenate ก่อน อาจทำโดยผ่าน compressed room air ลงไปบนผิวเลือด (Aeration) ประมาณ 20 วินาที ก่อนส่งผ่านเข้าเครื่อง หรือใช้ยาเฉพาะ เช่น ProtoFluor reagent จากนั้นภายใน 5 วินาที เครื่องจะอ่าน ZPP ค่ากรัมของฮีโมโกลบินออกมา และเนื่องจากเครื่องได้รับการปรับไว้โดยวิธีฮีโมโกลบิน 11.3 กรัม/ดล. ดังนั้น ค่าที่ได้จะต้อง แก้ไข ดังนี้

$$\text{ZPP corrected} = \frac{\text{ZPP จากเครื่อง} \times 11.3}{\text{Sample Hb}}$$

ความเที่ยง (Precision) ของเครื่องดีมาก มีค่า within-run precision =  $\pm 5\%$  และ day to day precision =  $\pm 5\%$

วิธีการ reoxygenate ทั้ง 2 วิธี ให้ค่าต่างกัน เนื่องจากวิธีซี ProtoFluor จะ reoxygenate ได้มากกว่า ส่วนวิธี aeration อาจจะทำให้เกิด reoxygenate ได้ไม่เต็มที่ ทำให้ค่าต่ำกว่า ดังนี้

	Aeration	ProtoFluor
จำนวน	441	260
Abnormal detected	73	90
% Abnormal	17 %	35 %

การเก็บรักษาตัวอย่างเลือด EDTA blood สามารถเก็บได้ที่ 4 °ซ เก็บได้นานอย่างน้อย 35 วัน โดยไม่มี การเปลี่ยนแปลงค่า erythrocyte porphyrin ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในด้านการศึกษาทางระบาดวิทยาอย่างมาก และสามารถส่งตัวอย่างไปตรวจในที่ห่างไกล โดยไม่ต้องเก็บรักษาตัวอย่างด้วยวิธียุ่งยากอื่น

### ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่าง iron parameters ต่างๆ

ภาวะ เหล็ก	Ferritin	ZPP/Heme	Transferrin saturation	Hb,Hct
Iron repletion	Normal	<80*	Normal	Normal
Iron depletion	↓	↑	→	→
Iron deficient erythropoiesis	↓↓	↑↑	↓	↓
Iron deficiency anemia	↓↓↓	↑↑↑	↓↓	↓↓

ค่าปกติของ ZPP/H มีไม่เกิน 80 ถ้ามากกว่านี้ แสดงถึงว่ามีภาวะพร่องเหล็ก

เนื่องจากการทดสอบ ZPP/H ทำได้ง่าย ราคาถูก และเครื่องมือไม่ยุ่งยากนัก จึงน่าที่จะมีการนำวิธีการนี้เข้ามาใช้ เป็นการทดสอบกรองงำสำหรับการตรวจภาวะ เหล็กในร่างกายน (ตารางที่ 1) และติดตามผลการรักษาได้ ผลการตรวจจะ ให้ประโยชน์ทางคลินิก มากกว่าค่าฮีมาโตครีท และสามารถชี้เลือดจากหลอดเลือด capillary ได้เช่นกันทำได้ เนื่องจากใช้ปริมาณเลือดน้อยมาก ไม่ต้องมีวิธีเก็บตัวอย่างแบบพิเศษอื่น นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างเลือดใน งานธนาคารเลือด เช่นใน ผู้บริจาคโลหิต การตรวจทางแพทยอื่น ๆ หรือในเด็ก ซึ่งต้องการทราบภาวะ เหล็กหรือภาวะ เป็นพิษเนื่องจากตะกั่ว ได้เป็นอย่างดี

**เอกสารอ้างอิง**

1. Rettmer RL, Labbe RF. Zinc protoporphyrin/Heme ratio : Evaluation of the ProtoFluor™ system. Poster Presentation. AACC & CSCC. July 17, 1986.
2. Peter F, Growcock G, Strunc G. Fluorometric determination of erythrocyte protoporphyrin in blood, a comparison between direct (hematofluorometric) and indirect (extraction) methods. Clin Chem 1978; 24: 1515-1517.
3. Labbe RF, Finch CA, Smith NJ, et al. Erythrocyte protoporphyrin/heme ratio in the assessment of iron status. Clin Chem 1979; 25: 87-92.
4. Lamola AA, Elsinger J, Blumberg

- WE. Erythrocyte protoporphyrin/heme ratio by hematofluorometry. Clin Chem 1980; 26: 677-678.
5. Yip R, Schwartz S, Deinard AS. Screening for iron deficiency with the erythrocyte protoporphyrin test. Peds 1983; 72: 214-219.
6. Trundle DS. Erythrocyte zinc protoporphyrin. CCN 1984; 10: 8-10.
7. Rettmer RL, Fernandez-Cano P, Sayers ML, et al. The zinc protoporphyrin/heme ratio in laboratory diagnosis. Clin Chem 1985; 31: 1026.
8. Trundl DS. Erythrocyte zinc protoporphyrin. Analyte 1984.
9. Varley H, Gowenlock AH, Bell M. In Practical Clinical Biochemistry. 5th ed, 1980, William Heinemann Medical Books Ltd, London, pp 952-967.
10. White JM, Selhi HS. Lead and red cell. Br J Haematol 1975; 30: 133.
11. Galan P, Mekki N, Hercberg S. Effect of sample storage on the assay of erythrocyte protoporphyrin by the hematofluorometer method. Acta Haemat 1987; 78: 57-58.

ประสิทธิ์ ชะวรัตน์, ภา.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)  
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทความปริทัศน์

## ทัศนปัจจุบันเกี่ยวกับโปรตีนในปัสสาวะ

นันทยา ชนะรัตน์\*

เป็นที่ยอมรับกันว่า การมีโปรตีนรั่วออกมาทางปัสสาวะ (Proteinuria) จะแสดงถึงการเริ่มมีอาการของโรคไต ซึ่งพบได้บ่อยทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ การมีโปรตีนออกมาทางปัสสาวะ อาจเป็นแบบชั่วคราว (transient) หรือเป็นแบบถาวร (Persistent) หากมีโปรตีนออกมาทางปัสสาวะเป็นเวลานานๆ จะต้องพยายามหาสาเหตุให้ได้ ซึ่งอาจใช้วิธีการคลัสเตอร์ (pattern), ส่วนประกอบ (composition) และปริมาณโปรตีน ร่วมกับลักษณะที่ตรวจพบทางคลินิก ถ้าสามารถแยกชนิดของโปรตีนได้ ก็จะช่วยในการแยกสาเหตุของความผิดปกติของไตว่าเกิดจากส่วนโกลเมอรูลัส และท่อไตได้ บทความนี้ ได้รวบรวมเรื่องราวของโปรตีนในปัสสาวะที่เกี่ยวข้องกับโรคต่างๆ รวมทั้งรายละเอียดของวิธีการ ที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของโปรตีนในปัสสาวะด้วย

Framingham Study ทำการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective) ถึงความสำคัญของการมีโปรตีนออกมาในปัสสาวะ ที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต หรือการตายเนื่องจากเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ และไตวาย (cardiovascular disease และ renal failure) เป็นเวลานาน 16 ปี ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ 5209 ราย อายุระหว่าง 50 ถึง 62 ปี ซึ่งส่วนใหญ่มักพบภาวะนี้ในคนที่อายุที่เดินไปมาได้ แต่คนที่มีการมีโปรตีนรั่วออกมาทางปัสสาวะแบบเป็นครั้งคราว (intermittent proteinuria) มักจะมีภาวะอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การมีความดันโลหิตสูง ในผู้ชายจะมีโปรตีนออกทางปัสสาวะมากกว่าคนปกติ 2.3 ถึง 4.4 เท่า การมีโปรตีนออกทางปัสสาวะนี้ จะทำ

ให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular disease, CVD) และตายง่ายกว่าคนที่ เป็น CVD แต่ไม่มีโปรตีนออกมาทางปัสสาวะ เมื่อทำการผ่าตัด พบว่ามี CVD ในผู้ป่วยบางราย ที่มีโปรตีนในปัสสาวะ ทั้งแบบชั่วคราวและแบบถาวร โดยที่ไม่เคยพบอาการ CVD มาก่อน ผู้ป่วยโรคไตหรือเบาหวาน ถ้ามีการมีโปรตีนออกมาในปัสสาวะร่วมด้วย จะเสียชีวิตได้เร็วขึ้น แม้ว่าจะไม่ มี CVD (1)

\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การพบอัลบูมินเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในปัสสาวะ เพียงประมาณ 15-30 มก./วัน ก็นับว่าเป็นดัชนีสำคัญของการบอกการเกิดโรคไต เพราะฉะนั้นการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ จึงเป็นตัวบอกความผิดปกติของไต ในระยะเริ่มแรกได้ วิธีการทางอิมมูโนเคมี (Immunochemistry) มีความไวสูง ทำให้สามารถวัดปริมาณอัลบูมิน ได้ถึง 10-30 มก./ลิตร หรือต่ำกว่า ซึ่งวิธีการใช้แถบนำยาทดสอบ (dipstick) หรือวิธีการตกตะกอนไม่สามารถวัดได้

การพบโปรตีนในปัสสาวะ แสดงถึงการทำงานของไตมีความผิดปกติ แม้ว่า อัลบูมิน จะผ่านริกลเมอรูลัส ได้ประมาณ 26,000 มก./นาที แต่จะมีเพียงประมาณ 10 ไมโครกรัม ออกมาในปัสสาวะเท่านั้น เพราะฉะนั้นถ้าคำนวณต่อ 24 ชม. ก็จะมีอัลบูมินที่ถูกขับออกมาทางปัสสาวะ ประมาณ 15 มก. ต่อวันจากคนน้ำหนักตัว 37 กิโลกรัม

การขับโปรตีนทางปัสสาวะโดยปกติ

ปัสสาวะ เกิดจากการกรองพลาสมาผ่านเยื่อของผนังหลอดเลือดฝอย บริเวณริกลเมอรูลัส (glomerulus capillary wall, GCW) ในผู้ใหญ่ทั่วไปจะมีการกรองผ่านในอัตรา 125 มล./นาที จากเลือดที่ผ่านไตทั้งหมด 1200 มล. นำและสารอนุภาคเล็ก ๆ เช่น กลูโคส, ยูเรีย จะผ่านออกมาเหลือสารโมเลกุลใหญ่กลับคืนสู่พลาสมา GCW ประกอบด้วย 3 ส่วน ภายในเป็น fenestrated epithelium กัดมาเป็น glomerular basement membrane (GBM) และชั้นนอกสุดเป็น epithelial cell ซึ่งมี interdigitating foot processes แยกตาม filtration slit แต่ละส่วนจะช่วยกันกับ GBM ในการเลือกคัดให้สารผ่าน (permeability) ซึ่ง GBM จะมี semisolid matrix ประกอบด้วย fibrils ทำหน้าที่สำคัญ

เกี่ยวกับ barrier function ดังกล่าว (2)

นอกจากขนาดโมเลกุลแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องอีก เมื่อศึกษาโดยใช้ dextran particle พบว่าอนุภาคที่มีประจุเป็นกลาง (neutral particle) จะผ่าน barrier ได้ดีกว่าอนุภาคที่มีประจุลบ (negative charged particle) ที่มีขนาดเท่ากัน GBM จะมีส่วนที่เป็นประจุลบ ซึ่งจะทำให้สารซึ่งมีประจุบวกผ่านได้น้อยลง และโปรตีนในซีรัม ส่วนใหญ่เช่น อัลบูมิน ก็มีประจุลบที่ pH ในร่างกาย ทำให้ผ่านได้ยากขึ้น ส่วน สาร Polycation ในซีรัม เช่น Lysozyme จะผ่าน GCW ได้ดี

โปรตีนส่วนใหญ่ ในน้ำกรองที่ผ่านจากกรวยไต จะถูกดูดกลับโดยเซลล์ที่ proximal tubule โดยกระบวนการ endocytosis เมื่อโปรตีนผ่านเข้าไปใน vacuole แล้วจะทยอยย่อยโดยเอนไซม์ ได้กรดอะมิโนกลับเข้าสู่กระแสเลือดต่อไป

มีโปรตีนอยู่ 3 ชนิดที่สร้างขึ้นที่ไต ได้แก่

1. Tam-Horsfall protein เป็น mucoprotein สร้างโดยเซลล์อพิทีเลียม ใน distal tubule พบว่ามีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อไวรัส (antiviral activity) และมีส่วนในการสร้าง cast
2. Urokinase (EC 3.4.21.31 หรือ plasminogen activator) เป็น antifibrinolytic enzyme สร้างโดย tubular cell เข้าไปสู่ luminal fluid
3. Secretory IgA สร้างโดยเซลล์อพิทีเลียมที่ท่อไต มีคุณสมบัติเหมือน IgA ที่สร้างที่อื่น ๆ ในร่างกาย

จากที่มีการศึกษามาพบว่า ผู้ใหญ่ปกติจะขับโปรตีนทั้งหมด ออกมาไม่เกิน 150 มก./24 ชั่วโมง ประมาณ 1/3 เป็นอัลบูมิน และที่เหลือเป็น

โกลบูลิน 9 กรัม/ส่วสภาวะ 24 ชม. จะมีมีโครโปรตีน ประมาณ 70 มก., อัลบูมิน 16 มก., อิมมูโนโกลบูลิน 6 มก., มีโครโพลีแซคคาไรด์ 16 มก., โปรตีนที่เป็นสารหมู่เลือด 35 มก. นอกนั้นเป็นโปรตีนอื่นๆจำนวนน้อยๆ เช่นเอนไซม์และฮอร์โมน

ไต เป็นอวัยวะ ที่มีผลต่อระดับโปรตีนในพลาสมา โดยมีหลายปัจจัยมารวมด้วย เช่น แรงดันของกรองพลาสมา (Filtrate pressure), ขนาดของรูกรวยไต (pore size) และประจุบน GBM และมีการดูดกลับเกือบจะสมบูรณ์ที่ proximal tubule ขนาดของรูในการกรองที่กรวยไต มีประมาณ 55 Å และความดันในการกรองประมาณ 10 มม.ปรอท โปรตีนขนาด ovalbumin (m.w. 44000) ประมาณ 22% จะผ่านการกรองและ 3% ของโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับฮีโมโกลบิน (m.w 68000) และเพียง 0.004% ของอัลบูมินเท่านั้นที่ผ่านออกมา

เหตุผลที่อัลบูมินผ่านการกรองที่กรวยไตไม่ได้ มี 2 ประการคือ

1. อัลบูมินมีรูปร่างเป็น elongate ประมาณ 140 x 40 Å ดังนั้น เวลาผ่านรูเล็กๆจึงยาก
2. บริเวณ GBM ที่ทำหน้าที่ในการกรอง จะมีหมู่ SO<sub>4</sub> ของ glycosaminoglycan ซึ่งเป็นประจุลบ ส่วนอัลบูมินซึ่งมี pI ประมาณ 5 และมีประจุสุทธิ -18 ที่ pH 7.4 ดังนั้นจึงต้านกับประจุของ GBM

ที่ proximal tubule เป็นบริเวณที่มีการรั่วออกมาของโปรตีนในพลาสมาที่ผ่านมาได้เพียงเล็กน้อย เซลล์ของท่อไต จะจับของเหลวเข้าไปและโปรตีนจะถูกย่อยโดย protease ในไลโซไซม์ กลายเป็นกรดอะมิโน ซึ่งกระบวนการนี้ 99% จะเกิดกับอัลบูมิน เป็นส่วนใหญ่อีกประมาณ 1 กรัม/วัน จากอัลบูมินที่ถูกสลายตัวทั้งหมด 14

กรัม/วัน ส่วน ของเหลวที่ถูกจับเข้าไปจะกลับออกสู่ท่อไต เนื่องจากการดูดกลับของน้ำในบริเวณนี้ประมาณ 50% ไม่ซ้ำ 99%

การเปลี่ยนแปลงของระดับอัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วยเบาหวาน

การกรองของอัลบูมินจะเพิ่มขึ้นในเบาหวานระยะแรก เนื่องมาจาก GBM ยอมให้อัลบูมินผ่านได้เพิ่มขึ้น และ GFR เพิ่มขึ้นจาก 125 ไปเป็น 150 มล./นาที

การที่ GBM ยอมให้สารผ่านได้มากขึ้น เป็นเพราะมีประจุลบลดลง เพราะว่า มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาโบลิซึมไปรบกวน ทำให้การเกิด glycosaminoglycan ได้น้อยลง ทำให้มีประจุลบลดลงด้วย และจะไปลดความสามารถในการเลือกคัดสรรโปรตีน หรืออัลบูมิน นอกจากนี้ ยังมีการบสลายของท่อไตเล็กน้อย พบว่ามีการขับเอนไซม์ N-acetyl-β-D-glucosaminidase ของท่อไตออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น แต่สารบ่งชี้ของการเกิดโรคที่ท่อไตอื่น ๆ เช่น B-macroglobulin และ lysozyme ยังไม่เพิ่มขึ้นในปัสสาวะ

การควบคุมระดับอัลบูมินในพลาสมาโดยไต

ในคนปกติประมาณ 1% ของอัลบูมิน จะจับกับกลูโคส แบบ covalent กับ lysine เป็นกลัยเคทอัลบูมิน (Glycated albumin, g-Alb) การจับกับกลูโคส จะทำให้ประจุสุทธิของอัลบูมิน เปลี่ยนจาก -18 ไปเป็น -19 ทำให้ผ่าน GBM ยากขึ้น รวมทั้งถูกจับโดยเซลล์ของ proximal tubule ได้ยากกว่าปกติ เพราะว่า ประมาณ 10% ของอัลบูมิน ที่พบในปัสสาวะปกติ จะเป็น g-Alb หรือเป็น 10 เท่าของอัตราส่วนที่พบในพลาสมา การที่เซลล์ของ proximal tubule มีความสามารถในการดูดกลับจำกัด และมีโปรตีนที่ผ่านมายังท่อไตเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคไต ทำให้การดูดกลับของอัลบูมินอิสระ (ungly-

cated) ลดลงด้วย เพราะฉะนั้นอัตราส่วนของ g-Alb ในปัสสาวะจะเท่ากับในพลาสมา

จากรายงานการประชุม International Symposium on "Preventing the Kidney disease of Diabetes Mellitus" ในปี ค.ศ. 1987 พบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ต้องการอินซูลิน (Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM, Type I) จะมี 30-40% ที่เกิดโรคไต ที่พบมากที่สุดคือประมาณ 15 ปีหลังเป็นเบาหวาน พบว่าอาการของโรคไต จะเกิดใน 80% ของผู้ป่วยเบาหวาน type I โดยพบว่า มีอัลบูมินขับออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้นเป็นเวลานาน ส่วนเบาหวานชนิดที่ไม่ต้องการอินซูลิน (Non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDM, Type II) พบเพียงประมาณ 25% แต่เนื่องจาก Type II มีมากกว่า Type I ประมาณ 10 เท่า เพราะฉะนั้นจึงมักจะมียาทางการแพทย์ศึกษา Type II เป็นส่วนใหญ่ เกณฑ์ในการรักษา

ใน DM ระยะแรก การรักษาจะพยายามทำให้สาเหตุที่จะไปรบกวนการทำงานของไต หายไป หรือยืดเวลาการเกิดโรคไต ในเบาหวาน type I ต้องมีการควบคุมน้ำตาล และความดันเลือด อย่างเคร่งครัด อาจต้องให้ยาลดความดันช่วย จากการศึกษาพบว่า แม้ผู้ป่วยเบาหวานจะมีความดันเลือดปกติ การทำให้อัลบูมินในปัสสาวะลดลงทำได้โดยยับยั้งการเปลี่ยน angiotensin I ไปเป็น angiotensin II โดยให้สารยับยั้งคือ enalapril Angiotensin II ซึ่งทำหน้าที่บีบ efferent arterioles ของโกลเมอรูลัส ถ้าขาดไป ก็จะทำให้ arteriole ขยายตัวทำให้ลด แรงดันเลือดขณะกรองผ่านกรวยไตลงได้ แต่ไม่ได้เปลี่ยนความสามารถในการเลือกคัดสารของกรวยไต

การควบคุมน้ำหนัก และจำกัดอาหารโปรตีน

ในผู้ป่วยเบาหวาน type II ระยะแรกๆ จากโปรตีน 70 กรัม/น้ำเป็น 42 กรัม/กิโลกรัม/วัน จะช่วยป้องกันการเกิดโรคไตระยะรุนแรง เนื่องจากจะทำให้ GFR กลับสู่สภาพปกติ คำจำกัดความ

ในปี ค.ศ. 1987 มีผู้ให้คำจำกัดความของการขับอัลบูมินทางปัสสาวะปกติ ว่าไม่เกิน 20 ไมโครกรัม/นาที หรือ 30 มก./วัน ถ้ามีการขับอัลบูมิน 20-200 ไมโครกรัม/นาที แสดงถึงมีการขับถ่ายเพิ่มขึ้นหรือเรียกว่า "Microalbuminuria" และถ้าเกิน 200 ไมโครกรัม/นาที จะเรียก Clinical proteinuria หรือ "macroproteinuria" การจะบอกว่ามีการขับอัลบูมิน เพิ่มขึ้นจะต้องตรวจปริมาณในปัสสาวะซ้ำอย่างน้อย 2-3 ครั้ง

การเรียกว่า Micro- หรือ Macroalbuminuria นั้นไม่เหมาะสม เพราะว่าจะไปสัมพันธ์กับขนาดของโปรตีน เช่น micro-macroglobulin สำหรับ IgG และตัวที่ใหญ่กว่า หรือ macroamylase จะหมายถึง amylase ที่เกาะอยู่กับโมเลกุลอื่น กลายเป็นสารเชิงซ้อนขนาดใหญ่ ดังนั้นอัลบูมินปกติ จะไม่มีขนาดแตกต่างกันไป เพราะฉะนั้นจึงไม่มีทั้ง micro หรือ macro- ทั้งในพลาสมาและปัสสาวะ

Proteinuria อาจเกิดขึ้นโดยมีอาการหรือไม่มีอาการ เช่น เกิดร่วมกับการมีอาการของโรคไต อาจจะเป็นร่วมหรือไม่ร่วมกับการมีเลือดออกในปัสสาวะ (hematuria) ถ้ามีเลือดออกร่วมด้วย แสดงว่าสาเหตุของการเกิดโรคไตจะเกี่ยวกับการทำงานของโกลเมอรูลัส

Intermittent proteinuria - มักจะเป็น benign โดยมีการรั่วของโปรตีนออกมาเป็นครั้งคราว บางทีเรียก benign transient proteinuria, functional proteinuria หรือ postu-



เกิดจากการมี ขนาดของรูพรุนใหญ่ขึ้น หรือมีจำนวนรูพรุนมากหรือประจุของ GBM เปลี่ยนไปก็ได้ สารเชิงซ้อนของปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน (Immune complex) สามารถเกาะที่ GBM ทำให้มีจำนวนรูเกิดมากขึ้น หรือเปลี่ยนจำนวนประจุโดยไปจับกับ proteoglycans ที่ไกลเมอรูลัส พบได้บ่อยใน nephritis ที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อ streptococci หรือ SLE และเกิดแอนติบอดีต่อต้านเอง (auto-antibody) ต่อ GBM ได้ เช่นใน Goodpasture's disease ในผู้ป่วยเบาหวานจะมี GBM หนาขึ้น และมีจำนวนประจุบวกลดลงทำให้ความสามารถในการเลือกคัดสารเปลี่ยนไป

Glomerular proteinuria อาจมีโปรตีนในปัสสาวะมากกว่าใน primary tubular proteinuria และจะมีโปรตีนขนาดค่อนข้างใหญ่ซึ่งจะไม่พบใน primary tubular proteinuria อาจแยกภาวะการมีโปรตีนออกมานั้นปัสสาวะได้เป็นแบบอ่อน (mild) หรือแบบที่เป็นรุนแรง (heavy, Nephrotic Syndrome) ซึ่งแบบที่เป็นรุนแรงจะมีโปรตีนในปัสสาวะเกินกว่า 3 กรัม/1.73 ลบ.ม./วัน หรือมากกว่า 50 มก./น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน และแสดงว่า มีการเปลี่ยนแปลงของความสามารถ ในการเลือกคัดสาร ของไกลเมอรูลัส และ Nephrotic syndrome จะมีโปรตีนรั่วออกทางปัสสาวะเป็นจำนวนมาก (massive proteinuria), มีอัลบูมินต่ำในเลือด (hypoalbuminemia), บวม (edema), ไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) และมีไขมันออกทางปัสสาวะ (lipiduria)

การดูดกลับของโปรตีนที่ท่อไตต้องอาศัยพลังงาน และเป็นกระบวนการที่ไม่มีการเลือกคัด (non-selective) หรือแย่งกับสารอื่น (competitive process) ถ้า proximal

tubule เสีย โปรตีนที่กรองผ่าน จะออกมาในปัสสาวะเพิ่มขึ้น primary tubular proteinuria เกิดจากการดูดกลับ ของโปรตีนขนาดเล็กๆ ได้ไม่หมด การตรวจสอบโปรตีนในปัสสาวะ จะเป็นการตรวจสอบระยะ เริ่มต้นของภาวะผิดปกติของไต (renal parenchymal disorders) และเป็นประโยชน์ในการรักษา

การเกิดภาวะโปรตีนรั่วทางปัสสาวะ เนื่องจากความผิดปกติของท่อไต (tubular proteinuria) อาจเกิดอย่างเดี่ยวหรือร่วมกับความผิดปกติของไกลเมอรูลัสก็ได้ โปรตีนที่พบเพิ่มขึ้นในปัสสาวะ เนื่องจากความผิดปกติของท่อไต รวมถึง  $\beta_2$  macroglobulin, retinobinding protein, lysozyme,  $\alpha_1$ -acid glycoprotein และฮิรโรฟิน และเอนไซม์หลายชนิด ถ้าเป็น tubular proteinuria อย่างเดี่ยวนั้นจะพบโปรตีนในปัสสาวะ ไม่เกิน 1 กรัมต่อวัน และมีอัลบูมินต่ำด้วย ส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีน ที่มีขนาดไม่เกิน 50000 Da มีโรคหลายชนิดที่ทำให้เกิด tubular proteinuria ได้ (ตาราง 1) และชนิดและปริมาณของโปรตีนจะมีต่างๆ กันระหว่าง glomerulus และ tubular proteinuria (ตาราง 2)

ค. Post-renal proteinuria เกิดได้จากการติดเชื้อ หรือมีการสลายตัว degenerative lesion ของ renal pelvis, ท่อน้ำปัสสาวะ, กระเพาะปัสสาวะ, ต่อมลูกหมาก, ท่อปัสสาวะ หรืออวัยวะเพศภายนอก ซึ่งสามารถทำการการแยกวิเคราะห์ได้โดยไม่มีปัญหา สาเหตุอื่นได้แก่ การมีเลือดออกและการติดเชื้อ ใน genitourinary tract เช่น cystitis

ในการตรวจวัดโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ควรทำการตรวจวัดปริมาณครีเอตินีนร่วมด้วย เพื่อเป็นตัวบอกถึงว่าการเก็บปัสสาวะได้

ตารางที่ 1 โรคต่างๆ ที่ทำให้เกิด tubular proteinuria

---

**Congenital anomalies**

Bartter's syndrome	Familial asymptomatic tubular proteinuria
Fanconi syndrome	Renal tubular acidosis
Occulocerebrorenal dystrophy	Renal cystic disorder
Renal dysplasia	

**Systemic disease**

Hereditary :	Cystinosis	Heritable fructose intolerance
	Galactosemia	Glycogen storage disease
	Oxalosis	Wilson's disease
Acquired :	Balkan nephropathy	Multiple myeloma
	Sarcoidosis	Systemic lupus erythematosus

**Acute renal disease**

Acute renal failure	Acute tubular necrosis
Renal infarction	Transplant rejection

**Infectious disease**

Pyelonephritis	
Viral- or bacterial-associated interstitial nephritis	

**Drugs and toxins**

Acute hypersensitivity interstitial nephritis (penicillin, cephalosporins, sulfonamides, phenytoin)	Aminoglycoside toxicity
Cd, Pb, As, Hg, ethylene glycol, CCl <sub>4</sub>	Analgesic nephropathy
	Cyclosporin toxicity
	Laxative abuse
	Vitamin D toxicity

**Miscellaneous**

Excercise	Hemolytic disorders
Hypercalcemia	Hyperparathyroidism
Hypokalemia	Interstitial nephritis
Idiopathic muscle trauma (myoglobin)	Nephrocalcinosis
Pancreatitis	Obstructive uropathy
Renal tuberculosis	Renal ischemia
	Vesicoureteral reflux

---

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณโปรตีนใน Glomerular และ Tubular proteinuria

Protein	Normal	Primarily Glomerular disease	Primarily Tubular disease
Plasma			
Albumin (g/L)	40	10-40	40
Low protein (mg/L)	4	1-4	4
Urine			
Total protein (g/24 hr.)	<0.15	>2.5	<2.5
Albumin (mg/24 hr.)	50	>500	<500
$\beta_2$ -macroglobulin (mg/24 hr)	0.150	0.150	20.0
Low-M <sub>r</sub> proteins (mg/24 hr.)	15	400	440
High-M <sub>r</sub> proteins (mg/24 hr.)	17	4400	400
Ratio low M <sub>r</sub> /High M <sub>r</sub>	0.86	0.17	1.48
Tubular reabsorption of filtered protein (%)	95	3	50

ครบ ค่าปกติของครีเอตินีนในปัสสาวะของผู้ชาย = 15-25 มก./ก.ก./วัน และ ผู้หญิง = 10-22 มก./ก.ก./วัน

Ginsberg และคณะ ได้รายงานการศึกษาในผู้ใหญ่ และ Houser ได้รายงานการศึกษาในเด็ก เกี่ยวกับการตรวจวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะที่แน่นอน โดยวิธีปัสสาวะที่เก็บโดยไม่กำหนดเวลา (untimed หรือ spot urine) พบว่ามีค่าอัตราส่วนของ protein/creatinine (UP/Cr) สัมพันธ์กับค่าโปรตีนทั้งหมด ที่ถูกขับออกมาทั้งหมดในคนปกติและผู้ป่วย โดย Houser พบค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) = 0.987 (โปรตีนที่ถูกขับออกมาทั้งหมด เป็น กรัม/ตร.ม./วัน =  $[(1.02 \times \text{UP/Cr}) - 0.12]$  หรือ

โปรตีนที่ถูกขับออกทั้งหมดเป็นกรัม/วัน = UP/Cr) การเก็บปัสสาวะโดยไม่ต้องกำหนดเวลานี้ มีข้อดีหลายประการ คือการเก็บทำได้ง่าย และมีความน่าเชื่อถือ (reliability) ดีเท่าๆ กับการวิธีปัสสาวะที่เก็บโดยกำหนดเวลา (timed urine) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก สาเหตุของการมีโปรตีนรั่วออกทางปัสสาวะ

ประมาณปี ค.ศ. 1979 ส่วนใหญ่การรายงานผล จะเป็นแค่การตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวม ต่อมา มีการตัดแปลงวิธีการต่างๆ จนถึงปัจจุบันสามารถบอกชนิดโปรตีนในปัสสาวะ ว่าเป็นโปรตีนที่เกิดจากความผิดปกติของโกลเมอรูลัส ท่อไต หรือทั้งสองสาเหตุ โดยโปรตีนที่เกิดจากความผิดปกติของโกลเมอรูลัสจะมีขนาดใหญ่มากว่า

กลไกของการเกิด คือ GBM เสียสภาพ โดยไม่สามารถแยกชนิดโปรตีนตามขนาด ประจุ หรือรูปร่างได้ สาเหตุสำคัญของ glomerular proteinuria คือเบาหวาน การมีโปรตีนออกมาทางปัสสาวะอย่างมาก (Heavy proteinuria) แสดงถึงการเป็นเบาหวานที่มีอาการของไตร่วมด้วย (Diabetic nephropathy) ผู้ป่วยเบาหวานประมาณ 10-30% จะโปรตีนออกทางปัสสาวะ เนื่องจากโครงสร้างของโกลเมอรูลัสมีบาดแผล และเสียความสามารถในการเลือกคัดสาร พบผู้ป่วยเบาหวานที่มีอาการทางไตร่วมด้วยได้บ่อยที่สุดในสหรัฐอเมริกา ที่เป็นโรคไตขั้นสุดท้ายของผู้ใหญ่ แม้ว่าอาจพบได้ค้นทุกอายุ แต่ส่วนใหญ่ การเป็นโรคไตระยะสุดท้าย จะเกิดในอายุ 45-65 ปี

การมีโปรตีนรั่วออกทางปัสสาวะ ในระยะแรกของเบาหวานที่มีอาการทางไตร่วมด้วย พบว่าเกิดจากความผิดปกติของโกลเมอรูลัส Viberti ศึกษาเมื่อปี ค.ศ. 1983 ถึงการขับอัลบูมินออกทางปัสสาวะ และ plasma clearance ของอัลบูมิน (Stoke radius 3.6 นาโนเมตร) และ IgG (5.0 นาโนเมตร) ใน IDDM ที่มีโปรตีนออกทางปัสสาวะระยะต่างๆ กัน เทียบกับคนปกติหรือผู้ป่วยที่ไม่มีอาการของไต พบว่าค่าเฉลี่ยของอัลบูมิน และ IgG clearance สูงขึ้นชัดเจน ( $p < 0.001$  และ  $p < 0.005$ ) อัตราการขับออกทางปัสสาวะจะเพิ่มขึ้นทั้งอัลบูมิน และ IgG ซึ่งมีประจุลบมากกว่าอัลบูมิน (pI ของ IgG = 6.4-7.2, อัลบูมิน = 4.7) แสดงถึงการมี hemodynamic factor นอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลง electrostatic negative barrier ของผนังหลอดเลือดฝอยของโกลเมอรูลัส ที่ทำให้ความสามารถในการเลือกคัดกรองสาร เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานที่มีโรคไตร่วมด้วย แต่กลไกยังไม่ชัดเจน และโดย

ทั่วไปจะยอมรับกันว่า การมีน้ำตาลสูงในเลือด เป็นปัจจัยสำคัญ ที่ทำให้เกิดโรคไตในผู้ป่วยเบาหวาน เพราะว่ากลไกที่สูงขึ้นจะรวมกับโปรตีนต่างๆ เช่น ฮีโมโกลบิน, คอลลาเจน โดยไม่เข้าเอนไซม์ และพบว่ากลไกสามารถเกาะกับโปรตีนของ GBM ทำให้เกิด reactive group ซึ่งจะไปรวมกับโปรตีนของซีรั่ม เช่น อัลบูมิน และ IgG เป็นสารประกอบเชิงซ้อน หรืออาจเป็นตัวทำให้เกิดการสลายตัวของผนังหลอดเลือดฝอยของโกลเมอรูลัส และสนับสนุนการเกิด mesangial matrix expansion

ผู้ป่วยเบาหวานที่พบโรคไตระยะแรกๆ การตรวจสอบสมรรถภาพการทำงานของไต จะพบว่าปกติ ยกเว้นมีอัตราการทำงานของไต (Glomerular Filtration Rate, GFR) เพิ่มขึ้น บางราย และอาการที่ยังไม่แสดงออก (sub-clinical state) อาจเกิดขึ้นในผู้ป่วยเบาหวานเป็นเวลานานหลายปี อาการแรกที่พบคือมีโปรตีนออกทางปัสสาวะเป็นจำนวนมากถึง 50-200 มก./24 ชั่วโมง และป่วนแปรได้มาก เมื่อเป็นโรคมากขึ้น ค่าก็จะคงที่ขึ้น GFR จะลดลง การขับอัลบูมินออกทางปัสสาวะจะมากกว่า 400 มก./24 ชั่วโมง และมีความดันโลหิตสูง เป็นลักษณะร่วม 3 ประการ (Triad) ของโรคไตที่เกิดในเบาหวาน ถ้าตรวจโดยตัดชิ้นเนื้อมาศึกษา (histology) ในระยะที่มีอาการแสดงของโรคหรือระยะที่โรคดำเนินความรุนแรงขึ้น จะพบ GBM มีการหนาตัวขึ้น, mesangial matrix มีปริมาณเพิ่มขึ้น และโกลเมอรูลัสเสียไปเป็นบางส่วน (Focal glomerulosclerosis)

เคยมีรายงานการพบ glomerular proteinuria ในผู้ป่วย pheochromocytoma, Charcot-Marie-tooth syndrome, renal cell cancer ร่วมกับ progressive immune complex glomerulonephritis,

nephropathy ร่วมกับ urinary diversion, giant lymph node hyperplasia, Hypertensive nephrosclerosis, IgA nephropathy, cirrhosis ที่มีโรคไตร่วมด้วย และ nonparasitic chyuria การมีโปรตีนออกทางปัสสาวะ เนื่องจากความผิดปกติของท่อไต (Tubular Proteinuria)

ในผู้ป่วยชนิดนี้ พบโปรตีนในปัสสาวะ ได้มากกว่า 50 ชนิด (ตาราง 3) แสดงโปรตีนที่สำคัญ,  $\beta_2$ -macroglobulin ซึ่งพบครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1964 และสามารถทำหัตวีรศาสตร์ได้โดย Berggard และ Bearn ในปี ค.ศ. 1968 พบครั้งแรกในปัสสาวะของผู้ป่วย Wilson's disease และภาวะพิษจากแคดเมียม เป็น globular protein มีกรดอะมิโน 100 ตัว เป็นส่วนหนึ่งของ mixed histocompati-

ble complex (MHC) antigen บนผิวเซลล์ ทัวบอยกเว้นเม็ดเลือดแดงและ trophoblast  $\beta_2$ -macroglobulin จะถูกขับออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยหลายโรคซึ่งมีท่อไตผิดปกติรวมทั้งผู้ป่วยไตวายชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง, การบ่งชี้ถึงการปลูกถ่ายไต, tubular interstitial disease, Balkan nephropathy, polycystic kidneys, pyelonephritis, chronic glomerulonephritis, เบาหวาน และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง เนื่องจาก  $\beta_2$ -macroglobulin จะสลายตัวอย่างรวดเร็วในปัสสาวะที่เป็นกรด เพราะฉะนั้นจึงจำข้เป็น ดัชนีบอกถึงภาวะความผิดปกติของท่อไตได้ไม่ดี นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงระดับปริมาณอินซูลินก็ขึ้นกับระดับการกรองของกรวยไต เพราะฉะนั้นจึงจำข้เป็นตัวบอกรการทำงานของไต

ตารางที่ 3 โปรตีนสำคัญที่พบใน tubular proteinuria

- 
- Enzymes : amylase, lysozyme, ribonuclease, N-acetyl-glucosaminidase, and alanine aminopeptidase
  - Polypeptide hormones : calcitonin, follitropin, lutropin, glycagon, somatotropin, insulin, parathyrin, and prolactin
  - Polyclonal immunoglobulin fragments : kappa and lambda light chains
  - Fibrin and split products of fibrin
  - Retinol binding protein,  $\alpha_2$ -microglobulin,  $\beta_2$ -microglobulin, and  $\alpha_1$ -microglobulin
- 

Retinol-binding protein (RBP) เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (21,000) อยู่ในพลาสมาโดยรวมกับทรานส์เรติน หรือ transthyretin มีหน้าที่ขนส่งวิตามินเอ ปกติในพลาสมามีปริมาณ 46 มก./ลิตร และในปัสสาวะ

มีประมาณ 100 นาโนกรัม/24 ชั่วโมง จะขับออกทางปัสสาวะเท่ากับ  $\beta_2$ -macroglobulin ข้อดีของ RBP คือคงตัวในปัสสาวะที่เป็นกรด Bernard ศึกษาในปี.ศ. 1982 ทั้ง  $\beta_2$ -microglobulin และ RBP ในผู้ป่วยโรค

ไต 68 รายที่มีความผิดปกติของโกลเมอรูลัส, ท่อไต และทั้งสองอย่างร่วมกัน พบว่าการขับ RBP ออกทางปัสสาวะสูงขึ้น 48 ราย แต่  $\beta_2$ -macroglobulin สูงขึ้น 42 ราย และได้สรุปว่าโปรตีนทั้ง 2 จะเพิ่มขึ้นในปัสสาวะของผู้ป่วยโรคไต และ RBP เป็นดัชนีที่ดีกว่าสำหรับบอกความผิดปกติในการทำงานของท่อไต เนื่องจากมีความคงตัวในสภาพเป็นกรด

Yu และคณะ ศึกษานปี ค.ศ. 1983 เสนอแนะว่า  $\alpha_1$ -microglobulin สามารถใช้เป็นดัชนีของความผิดปกติในการทำงานของท่อไตได้ รายงานอื่นๆ ได้แก่ การศึกษาเอนไซม์ N-acetyl-D-glucosaminidase และ amino aminopeptidase ซึ่ง คัดแปลงมาจากเซลล์ของท่อไต และถูกขับออกจากระหว่างที่มีการทำลายท่อไต

Scarpioni และคณะ ศึกษานปี ค.ศ. 1981 ถึงประโยชน์ของการตรวจวัดปริมาณ lysosome, RBP,  $\beta_2$ -macroglobulin และ อัลบูมินในปัสสาวะของผู้ป่วย multiple myeloma ที่มีและไม่มีโรคไตร่วมด้วย ผู้ป่วยที่พบ Bence-Jones protein ในปัสสาวะ และไม่มีพบความผิดปกติในการทำงานของไต จะพบโปรตีนที่มีขนาดเล็กๆ เท่ากับคนปกติ แต่ถ้ามี Bence-Jones protein ออกมาด้วย จะพบโปรตีนอื่น เพิ่มขึ้นชัดเจน และจะมากยิ่งขึ้นถ้ามีความผิดปกติในการทำงานของไต เขาได้สรุปว่า Bence-Jones protein อาจเป็นสาเหตุของการขับโปรตีนขนาดเล็กอื่นมากขึ้น และจะมากยิ่งขึ้นถ้าไตทำงานผิดปกติ การขับ  $\beta_2$ -macroglobulin จะมากขึ้นใน multiple myeloma ชนิดที่ขับโปรตีนชนิด lambda light chain แสดงว่าเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นที่ท่อไตสำหรับการดูดกลับโปรตีนทั้งสองชนิด

การติดเชื้อรุนแรง (Sepsis) เป็นสาเหตุ

สำคัญอีกอย่างหนึ่งของการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด การมี immune complex ไปเกาะที่เซลล์ของโกลเมอรูลัสหรือท่อไต อาจทำให้เกิดการทำลายบริเวณนั้นและยาปฏิชีวนะที่เป็นอันตรายต่อไต เช่น Aminoglycosides ก็อาจทำให้เกิดการทำลายท่อไตได้ Linton และคณะ ศึกษานปี ค.ศ. 1984 ในผู้ป่วยติดเชื้อรุนแรงที่มีและไม่มีไตวายพบว่าทั้งสองกลุ่มมีโปรตีนออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะมี  $\beta_2$ -macroglobulin แม้ว่าจะไม่ได้รับ aminoglycosides ในการรักษาภาวะติดเชื้อรุนแรงก็ตาม ดังนั้น เขาจึงสรุปว่าการมีโปรตีนรั่วออกมา ในปัสสาวะของผู้ป่วยติดเชื้อรุนแรง เกิดจากความผิดปกติของท่อไต และการมีโปรตีนออกมาทางปัสสาวะนี้ ไม่ได้ทำให้ความรุนแรงของไตวายชนิดเฉียบพลันเพิ่มขึ้น ซึ่ง Richmond และคณะ ได้ยืนยันข้อสรุปนี้ครั้งหนึ่งในปี ค.ศ. 1982

#### Mixed proteinuria

ยาทุกชนิด ทำให้เกิดการรั่วของโปรตีนออกทางปัสสาวะ ได้ เช่น

Antitransplantation drug, ยาละลายก้อนไพบรีน, d-penicillamine จะทำให้เกิด prerenal proteinuria

ยากดระบบภูมิคุ้มกัน, สาร lithogenic ทำให้เกิด post-renal proteinuria

Glomerular proteinuria เกิดได้จาก ก. ยาที่กระตุ้นการเกิดสารเชิงซ้อนอิมมูน เช่น trimethadione, ลิเทียม และ d-penicillamine

ข. ยาที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อ Non-denatured DNA เช่น hydralazine, griseoulvin,  $\alpha$ -methyl dopa

ค. ยาที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อ CBM ได้แก่ d-penicillamine

Tubular proteinuria เกิดจาก

- ก. ยาที่ทำให้เกิด anaphylaxis เช่น ปรตีนจากภายนอก, แอนติบอดี, ยาระงับปวด
- ข. ยาที่เป็นพิษโดยตรงต่อท่อไต เช่น aminoglycoside, cyclosporin
- ค. ยาที่ทำให้เกิด interstitial nephritis เช่น phenindione, phenacetin และ ยาปฏิชีวนะบางชนิด

พิษจากแคดเมียม (Cadmium) ทำให้มีโปรตีนออกทางปัสสาวะ โดยแคดเมียม จะสะสมใน renal cortex ทำให้เกิด glomerular หรือ tubular หรือ mixed proteinuria ได้มีรายงาน การพบโปรตีนในปัสสาวะแบบปกติในภาวะตะกั่วเป็นพิษ แสดงว่าการเป็นพิษต่อไตต่างจากแคดเมียม และสารปรอท และการมี nontubular proteinuria ในผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากตะกั่ว แสดงว่าน่าจะมีพิษจากสารอื่นเข้ามาร่วมด้วย

การมีการติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ แบบซ้ำซาก อาจทำให้เกิด chronic pyelonephritis และการทำลายไตได้ ยาปฏิชีวนะ เช่น cephalosporin และ aminoglycoside ที่ใช้รักษาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ อาจทำให้ไตเสียหายได้ Schena และคณะศึกษาในปี ค.ศ. 1981 พบ  $\beta_2$ -macroglobulin ในปัสสาวะเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับ aminoglycoside เพื่อรักษาการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะทุกรายและการเพิ่มจะคงระดับ อยู่ตลอดเวลาที่มีการทำงานของท่อไตผิดปกติ และ  $\beta_2$ -macroglobulin จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และตามด้วยเพิ่มการของครีเอตินีน แสดงถึงการทำงานของไตผิดปกติ

ผู้ป่วยที่มีอาการไข้ (Febrile) มักพบโปรตีนในปัสสาวะชนิดผสม อาจจะมีหรือไม่มีโรคไตเลย ก็ได้

หญิงมีครรภ์ มักพบโปรตีนออกทางปัสสาวะ

แบบชั่วคราวชั่วคราว และเป็นเนื่องจากไกลเมอรูลัส ซึ่งการพบโปรตีนขนาดเล็กๆ ออกมา มักพบภายหลังจากคลอด รายที่มี pre-eclampsia ในระยะ 3 เดือนสุดท้ายก่อนคลอด 47% จะมีโปรตีนออกทางปัสสาวะ เนื่องจากทั้งไกลเมอรูลัสและท่อไตทำงานผิดปกติ โดยไม่ขึ้นกับความดันโลหิต

การออกกำลังกาย ทำให้เกิดโปรตีนออกทางปัสสาวะทั้งสาเหตุจากไกลเมอรูลัส และท่อไต มีรายงานศึกษาอัลบูมิน และ  $\beta_2$ -macroglobulin ในผู้ป่วย 60 คน และเด็ก ก่อนและหลังการออกกำลังกาย พบว่าอัลบูมินเท่านั้นที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แสดงถึงการมี glomerular permeability เพิ่มขึ้น บางรายพบเป็นแบบ tubular หรือแบบผสม ในนักกีฬาฟุตบอล, บาสเกตบอล และแฮนด์บอล อีกรายหนึ่ง ทำการศึกษาในนักวิ่งระยะยาว พบทั้งแบบ glomerular และ tubular โดยพบว่ามีเอนไซม์ของท่อไตขับออกมาทางปัสสาวะเพิ่มขึ้นด้วย และถ้าเป็นเบาหวานชนิด IDDM ร่วมด้วย จะมีอัลบูมินสูงชันกว่าคนปกติ พบว่าการมีอัลบูมินออกในปัสสาวะเนื่องจากการออกกำลังกายใน IDDM จะกลับสู่ปกติใน 6-15 วัน หลังรักษาด้วยอินซูลิน แสดงว่าความผิดปกตินี้เกิดจากไกลเมอรูลัส ร่วมกับภาวะเมตาบอลิซึม และคิดว่า GBM อาจจะมี permeable เพิ่มขึ้นระหว่างการออกกำลังกาย รายงานอื่นๆ ก็สนับสนุนว่า ความสามารถในการเลือกคัดสารของ GBM อาจเปลี่ยนแปลงก่อนการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้าง เช่นการหนาตัวขึ้น พบว่าการขับโปรตีนออกจะสูงสุดประมาณ 20-30 นาที หลังจากหยุดการออกกำลังกาย และพบใน ช่วง 24 ชั่วโมง

ในผู้ป่วย Trauma non-burn ชนิดของโปรตีนขึ้นกับความรุนแรงของแผล ระยะแรกจะมีโปรตีนรวม, อัลบูมิน และ  $\gamma$ -glutamyl-

transferase ( $\gamma$ -GT) เพิ่มขึ้นทุกราย แสดงถึงมีทั้งความผิดปกติของไกลเมอรูลัส และท่อไต ความรุนแรงของอาการ จะสัมพันธ์กับระดับโปรตีนรวม และ อัลบูมิน แต่เพิ่มขึ้นกับ  $\gamma$ -GT ส่วน C-Reactive protein เป็น โปรตีนที่ท่อไต จะพบใน trauma ที่เป็นรุนแรง และพบสูงสุดในวันที่ 3 หลังเกิด trauma

ในปี ค.ศ. 1986 Bunghard และคณะ ศึกษาในเด็ก 41 คนหลังทำการผ่าตัดเปลี่ยนไต พบระดับโปรตีนรวมในปัสสาวะต่ำลง ในกลุ่มที่รับไตได้ และไม่พบความผิดปกติในระยะก่อนการปฏิเสธไต เมื่อเกิดการปฏิเสธไต จะมีโปรตีนรวมออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น ตามด้วยโปรตีนขนาดเล็กๆ ภายหลังจากนั้น 3-7 วัน และมีอัลบูมินในปัสสาวะลดลง

ผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง และไตอักเสบเรื้อรัง จะพบโปรตีนออกทางปัสสาวะจากสาเหตุความผิดปกติทั้งไกลเมอรูลัสและท่อไต ใน Uroepithelial bladder tumor grade III และ IV จะพบโปรตีนจากไกลเมอรูลัส ออกมาอย่างมากมากกว่าใน tumor grade I-II และพบโปรตีนจากท่อไต เฉพาะใน grade III-IV

การประเมินภาวะผู้ป่วยที่มีโปรตีนรั่วทางปัสสาวะ สิ่งสำคัญอันดับแรก ของการประเมินภาวะโปรตีนรั่วออกทางปัสสาวะ ในผู้ป่วยเด็กและผู้ใหญ่ มีดังนี้

1. การตรวจโปรตีนชนิดสำคัญ
2. การตรวจชนิดของโปรตีน
3. การตรวจแยกชนิดของสาเหตุ และการมีโปรตีนออกทางปัสสาวะโดยไม่มีอาการหรือร่วมกับอาการของโรคไตอื่น

ถ้าพบโปรตีนปริมาณน้อยๆ (น้อยกว่า 100 มก./ลิตร) ในปัสสาวะ โดยเฉพาะในปัสสาวะที่เข้มข้น โดยมีความหนาแน่นเกิน 1.015 มักจะแสดงถึงภาวะปกติ

การมีโปรตีน 1+ โดย albutix = 300 มก./ลิตร แสดงว่ามีโปรตีนออกมาในปัสสาวะผิดปกติควรศึกษาต่อไป

การมีโปรตีน 2+ มีความผิดปกติ ควรหาปริมาณจากปัสสาวะที่เกิดขึ้นในกำหนดเวลา, ร่วมกับอัตราส่วนของ โปรตีน/ครีอะตินีน ดูภาวะ nephrosis

ถ้าผู้ป่วยมีประวัติ หรืออาการแสดงที่ไม่ได้เป็นโรคไต ถ้าไม่มีเลือดออกร่วมด้วย แสดงถึงระยะปลอดภัย ควรตรวจทุก 1 หรือ 2 สัปดาห์ ต่อว่ามีโปรตีนยังขับออกนานหรือไม่ ถ้ามีภาวะโปรตีนออกทางปัสสาวะแบบชั่วคราว ควรทำซ้ำเพื่อความเป็น fixed หรือ orthostatic ซึ่งควรทำอย่างน้อย 3 ครั้ง เมื่อตื่นนอนตอนเช้า ใหม่ๆ ควรได้ trace หรือ negative และไต 1+ ในตอนบ่ายถึงเย็น แสดงว่าเป็น orthostatic ถ้าไม่มีเลือดออก หรือมีอาการของโรคไตอื่นร่วมด้วย ควรทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในปัสสาวะ และตรวจวัดระดับครีอะตินีนในซีรัมเทียบับครั้งแรก ถ้าได้ค่าอยู่ช่วงปกติ ให้ทำซ้ำอีกในระยะ 3-5 ปีต่อไป เพื่อติดตาม

ผู้ป่วยที่เป็น persistent fixed proteinuria ควรทำการตรวจปัสสาวะครบทุกการทดสอบ (complete urinalysis), การเพาะเลี้ยงเชื้อ และตรวจครีอะตินีนในซีรัม ถ้ามีโปรตีนออกทางปัสสาวะ ร่วมกับอาการแสดงอื่นของโรคไต หรือโรคของระบบอื่นๆ ที่ทำให้เกิดโรคไต หรือมีประวัติครอบครัวควรทำการตรวจโดยละเอียดเช่นทำ Renal Ultrasound หรือ IV pyelogram ร่วมกับตรวจหาระดับครีอะตินีน, อัลบูมิน, โคลเลสเตอรอลรวม ในซีรัม และทำการเพาะเชื้อในปัสสาวะ ถ้าพบ renal lesion ด้วยจะช่วยการประเมินโรคไตได้ชัดเจน

ผู้ป่วยที่มีโปรตีนออกทางปัสสาวะเป็นเวลานานโดยไม่มีอาการ ควรทำ complete

urinalysis รวมทั้งการตรวจปัสสาวะด้วย กล้องจุลทรรศน์, การเพาะเลี้ยงเชื้อ และตรวจ วัดปริมาณโปรตีน/ครีเอตินีน ในปัสสาวะที่เก็บ ช่วงใดช่วงหนึ่ง หรือ 24-ชั่วโมง ปริมาณครีเอตินีน, อัลบูมิน, โคลเลสเตอรอลรวม, คอมพลีเมนต์ C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> และถ้าทำได้ควรทำ anti-streptolysin O, anti-DNAse B, หรือ Streptozyne ด้วย

การถ่ายภาพไต ควรทำงานผู้ป่วยที่มีโปรตีนออกทางปัสสาวะเป็นเวลานานๆ การทำ voiding cystourethrogram ถ้าพบว่า มีอาการของทางเดินปัสสาวะส่วนล่าง หรือมีประวัติของ

การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะมาก่อน หรือเมื่อต้องทำการผ่าตัด ผู้ป่วยที่มีโปรตีนในปัสสาวะปกติหรือมีปานกลาง (ไม่ขึ้น orthostatic) ควรตรวจสอพบ 2 ปี

ผู้ป่วยที่มีโปรตีนในปัสสาวะมาก หรือมีเลือดออกร่วมด้วย หรือมีสารคอมพลีเมนต์ในเลือดต่ำเป็นเวลานานๆ สมรรถภาพการทำงานของไตลดลง หรือมีความดันโลหิตสูง อาจจะมีภาวะผิดปกติของโกลเมอรูลัสอย่างชัดเจน เช่น glomerulonephritis และอาจต้องทำการตัดชิ้นเนื้อไตมาทดสอบ ดูตาราง 4

ตารางที่ 4 การทดสอบต่างๆ ที่ใช้ตรวจวัดภาวะโปรตีนในปัสสาวะ

- 
- Urinalysis, urine culture
  - Urine protein quantification, untimed urine protein/creatinine
  - Urinary proteins while subject is supine and upright
  - Serum creatinine, albumin, cholesterol
  - Serum C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> complement studies
  - Streptococcal studies (antistreptolysin O, anti DNAse B or streptozyne) if indicated
  - Renal imaging studies (renal ultrasound or intravenous pyelogram)
  - Voiding cystourethrogram (if indicated)
  - Urinary Bence Jones protein
- 

วิธีการตรวจวิเคราะห์

โปรตีนในปัสสาวะ ปริมาณที่เกินกว่า 200 มก./ลิตร สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีการตกตะกอน (precipitation method) โดยการดัดสีโพซาลิซัลติก หรือ ไตรคลอโรอะซิติก หรือใช้วิธีการรวมตัวกับสี เช่น Bromphenol blue ที่ pH ของ ปัสสาวะ (Albustix, Ames) หรือ

Ames "Micro-Bumintest" ซึ่งมีความไวสูงกว่า วัดได้ตั้งแต่ 40-300 มก./ลิตร วิธีที่น่าเชื่อถือกว่า วัดได้ 5-30 มก./ลิตร (20 ไมโครกรัม/นาที) จะต้องใช้วิธีทางภูมิคุ้มกัน อาจใช้วิธี radioimmunoassay, latex fixation, Radioimmunodiffusion ปัจจุบันมีวิธี Nephelometric และ turbidime-

tric immuassay รวมทั้ง ELISA และมีการผลิตชุดน้ำยาสำเร็จรูปจำหน่ายมากมาย วิธี RIA จะวัดได้ประมาณ 1 มก./ลิตร หรือต่ำกว่า ส่วนวิธีอื่น ๆ จะวัดได้ในช่วง 1-10 มก./ลิตร

ความไว ของการทดสอบปรีตีนในปัสสาวะ สำหรับค่าผู้ป่วย เกิดความผิดปกติของไตหรือไม่ นั้นมีประมาณ 50-100% ส่วนความจำเพาะ มีประมาณ 94-100% ค่าการทำนายโรค (predictive value) ถ้าทดสอบที่โรงพยาบาล มีประมาณ 75% ซึ่งมีความแปรปรวนในแต่ละบุคคลประมาณ 40-50% การออกกำลังกาย ท่าทาง อัตราการไหลของปัสสาวะ ภาวะตั้งครบกี้ การติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ มีผลต่อการขับอัลบูมินออกทางปัสสาวะ การควบคุมปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ จะช่วยทำให้การตรวจวัดได้ผลถูกต้องดีขึ้น

ตัวอย่างตรวจที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการขับปัสสาวะช่วงเวลาใดก็ได้ (random urine) จะง่ายและสะดวก แต่จะมีความแปรปรวนมาก ๑. ค่าที่ไม่น่าเชื่อถือ การเก็บปัสสาวะ 24-ชั่วโมงจะดีกว่า และมีรายงานว่า การเก็บเป็นช่วงเวลาตลอดคืน (timed overnight collection) จะดีกว่า เพราะว่ามีปัญหาจากท่าทางและการทำงานระหว่างวัน การอัตราส่วนของอัลบูมิน/ครีเอตินีน (albumin/creatinine ratio) ในปัสสาวะครั้งแรกในตอนเช้า จะดีกว่าการทำปัสสาวะที่เก็บเวลาใดก็ได้ แม้ว่าจะให้ผลดีไม่เท่าการเก็บโดยกำหนดเวลา

อัลบูมินส่วนหนึ่ง จะหายไปโดยการดูดซับกับผิวของภาชนะหรือสายยาง ดังนั้นจึงควรพิจารณาด้วย โดยเฉพาะกรณีที่มีปริมาณต่ำ (< 5 ไมโครกรัม/มล.) เช่นปัสสาวะที่เจือจางแล้ว การดูดซับนี้ จะทำให้อัลบูมินหายไป ประมาณ 0.2 ไมโครกรัม/ตร.ซม ของพื้นที่ผิว อาจป้องกันโดยเติม Triton X-100 ปริมาณ 1 มล./

ลิตร การแช่แข็ง จะทำให้ค่าลดลง การเก็บที่ 4 °ซ ซึ่งจะเก็บได้หลายวันหรือถึงสัปดาห์โดยค่าไม่ลดลง

วิธีอ้างอิง และวิธีที่นิยมใช้สำหรับการตรวจวัดปริมาณโปรตีนรวม มีดังนี้

ก. การตรวจเชิงคุณภาพ - โดย dipstick ซึ่งใช้ buffered indicator ที่เปลี่ยนสี เมื่อมีโปรตีน เรียก protein error of indicators มักจะไวต่ออัลบูมิน และเหมาะสำหรับการตรวจกรอง เพื่อดูภาวะ glomerular proteinuria

ข. การตรวจเชิงปริมาณ - เนื่องจากโปรตีนในปัสสาวะมีน้อย และซับซ้อนเนื่องจากประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด รวมทั้งมีสารปรบกวนมากมาย และมีโปรตีนหลายชนิดที่เกิดขึ้นที่ไต สารปรบกวนในการตรวจโปรตีน ได้แก่ กลีโกลินทรีย์ต่างๆ, สารที่มีสี เช่น สารที่เกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบิน, สารที่เกิดจากเมตาบอลิซึมของไนโตรเจน, และโพสเฟปไทด์ ที่มาจากการสลายตัวของฮอร์โมนและเนื้อเยื่อ

วิธีที่นิยมเรียกว่า เป็นวิธีมาตรฐานยังไม่ดี เนื่องจากแต่ละวิธีมีผลที่ได้ไม่สอดคล้องกันอยู่ สาเหตุเพราะแต่ละวิธีจะตรวจวัดโปรตีนได้ไม่เหมือนกัน บางวิธีวัดโปรตีนที่มีขนาดเล็กๆ และโพสเฟปไทด์ด้วยนอกเหนือจากอัลบูมินหรือโกลบูลิน แต่บางวิธีอาจไม่วัดโปรตีนขนาดเล็ก และโกลบูลิน เป็นต้น วิธีการวัดโปรตีนในปัสสาวะ ขึ้นกับคุณสมบัติ

ของโปรตีนในสารละลาย จากการสำรวจของวิทยาลัยพยาธิแพทย์อเมริกัน เมื่อปี ค.ศ. 1985 พบว่าวิธีใช้ Benzethonium chloride และ การวัดความขุ่น เป็นวิธีที่หาโปรตีนรวมในปัสสาวะ มากที่สุดคือ 41% และ 31% ตามลำดับ ตามด้วยการใช้ Coomassie blue 26% และ Biuret เพียง 2% ซึ่งมีความไวแตกต่างกัน ตามตารางที่ 5

## ตารางที่ 5 วิธีการวัดโปรตีนรวมในปัสสาวะ

Method	Analytical sensitivity (mg/L)	Linearity (mg/L)
Sulfosalicylic acid	10-25	0-3000
Trichloroacetic acid	20	0-2400
Coomassie brilliant blue	5	5-1500
Ponceau S	20	100-1600
Gel-filtration/biuret	5-17	0-5000
Folin-Lowry	10	10-700
Benzethonium chloride	10	0-1600

หลักการของวิธีที่ข้างต้นทั่วไป จะเป็นการวัดความขุ่น (turbidimetry), การรวมตัวกับสี (dye binding) วิธีการวัดความขุ่น จะใช้กรดไตรคลอโรอะซิติก หรือซัลโฟซาลิซิลิก ทำให้เกิดตะกอนละเอียดแขวนลอย แล้ววัดความขุ่นที่เกิดขึ้น ซึ่งจะแปรตามคุณสมบัติของกรดที่จับกับตะกอน ชนิดของโปรตีน ความเข้มข้นของกรด ออณหภูมิ ความเร็วของการเติมกรด และระยะเวลาหลังจากเติมกรด นอกจากนั้นยาบางชนิดอาจตกตะกอนร่วมด้วย และโปรตีนขนาดเล็กอาจไม่ตกตะกอนด้วย กรดไตรคลอโรอะซิติก จะมีความไวน้อยกว่ากรดซัลโฟซาลิซิลิก เนื่องจากทำให้เกิดความขุ่นเพียงประมาณครึ่งเดียว อัลบูมินจะเกิดความขุ่นกับกรดซัลโฟซาลิซิลิก มากกว่าแกมมา-โกลบูลิน ที่อุณหภูมิเท่ากัน กรดซัลโฟซาลิซิลิกจะตกตะกอนน้ำเหลืองปัสสาวะด้วยวิธีการใช้กรดไตรคลอโรอะซิติก จะเกิดปฏิกิริยากับอัลบูมินและโกลบูลินได้เท่าๆ กัน เมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 20-25 °C แต่ถ้าอุณหภูมิเพิ่ม อัลบูมิน

จะเกิดตะกอนมากกว่า

Benzethonium chloride ทำให้เกิดตะกอน ในสารละลายต่าง โดยโปรตีนจะเกิดปฏิกิริยากับ quaternary  $\text{NH}_4^+$  salt ของ Benzethonium chloride เกิดความขุ่นที่คงตัวและไม่ขึ้นกับอุณหภูมิ เหมือนกรดซัลโฟซาลิซิลิก หรือไตรคลอโรอะซิติก ถ้าทำด้วยวิธีธรรมดา จะวัดได้ภายใน 40-60 นาที ถ้าใช้เครื่องอัตโนมัติ เช่น Dupont ACA จะทำได้ภายใน 8 นาที Benzethonium chloride เกิดความขุ่นกับอัลบูมินได้มากกว่าโกลบูลินต่อกรัมเล็กน้อย ซึ่งความไวต่ออัลบูมินและโกลบูลิน จะขึ้นกับปริมาณโปรตีนรวม ถ้ามีปริมาณเพิ่มมากอาจจะทำให้ตะกอนที่เกิดขึ้นไม่กระจายตัว วิธีแก้ไข คือต้องเจือจางปัสสาวะก่อน ถ้าพบว่าตะกอนโปรตีนมีการจับตัวเป็นก้อน

วิธีการรวมตัวกับสี โดยทั่วไป อาศัยการเปลี่ยนแปลงช่วงคลื่นแสง เมื่อสี (ที่เกินพอ) รวมตัวกับโปรตีน คือทำให้สีเปลี่ยน เริ่มมีการใช้

Coomassie blue G 250 Brilliant ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1976 ทำได้ไว ราคาถูก ทำให้ช่วงคลื่นการดูดกลืนแสงเปลี่ยนจาก 465 ไปเป็น 595 นาโนเมตร เกิดการรวมตัวสมบูรณ์ที่ 2 นาที และคงตัว Coomassie Brilliant Blue ทำให้เกิดสีต่อกรัมกับอัลบูมิน ได้มากกว่าโกลบูลิน โดยทั่วไป ตัวฟอก (detergent) จะทำให้สีที่เกิดลดลง เช่น Sodium dodecyl sulfate จะลดสีที่เกิดจาก Coomassie Brilliant blue กับอัลบูมินได้มากกว่าโกลบูลิน และโปรตีนขนาดเล็กอื่นๆ สารกันเสียได้แก่ salicylate และ thymol อาจรบกวนปฏิกิริยา แต่บางรายงานไม่พบการรบกวน toluamide และยูเรีย รบกวนโดยทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าที่ควรจะเป็น เมื่อมีความเข้มข้น 2-4 กรัมต่อลิตร และ 90-180 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 1973 มีการดัดแปลงหาโปรตีนในปัสสาวะและน้ำไขสันหลัง โดยใช้การตกตะกอนร่วมของโปรตีน กับ Ponceau S และกรดไตรคลอโรอะซิติก เมื่อละลายตะกอนในต่างเจือจางแล้วสามารถวัดสีที่เกิดได้ Ponceau S จะมีความไวต่ออัลบูมินและโกลบูลินเท่าๆ กัน เป็นวิธีที่ซับซ้อนน้อยกว่าเล็กน้อย มีความเที่ยงดี และมีโอกาสผิดพลาดเนื่องจากความลำเอียง (bias) น้อย สามารถใช้ซีรัมรวม (pooled serum) จากคนหรือสัตว์พวกใด กระบือเป็นสารมาตรฐานได้ ข้อเสียคือใช้เวลานาน ทำให้ไม่สามารถทำโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ และอาจได้ค่าต่ำเนื่องจากการสูญเสียตะกอนไประหว่างการเทส่วนที่สออก หรือได้ค่าสูง เพราะว่ามีตะกอนจากสารอื่นที่เข้ารีปรีตินกับสี เช่นจาก aminoglycoside โดยเฉพาะ gentamicin

ปฏิกิริยา Biuret ใช้ปฏิกิริยาระหว่าง Cupric ion ในสารละลายต่างกับ peptide bond ในโปรตีน เป็นวิธีที่มีความไวต่ำกว่าวิธีที่

กล่าวข้างต้น อาจต้องทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นก่อนการทำ เช่น โดยการตกตะกอนกับกรดไตรคลอโรอะซิติก หรือ ethanolic HCl-phosphotungstic acid ขึ้นเอาตะกอนมาละลายและทำปฏิกิริยากับ biuret มีการรบกวนได้จากเมตาโบไลต์ของสี เช่น  $NH_4^+$ , บิลิรูบิน เป็นต้น

วิธีของ Folin-Lowry มีความไวมากกว่าวิธี Biuret ประมาณ 100 เท่า เป็นวิธีที่ไม่จำเพาะ และมีสารรบกวนมาก ซึ่งควรกำจัดออกก่อนทำได้แก่ กรดยูริค,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ , EDTA, Tris, Thiol reagent, คาร์โบไฮเดรต และอื่นๆ น้ำยา Folin ประกอบด้วยกรดพอสฟอรัสสะตึก และ พอสฟอไรต์บดิก ในสารละลายต่างของเกลือทองแดง จะทำปฏิกิริยากับพันธะเปปไทด์ ของไทโรซีน และ ทริปโตเฟน เกิดสีน้ำเงินวัดได้ที่ 650 นาโนเมตร สามารถวัดได้ค่าถึง 5-10 ภา.ต่อลิตร แต่การปรับมาตรฐานยุ่งยากต้องอาศัยสารที่มันหมู่ของไทโรซีน และทริปโตเฟนอยู่ด้วย

วิธีอ้างอิง ที่ยอมรับสำหรับการวัดปริมาณโปรตีนรวม ได้แก่วิธี Biuret เพราะว่ามีผลต่อหน้าหมักของเปปไทด์ ของโปรตีนแต่ละตัวจะคงที่ วิธีที่ปรับปรุงโดย Doetsch และ Gadsden จะมีความจำเพาะต่อเปปไทด์ และมีความไวใกล้เคียงกับวิธีของ Folin โดยได้มีการกำจัดสารรบกวนออก โดยการกรองผ่านเจลก่อน แล้วมีการกรองผ่านเจลครั้งที่สอง ด้วย base-treated column เพื่อกำจัดทองแดงที่รวมกับคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$  Copper) ซึ่งไม่รวมกับ อัลบูมิน วัดทองแดงที่เกาะกับเปปไทด์โดยการวัดสีที่ 440 นาโนเมตร โดยมีสารทำให้เกิดสี คือ sodium diethyldithiocarbamate เพราะฉะนั้น สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนจะไม่รบกวน ยกเว้นจะไปเกาะกับโปรตีน และ

chelate กับ ทองแดง สารทึบแสงรังสี เช่น meglumine diatrizoate ก็รับกานปฏิกิริยาได้ วิธีนี้มีความไวสูง สามารถวัดได้ต่ำถึง 10 มก. ต่อลิตร และได้รับเลือก ให้เป็นวิธีอ้างอิง สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ โดยสมาคมเคมีคลินิกของสหรัฐอเมริกา แม้ว่าวิธีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่จะใช้เป็นวิธี ปริมาณมาตรฐาน และวิธีอ้างอิง เท่านั้น

วิธีการแยกสาเหตุของการมีโปรตีนรั่วทางปัสสาวะจากโรคเมอรัลส์และท่อไต

สาเหตุของการมีโปรตีนรั่วออกทางปัสสาวะเนื่องจากโรคเมอรัลส์และท่อไต อาจแยกได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีนที่ทำให้เข้มข้นแล้วบนเจล agarose หรือเซลลูโลสอะซีเตท Bence Jones protein ก็หาได้โดยวิธีนี้ แล้วนำไปแยก Lambda และ Kappa chain โดย immunoelectrophoresis

วิธีการแยกที่พัฒนาให้ดีขึ้นทำโดยวิธี Sodium dodesyl sulfate/Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ SDS โดยมีความร้อนจะเกิดประจุลบ ซึ่งจะเคลื่อนตัวใน PAGE (100 กรัมต่อลิตร) ตามขนาดของโมเลกุล โปรตีนขนาด  $17 \times 10^3$  และ  $70 \times 10^3$  da จะตรวจพบได้ง่ายที่สุด เป็นการบอกสาเหตุว่าเกิดจากโรคเมอรัลส์หรือท่อไต

วิธี "Iso-Dalt" เป็น 2-dimensional gel electrophoresis เพื่อหาชนิดของโปรตีน ในการทำขั้นแรกโดย isoelectric focusing โดยมียูเรียอยู่ด้วย จะแยกโปรตีนตาม pI จากนั้นใช้ SDS/AAGE จะแยกตามจำนวนประจุ และขนาด ทำให้ได้ส่วนต่างๆ มากมาย ใช้จำแนกชนิดของโปรตีน ที่เกิดจากโรคเมอรัลส์หรือท่อไต หรืออาจดูโปรตีนที่เป็นตัวบ่งบอกภาวะโรค เช่น อิน มะเร็งต่อมลูกหมาก และ ข้ออักเสบ

เสปรัมมาตอยด์

วิธี High performance, ion-exchange chromatography เป็นวิธี ที่มีความน่าเชื่อถือในการหาปริมาณโปรตีน ใช้หลักของ anion-exchange chromatography แยกโปรตีนตาม isoelectric strength และ pH เก็บแต่ละส่วน มาจำแนกชนิด โดย SDS/PAGE, radial immunodiffusion, Electroimmunoassay หรือ nephelometry วิธีการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินน้อยๆ ในปัสสาวะ

1. วิธีการวัดความขุ่น (Turbidimetric method)<sup>(3)</sup> เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย มีหลักการคือ ใช้แอนติบอดีต่ออัลบูมินของคนที่เตรียมจากสัตว์ทดลองพวกหมู มาทำปฏิกิริยากับอัลบูมินในปัสสาวะ วัดความขุ่นที่เกิดขึ้นที่ 340 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน ที่เตรียมจากการเจือจาง ซีรัมคน สามารถวัดได้ในช่วง 0-180 มก.ต่อลิตร

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ urine blank มักจะมีค่าสูงมากที่ความยาวคลื่นแสงนั้น ดังนั้น จึงใช้วิธีเปลี่ยนความยาวคลื่นแสงทำซ้ำจาก 340 ไปเป็น 450 นาโนเมตร ซึ่งแม้ว่าจะไม่ใช้ความยาวคลื่นที่สารมีการดูดกลืนแสงสูงสุด แต่ก็ทำให้สามารถวัดปริมาณความขุ่นที่เกิดขึ้นได้

ก่อนจะทำการตรวจวัด แนะนำให้ปั่นปัสสาวะ 10 นาที ที่ 1000 g แล้วตรวจด้วย Albustix เพื่อประมาณค่า และเจือจางให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 180 มก.ต่อลิตรก่อน

ความเที่ยงของวิธี เมื่อทำไปหรือมา กัน มีค่าเท่ากับ 1.78 - 8.68% และเมื่อทำต่างวันกัน มีค่า 2.89-12.96% ค่าอัลบูมินต่ำๆ จะทำให้ค่าความไม่เที่ยงมีช่วงกว้างขึ้น

2. การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกัน (Immunoassay)<sup>(4)</sup> สามารถวัดได้ตั้งแต่ 0.75

ถึง 90 มก.ต่อลิตร มีหลักการทำแบบเดียวกับวิธีการวัดความขุ่น แต่วัดด้วยเครื่อง nephelometer ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ค่าความเที่ยงเมื่อทำไปพร้อมกัน เท่ากับ 1.30-1.83% และเมื่อทำต่างวันกัน เท่ากับ 2.07-4.12%

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ตรวจวัดได้โดยวิธีนี้กับวิธี Radial immunodiffusion และ Radioimmunoassay เท่ากับ 0.995 และ 0.991 ตามลำดับ

ค่าปกติของอัลบูมินในปัสสาวะ เท่ากับ 2.82 มก.ต่อ 12 ชั่วโมงเมื่อเก็บช่วงกลางคืน ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเก็บตอนกลางวัน (3.47 มก.ต่อ 12 ชั่วโมง) เล็กน้อย ค่ารวมของอัลบูมินตลอด 24 ชั่วโมง เท่ากับ 6.60 มก. ค่าอ้างอิง เท่ากับ 2.60-16.60 มก.ต่อ 24 ชั่วโมง

การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ อาจใช้ค่าอัตราส่วนของอัลบูมิน/ครีอะตินีน ซึ่งเท่ากับ 0.45 มก./มิลลิกรัม สำหรับช่วงกลางคืน และ 0.53 มก./มิลลิกรัม สำหรับช่วงกลางวัน ซึ่งอาจจะช่วยช่วยในการแปลผล กรณีที่เก็บปัสสาวะเวลาใดก็ได้ ไม่จำเป็นต้องครบ 24 ชั่วโมง หรือใช้ช่วยตรวจสอบว่า การเก็บปัสสาวะทำได้ครบเวลาหรือไม่

มีข้อสังเกตว่า ผู้ป่วยเบาหวาน ที่มีการขับอัลบูมินออกทางปัสสาวะ ในระดับปกติ ขณะพักอยู่เฉยๆ แต่หลังจากมีการออกกำลังกายแล้วจะมีการขับออกมากขึ้น และแนะนำว่า การตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะ ภายหลังจากออกกำลังกายจะเป็นดัชนีที่ไวกว่า ในการบอกภาวะโรคไต และเนื่องจาก การออกกำลังกาย มีผลต่อการขับอัลบูมินดังกล่าว จึงสมควรจะหลีกเลี่ยงการเก็บปัสสาวะในช่วง 12 ชั่วโมงตอนกลางคืน ซึ่งเป็นขณะพักของผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีหรือในการตรวจประจำวันทั่วไป

3. วิธี Radioimmunoassay (RIA)<sup>(5)</sup> ใช้ปัสสาวะที่เจือจางแล้ว ทำปฏิกิริยากับอัลบูมินที่ติดฉลากด้วย <sup>125</sup>I และ rabbit antiserum monospecific ต่ออัลบูมินของคนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วย double antibody technic วิธีนี้ มีความไววัดได้ถึง 16 นาโนกรัมของอัลบูมิน

4. Latex agglutination test<sup>(6)</sup> เนื่องจากการทำ Radioimmunoassay มีความปรวนแปรจนแต่ละวัน และอาจต้องทำซ้ำๆ กัน วิธีการวัดความขุ่น และการใช้เทคนิค ELISA ไม่เหมาะสำหรับการทำที่ข้างเตียงผู้ป่วย หรือในคลินิกแพทย์ จึงมีการดัดแปลงวิธี agglutination ให้ทำได้รวดเร็ว และสามารถทำได้ทั้งข้างเตียงผู้ป่วยโดยไม่มี prozone effect ใช้เวลาในการทำการประมาณ 1 นาที มีความไวเพียงพอ และใช้ค่า 40 มก./ลิตร เป็นค่า cut-off

หลักการ : ใช้ polystyrene latex เคลือบด้วยอัลบูมินของคน เติมลงในส่วนละลาย antihuman IgG ซึ่งได้อ่อนกับตัวอย่างส่งตรวจมาแล้วถ้าเกิดการจับกลุ่ม แสดงว่าอัลบูมินในสารละลายมีน้อยเกินไปที่จะจับกับแอนติบอดี แต่ถ้าไม่มีการจับกลุ่ม แสดงว่ามีอัลบูมินมากจนตัวอย่างที่ไปรวมกับแอนติบอดีได้หมด

การแปลผล :

การจับกลุ่มทั้งหมด และไม่แตกตัว (+++) จะเทียบได้กับอัลบูมินปริมาณไม่เกิน 25 มก./ลิตร การจับกลุ่มบางส่วน ไม่สมบูรณ์ (++) จะเทียบได้กับอัลบูมิน ปริมาณไม่เกิน 30-35 มก./ลิตร

ไม่จับกลุ่มเลย (---) จะเทียบได้กับอัลบูมินปริมาณไม่เกิน 40-500 มก./ลิตร

วิธีนี้มีความจำเพาะดีมาก เมื่อใช้ตัวอย่างที่มีค่าอัลบูมินต่ำกว่า 40 มก./ลิตร มาทำ จะ

พบว่ามีค่าถูกต้อง 99.6% ไม่จำเป็นต้องเจือจางปัสสาวะก่อน เนื่องจากได้ตัดปัญหาเรื่อง prozone effect ด้วยการทำแบบ indirect agglutination และไม่จำเป็นต้องทำซ้ำเหมือนวิธี RIA

ระดับอัลบูมินในปัสสาวะตั้งแต่ 50 มก./24 ชั่วโมงขึ้นไป ถือว่ามีความสำคัญทางคลินิกในการบอกภาวะโรคไตของผู้ป่วยเบาหวาน แต่การทราบระดับที่ต่ำกว่า (Subclinical level) อาจจะช่วยลดการเกิดโรคไตได้ ดังนั้น การตรวจอัลบูมินปัสสาวะบ่อยๆ จึงมีประโยชน์ในการตรวจผู้ป่วยเบาหวานที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตได้

#### เอกสารอ้างอิง

1. Waller KV, Ward KM, Mahan JD and Wismatt DK. Current concept in proteinuria. Clin Chem 1989; 35: 755-765.
2. Theodore P, Jr. Albumin in urine. CCN 1990; 16: 10-12.
3. Harmoinen A, Vuorinen P and Jokela H. Turbidimetric measurement of microalbuminuria. Clin Chim Acta 1987; 166: 85-89.
4. Harmoinen A, Ala-Houhala A and Vuorinen P. Rapid and sensitive

immunoassay for albumin determination in urine. Clin Chim Acta 1985; 149: 267-274.

5. Woo J, Floyd M, Cannon DC and Kahan B. Radioimmunoassay for urinary albumin. Clin Chem 1978; 24: 1464-1467.
6. Paoli C, Bardelli F, Tarii P, Gragnoli G, Tanganelli I and Signorini AM. A simple latex agglutination test for urinary albumin screening. Clin Chim Acta 1987; 166: 67-71.

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

นิพนธ์ต้นฉบับ

## ความหนาแน่นและการเกาะกลุ่มของ เกร็ดเลือด จากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ประสิทธิ์ ชะรัตนะ ศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์ สุชาติ ไชยศักดิ์ระ\* สมอง ไชยวรัณณะ\*  
และ ดำรงค์ พิทยานนท์\*

**บทคัดย่อ** ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย มักจะพบ ความผิดปกติของการทำหน้าที่ของเกร็ดเลือด รายงานนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับความหนาแน่นของเกร็ดเลือด โดย Ficoll-Hypaque density gradients (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Collier), Circulating platelet aggregates : CPA (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Velaskar และ Chitre) และ ADP-induced platelet aggregation (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Born) โดยศึกษาผู้ป่วยธาลัสซีเมีย 38 ราย เป็นผู้ที่ตัดม้าม 21 ราย ไม่ตัดม้าม 17 ราย เปรียบเทียบกับคนปกติ 31 ราย พบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีความหนาแน่นของเกร็ดเลือดต่ำกว่าคนปกติ และมี %CPA สูงกว่าคนปกติ และผู้ที่ตัดม้ามแล้วจะมี %CPA สูงกว่าผู้ที่ไม่ตัดม้าม นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม จะมี %platelet aggregation (ใช้ ADP 5.0  $\mu$ M เป็น สารกระตุ้น) สูงกว่าผู้ที่ไม่ตัดม้าม และคนปกติ และรูปแบบ (pattern) ของการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ยังต่างจากของคนปกติอีกด้วย (คำรหัส : เกร็ดเลือด, ความหนาแน่น, การจับกลุ่ม, ธาลัสซีเมีย) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2534 หน้า 29-36

ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) ของนางสาวศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์ ปีการศึกษา 2532  
\*อาจารย์ \*\*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ และ \*\*\*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**Abstract Platelet Density and Aggregation in Thalassemia.**

Chanarat P, Wangpitakwong S. Chaisawadi S, Chaiyarasamee S and Pintanond D.

Thalassemic patients had commonly observed are abnormal of platelet function. This report is to study about platelet density by Ficoll-Hypaque density gradients (modified from Collier), Circulating platelet aggregates :CPA (modified from Velaskar and Chitre), and ADP - induced platelet aggregation (modified from Born). Thirty eight of thalassemic patients, 21 splenectomized and 17 non-splenectomized, were determined and compared with 31 normal subjects. It was found that the platelet density in thalassemic patients was lower than in normal and the percentage of CPA in splenectomized thalassemic patients is higher than in non-splenectomized and normal subjects. In addition, the percentage of platelet aggregation (using ADP 5.0  $\mu$ l as inducer) in splenectomized thalassemic patients is higher than in non-splenectomized patients and normal subjects, and pattern of platelet aggregation in thalassemia patients is different from normal. (Keyword : Platelet, density, aggregate, thalassemia) Bull Chiang Mai AMS 1991; 24: 29-36

Platelet function ในผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia major ได้มีผู้รายงานความผิดปกติของ platelet aggregate เมื่อกระตุ้นด้วย ADP, collagen, ristocetin และ epinephrine (Eldor et al, 1978) (1) ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 Hussian และคณะ (2) พบว่า 8 รายใน 18 รายของผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia major จะมีความผิดปกติของการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดเช่นกัน งานการศึกษาของ

Eldor และ Hussian นี้เป็นการศึกษาภายนอก ร่างกาย ซึ่งพบว่า hyperfunction ของเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งตรงกันข้ามกับที่ ปราณี วันจุล และคณะ (3) ได้ศึกษาไว้เมื่อปี ค.ศ. 1981 เกี่ยวกับการทำงานของเกร็ดเลือดภายในร่างกายของผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia/Hb E disease ที่ตัดม้าม 17 ราย และไม่ตัดม้าม 17 ราย พบว่า 35% ของผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามจะมีปริมาณ circulating plate-

let aggregation (CPA) สูงกว่าคนปกติ ส่วนผู้ที่ติดม้าม 75% จะมีปริมาณ CPA สูงกว่าคนปกติ ซึ่งพบว่าเกร็ดเลือดมี hyperfunction จนธาตุซีซีเมีย และจากการศึกษา CPA นี้จะพบว่า เกร็ดเลือดมีมากกว่าหนึ่งกลุ่ม คือมีพวกที่มีฤทธิ์มาก คือทำให้เกิด hyperaggregate และพวกที่ออกฤทธิ์น้อย คือเกิดการ aggregate ได้น้อย เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นให้เกร็ดเลือดมีการเกาะกลุ่ม ก็ตาม เกร็ดเลือดที่เกาะกลุ่มได้น้อยนี้อาจจะมีคุณสมบัติปกติ ในการศึกษาของ Eldor และ Hussian ซึ่งเกร็ดเลือดพวกนี้จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเกาะกลุ่มขึ้นตั้งแต่อำนาจร่างกายแล้ว

รายงานนี้เพื่อศึกษา ความหนาแน่น, การเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด และ CPA ในผู้ป่วยเด็กธาตุซีซีเมีย

วัสดุและวิธีการ

ก. กลุ่มตัวอย่าง

1. ผู้ป่วยธาตุซีซีเมีย ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยได้รับการวินิจฉัย และแยกประเภทแน่นอนแล้ว จำนวน 38 ราย เป็นหญิง 14 ราย ชาย 24 ราย อายุ 3-16 ปี (เฉลี่ย 7 ปี) เป็นผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia major 37 ราย และ  $\beta$ -thalassemia/Hb E disease 1 ราย ผู้ป่วย  $\beta$ -thalassemia major นั้น ได้รับการตัดม้ามแล้ว 21 ราย

2. คนปกติ จำนวน 31 คน เป็นหญิง 8 คน ชาย 23 คน อายุ 18-25 ปี (เฉลี่ย 22 ปี)

ข. การศึกษาความหนาแน่นของเกร็ดเลือด

ศึกษาโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Collier และคณะ (\*) โดยมีหลักการดังนี้ คือ เมื่อนำ platelet riched plasma (PRP) ที่ 2,000 รอบต่อนาที นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ Ficoll-Hypaque (F-H) density

gradients ต่างๆ เกร็ดเลือดจะแยกชั้นตาม gradients ของ F-H จากนั้น นำเกร็ดเลือดจำนวนแต่ละความกว้างจำเพาะมานับจำนวน นำค่าที่ได้มาคิดเป็นค่า relative platelet count สำหรับแต่ละราย

ทำการศึกษานคนปกติ	10 ราย
ผู้ป่วยธาตุซีซีเมีย	12 ราย
ติดม้าม	6 ราย
ไม่ติดม้าม	6 ราย

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. เครื่องปั่น Kokusan Model H-103 KS
  2. หลอดพลาสติก ขนาด 12x75 มม.
  3. ไปเปิดอัตโนมัติ ขนาด 500 ไมโครลิตร
- น้ำยาที่ใช้ Ficoll-Hypaque ความกว้างจำเพาะต่างๆ คือ 1.055, 1.060, 1.065, 1.070, 1.080, 1.090

วิธีการ

1. เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำจำนวน 5 มล. ใส่ในหลอดปั่นพลาสติก โดยมี 3.8% sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็ง (อัตราส่วนเลือด : citrate = 9:1)
2. ดูดเลือด 20 ไมโครลิตร มานับจำนวนเกร็ดเลือด โดยใช้ น้ำยา 1% ammonium oxalate
3. นำเลือดที่เหลือนำมาปั่นแยก PRP ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดพลาสมาที่แยกได้ใส่หลอดพลาสติก
4. นำพลาสมาที่แยกได้ไปนับจำนวนเกร็ดเลือด เช่นเดียวกับขั้นตอน 2.
5. ดูด F-H ลงในหลอดพลาสติกขนาด 12x75 มม. โดยให้ส่วนที่มีความกว้างจำเพาะ 1.090 อยู่ชั้นล่างสุด แล้ว overlayer ด้วย F-H ที่มีความกว้างจำเพาะ 1.080, 1.070, 1.065, 1.060 และ 1.055 ขึ้นมาตามลำดับ แล้วจึงใส่ PRP ชั้นบนสุด

6. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 g นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
7. ใช้ไปเปิดอัตโนมัติขนาด 500 ไมโครลิตร กด PRP ที่ปั่นแล้วแต่ละชั้นนำส่งในหลอดพลาสติกขนาด 12x75 มม. โดยชั้นบนสุดจะเป็น

platelet poored plasma (PPP)

8. นำแต่ละส่วนของ PRP ที่แยกได้ ไปนับจำนวนเกร็ดเลือด ตามวิธีในข้อ 2. นำค่าที่ได้ไปหา Relative platelet count จากสูตร

$$\text{Relative platelet count} = \frac{\text{จำนวนเกร็ดเลือดที่นับได้/ลบ.มม.}}{\text{ผลรวมของจำนวนเกร็ดเลือดที่นับได้/ลบ.มม. ของทุกส่วนรวมกัน}}$$

ค. ศึกษา Circulating platelet aggregation (CPA)

ศึกษาโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Velaska และ Chitre<sup>(5)</sup> มีวิธีการดังนี้คือ smear เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำบนส้นเท้า นำไปย้อมด้วย Leishman's stain จากนั้น ทำการนับ CPA ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

การนับจากกล้องจุลทรรศน์ ได้นับตามแนวตั้งจากกับ smear โดยนับเกร็ดเลือดจำนวน 300 เซลล์<sup>(6)</sup> จำแนกเป็นเกร็ดเลือดเดี่ยวๆ และเกร็ดเลือดที่เกาะกลุ่มกันตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไปถือว่าเป็น CPA

คำนวณค่าประมาณ %CPA เป็นเปอร์เซ็นต์ได้จากสูตร

$$\%CPA = \frac{\text{จำนวนเกร็ดเลือดที่เกาะกลุ่ม}}{\text{จำนวนเกร็ดเลือดที่นับ}} \times 100$$

ง. การศึกษา Platelet aggregation

ศึกษาโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Born<sup>(7)</sup> มีหลักการดังนี้ คือ ใช้ ADP เป็นตัวกระตุ้นให้เกร็ดเลือดเกิดการจับกลุ่มกัน แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ผ่านกลุ่มของเกร็ดเลือด ด้วยเครื่อง Aggregometer (Diachi รุ่น PA-3220)

น้ำยาที่จำเป็น

1. Adenosine 5-dihydrogenphosphate (ADP), stock solution (10 mM) เตรียมโดยชั่ง ADP (Sigma Chemical Co.) 0.017088 กรัม ละลายใน normal saline solution 4 มล. แล้วแบ่งเป็นส่วนละ 0.1 มล. เก็บไว้ที่ -20 °C
2. ADP, working solution (0.1 mM) เจือจาง stock solution 0.1 มล. ให้เป็น 10.0 มล. ด้วย normal saline solution

วิธีการ

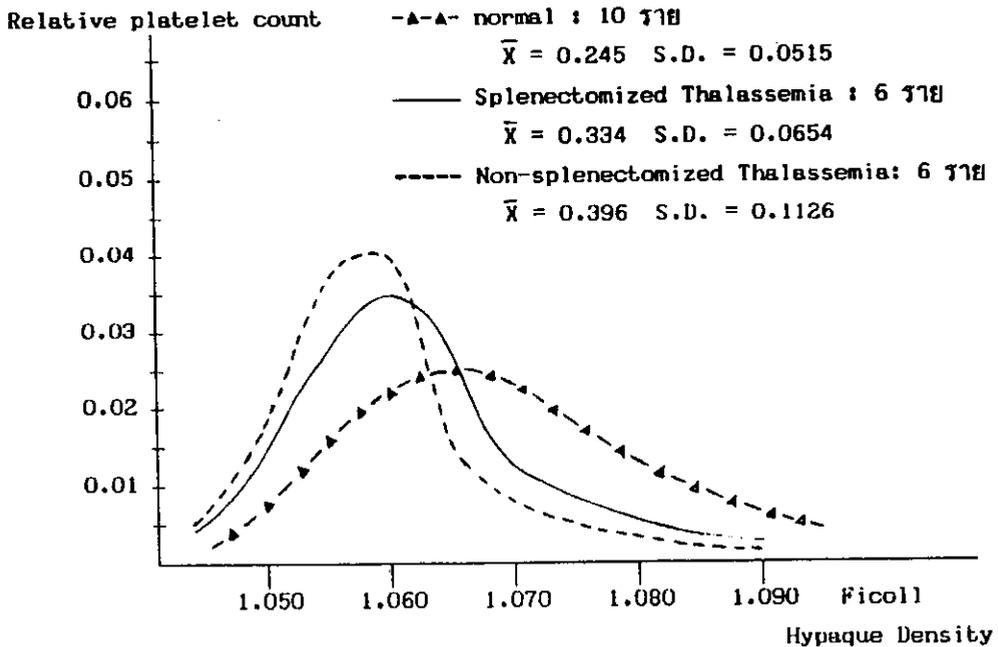
1. เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ 10 มล. โดยใส่ 3.8% sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็ง
2. นับจำนวนเกร็ดเลือด โดยใช้ 1% ammonium oxalate
3. นำเลือดที่เหลือนมาแยกชั้น PRP ของผู้ป่วยและคนปกติ ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดเอา PRP 9 ส่วนหลอดพลาสติกขนาด 12x17 มม. โดยต้องแยก PRP ที่ได้ เป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน คือ ส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่าง โดยให้เหลือพลาสมาในหลอดเดิมบ้างเล็กน้อย โดยดูด PRP จนแต่ละส่วนลงจน

4. นำเลือดและพลาสมาจากข้อ 3. ไปปั่นต่อที่ 3,600 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อแยกเอา PPP
5. คัด PRP มานับจำนวนเกร็ดเลือด จากนั้นเจือจาง PRP ให้มีจำนวนเกร็ดเลือดประมาณ 75,000-150,000 เซลล์/ลบ.มม. ด้วย PPP ทำเช่นนี้กับ PRP ที่แยกได้ทั้ง 3 ส่วน
6. ใช้ฉากลับปรับอ่านค่า transmittance ซึ่งเทียบเท่ากับ 0% aggregation
7. ใช้ PPP ปรับอ่านค่า transmittance ซึ่งเทียบเท่ากับ 100% aggregation
8. เมื่อปรับเครื่อง Aggregometer เรียบร้อยแล้ว ทำการทดสอบกับตัวอย่าง PRP ที่ปรับจำนวนแล้ว 0.5 มล. ใส่ในหลอดอ่านแล้วนำไปลงใน cuvette holder ที่อุณหภูมิ

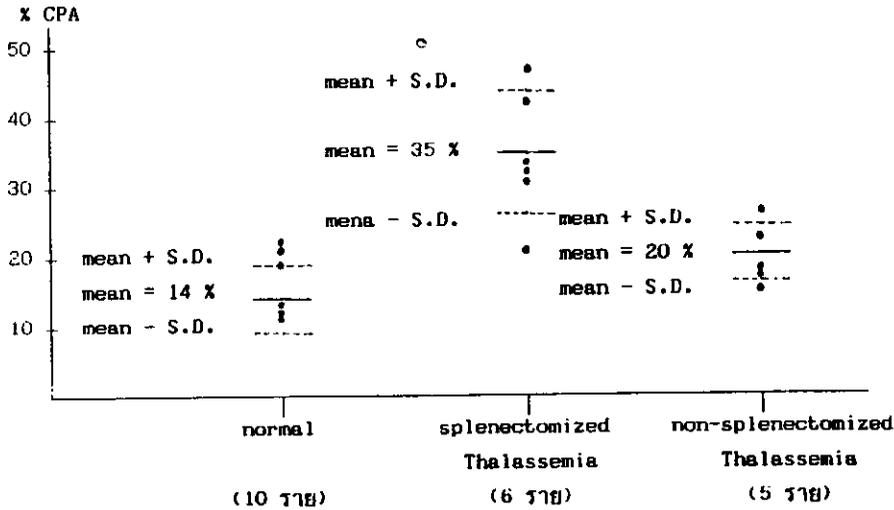
9. ใช้เครื่องบันทึกกราฟระหว่าง %Aggregation กับเวลา นาน 5 นาที หลังจากที่ได้เติม ADP ลงไปใน PRP แล้ว
10. ทำเช่นเดียวกับข้อ 8 และ ข้อ 9 สำหรับ PRP ที่แยกได้ทั้ง 3 ส่วน ในแต่ละราย

ผลการทดลอง

เมื่อใช้ F-H ความหนาแน่นต่างๆ ตั้งแต่ 1.055 ถึง 1.090 มาแยกเกร็ดเลือด พบว่าความหนาแน่นของเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ทั้งที่ตัดม้ามและไม่ตัดม้าม มีค่าต่ำกว่าของคนปกติ คือ ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.060 เป็นส่วนมาก ซึ่งในคนปกติ จะมีความหนาแน่น เท่ากับ 1.065 เป็นส่วนมาก (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่าง Relative platelet count กับ F-H density



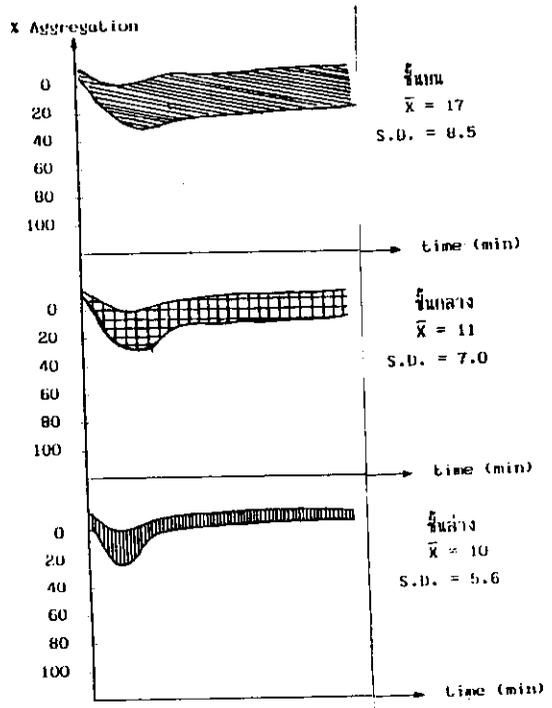
รูปที่ 2 ปริมาณ CPA ในคนปกติ, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่ตัดม้าม และไม่ตัดม้าม

เมื่อศึกษา circulating platelet aggregated (CPA) ในคนปกติ และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่ตัด และไม่ตัดม้าม จะได้ปริมาณ CPA ( $\bar{X} \pm 1SD$ ) เท่ากับ  $14 \pm 5\%$ ,  $35 \pm 9\%$  และ  $20 \pm 4\%$  ตามลำดับ ตามรูปที่ 2

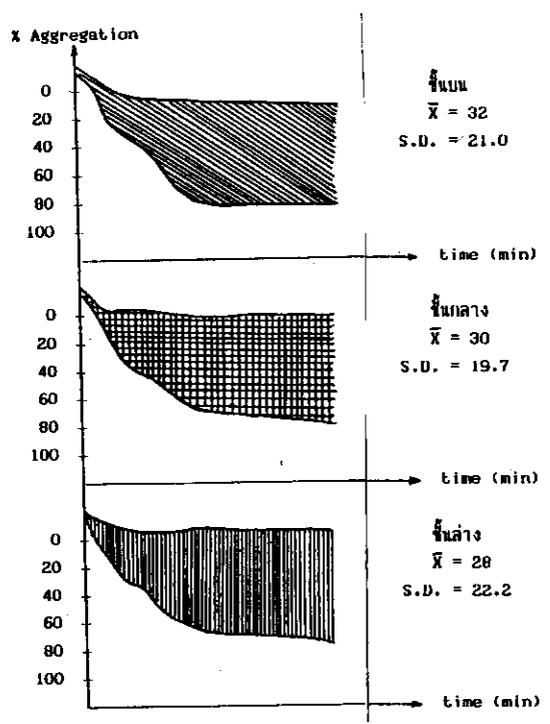
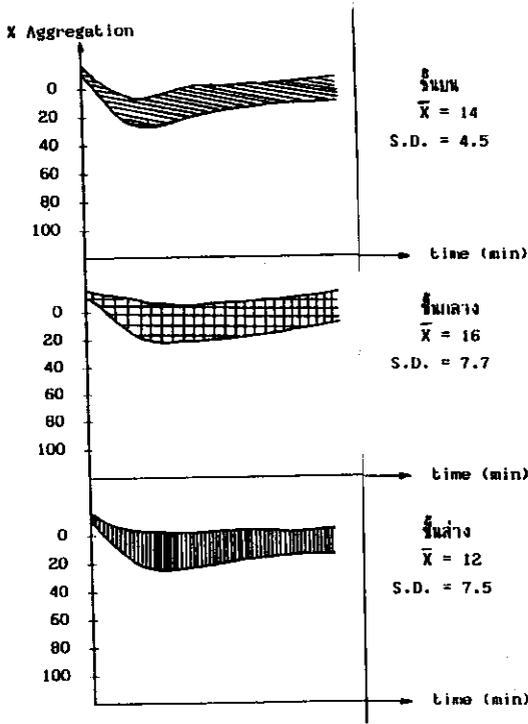
เมื่อใช้ ADP ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมล/ลิตร ต่อ PRP 1 มล. ในการกระตุ้นเกร็ดเลือดให้จับกลุ่มกัน ในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย พบว่าในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การจับกลุ่มของเกร็ดเลือด จะเป็นแบบ irreversible aggregation และจะมี hyperaggregation ในผู้ป่วยที่ตัดม้าม ตามรูปที่ 3-5

วิจารณ์

จากการศึกษา platelet density ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม และไม่ตัดม้าม เปรียบเทียบกับคนปกติ เมื่อใช้ F-H gradients พบว่าปริมาณ relative platelet count ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ทั้งที่ตัดม้ามและไม่ตัดม้าม นั้น จะมีความหนาแน่นต่ำกว่าคนปกติ คือปริมาณ



รูปที่ 3 Platelet aggregation ในคนปกติ 11 ราย



รูปที่ 4 Platelet aggregation ในผู้ป่วย ธาลัสซีเมียที่ไม่ได้ตัดม้ามจำนวน 6 ราย

รูปที่ 5 Platelet aggregation ในผู้ป่วย ธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม จำนวน 9 ราย

relative platelet count ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย นั้น จะสูงที่สุดที่ ถ.พ. 1.060 ส่วนในคนปกติจะมีปริมาณสูงสุดที่ ถ.พ. 1.065 แสดงให้เห็นว่าเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย นั้น ส่วนใหญ่จะเป็นตัวอ่อน (young form) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า และมีความหนาแน่นน้อยกว่า

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ปริมาณ CPA ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้าม และผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามจะมีปริมาณสูงกว่าคนปกติ (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม นั้น มีการ activate ให้เกร็ดเลือดจับกลุ่มกันจนกระแสรีดมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามและคนปกติตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ ปราณี

วิจิตร และคณะ (๖) ซึ่งอธิบายได้ว่า การที่เกร็ดเลือด มีการจับกลุ่มกันมากในผู้ป่วยที่ตัดม้าม อาจเนื่องมาจากผู้ป่วยที่ตัดม้าม นั้น มีปริมาณเกร็ดเลือดสูงกว่าคนปกติ เพราะในคนปกติ ม้ามจะทำหน้าที่เก็บเกร็ดเลือดไว้ หนึ่งในสาม ของทั้งหมด จนร่างกายอย่างน้อย 2 วัน ก่อนที่จะปล่อยออกออกสู่กระแสโลหิต (๖) และหลังจากการตัดม้ามแล้ว เกร็ดเลือดที่ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสโลหิตนั้น จะเป็นเกร็ดเลือดตัวอ่อน และ active มากกว่า ทำให้เกาะกลุ่มกันได้มากขึ้น แต่ก็มีบางรายที่มี CPA ใกล้เคียงกับคนปกติ ซึ่งสาเหตุหนึ่งก็คือผู้ป่วยเหล่านี้ ได้รับการให้เลือดอยู่เสมอ อาจทำให้ร่างกาย สร้างแอนติบอดี ต่อเกล็ดเลือดปรีตีนบนเยื่อเซลล์ของเกร็ดเลือดได้ และเกล็ดเลือดปรีตีน

บนเยื่อเซลล์ของเกร็ดเลือดนั้น เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกร็ดเลือดเกาะกลุ่มกัน โดยเฉพาะกลัยโคโปรตีนชนิด IIb

นอกจากนี้ ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่ทำการศึกษา % platelet aggregate โดยวิธี ADP เป็นสารกระตุ้นการจับกลุ่ม พบว่า ผู้ป่วยที่ตัดม้ามจะมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้าม และคนปกติ

ส่วนในผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้าม จะมี platelet aggregate ใกล้เคียงกับคนปกติ แต่มีรูปแบบของการจับกลุ่มแตกต่างกัน คือ ในคนปกติจะเป็นแบบ reversible ส่วนในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จะเป็นแบบ irreversible ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ได้ถูกกระตุ้นมาก่อนแล้วในร่างกาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eldor และ Hussain โดยที่เกร็ดเลือดที่นำมาศึกษาด้วยวิธีนี้ มากกว่า 1 population คือ hyperfunction เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น และมี hypofunction ซึ่งเกิดการจับกลุ่มได้น้อย แม้จะถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น แต่สำหรับในแต่ละชั้นของเกร็ดเลือดที่แยกได้นั้น จะมี %platelet aggregates ใกล้เคียงกัน

**เอกสารอ้างอิง**

1. Eldor A. Abnormal platelet function in  $\beta$ -thalassemia. Scand J Haematol 1978; 20: 447-452.
2. Hussain HA, Hutton RA, Pavlidon O, Hoffbrand AV. Platelet function in beta thalassemia major. J Clin Pathol 1979; 32: 426.
3. Winichagoon P, Fucharoen S, Wasi P. Increased circulating platelet aggregates in thalassemia. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1981; 12: 556-560.

4. Collier A, Watson H, Mathew HKDM, Strains L, Ludiam CA and Clarke BF. Platelet density analysis and interplatelet granule content in young insulin dependent diabetics. Diabetes 1986; 35: 1080-1084.
5. Velaskar DS and Chitre AP. A new aspect of platelet aggregation and a test to measure it. Am Soc Clin Path 1982; 77: 261-274.
6. Neerasingh S. Platelet aggregates in thalassemia. The Term paper, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, 1983.
7. Born GVR. Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 1962; 194: 927-929.
8. Isarangkura P, Pintadit P, Hathirat P, Sasanakul W. Platelet function test in thalassemia children. Birth Defects : Original Article Series 1988; 23: 395-401.

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)  
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

# การพัฒนาการตรวจวัดปริมาณกลัยเคทฮีโมโกลบิน โดยวิธี Affinity Chromatography

นันทยา ชนะรัตน์\* สันหัตต์ ขอบุทธานุกาพ โนศรี สุตตจิตต์\*\*

บทคัดย่อ วัตถุประสงค์ glycated hemoglobin ในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน และคนปกติ  
 ที่ได้รับการวัดโดยวิธี Affinity chromatography โดยใช้ Amino-  
 phenyl boronate sepharose ที่เตรียมขึ้นเองตามวิธีของ Cuatrecas-  
 sas และ Anfinsen ได้ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของคนปกติ  
 เท่ากับ  $2.39 \pm 0.50\%$  (n = 24) และผู้ป่วยเบาหวานเท่ากับ  $5.34$   
 $\pm 1.98\%$  (n = 64) ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <  
 0.005) และคอลัมน์ที่ใช้นี้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกอย่างน้อย 5 ครั้ง  
 (คำรหัส : กลัยเคทฮีโมโกลบิน, เบาหวาน, โครมาโตกราฟี) วารสาร  
 เทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2534 หน้า  
 37- 46

**Abstract :** Development of Affinity Chromatography Column for  
 Glycated Hemoglobin Determination. Chanarat N,  
 Khobudhanuparb S and Suttajit M.

Glycated hemoglobin in diabetics and non-diabetics was  
 studied by an affinity chromatography method. Amino-  
 phenyl boronate sepharose column was homemade developed  
 using the method of Cuatrecasas and Anfinsen. The  
 glycosylated hemoglobin in 64 diabetics was  $5.34 \pm$   
 $1.98\%$  (Mean  $\pm$  SD) which was highly significant  
 different (p < 0.005) from 24 non-diabetics,  $2.39 \pm$   
 $0.50\%$ . The column could be reused for at least 5 times.  
 (Keyword : Glycated hemoglobin, Affinity chromato-  
 graphy, Diabetes) Bull Chiang Mai AMS 1991; 24: 37- 46

ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคนิคการแพทย์) ของ นายสันหัตต์ ขอบุทธานุกาพ ปีการศึกษา 2533  
 ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ และ \*\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชา  
 ชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Glycated hemoglobin (gHb) ในคนปกติจะมียุ่ประมาณ 4-7% gHb จะแตกต่างจาก HbA ตรงที่ปลายเบต้าโกลบินของสายเบต้า (Beta chain) ของโกลบินทั้งสองสายจะมีกลูโคสเกาะอยู่ ซึ่งพบว่าการรวมตัวของกลูโคสกับ HbA นั้น เกิดจากปฏิกิริยาที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง ผู้ป่วยเบาหวานจะมีระดับ gHb สูงขึ้นเป็น 2-3 เท่าของคนปกติ คือประมาณ 18-20% ของปริมาณ Hb ทั้งหมด (1-3)

วิธีการตรวจวัด gHb นั้น มีอยู่หลายวิธี ได้แก่ Affinity Chromatography, Spectrophotometry, Electrophoresis, Isoelectric focusing chromatography, Cation-exchange chromatography และ High performance liquid chromatography (HPLC) (4,5) ในปัจจุบันวิธีการที่นิยมทำกัน คือวิธี affinity chromatography (6) ซึ่งวิธีนี้ไม่มีผลกระทบจากอุณหภูมิขณะทำการทดสอบเหมือน Cation exchange chromatography บริษัทต่างๆ ได้ผลิตชุดสำเร็จรูปสำหรับการวัดระดับของ gHb โดยวิธี Affinity chromatography นี้ออกมาจำหน่ายหลายบริษัท แต่ก็ยังมีราคาสูงมากสำหรับการนำมาใช้ที่บ้านเรา รายงานนี้ เพื่อพัฒนา Affinity column ขึ้นมาใช้เองในห้องปฏิบัติการ โดยได้ทำการเตรียมส่วนของ m-aminophenyl boronic acid sepharose ขึ้นเอง

**วัสดุและวิธีการ**

**ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ**

ได้จากการเจาะเลือด จากหลอดเลือดดำของคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวานอย่างละ 1 ราย โดยมี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ปริมาณ 1 มก. ต่อเลือด 1 มล. นำเลือดมาเตรียมเป็นน้ำเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysate) และแบ่งออกเป็นหลายๆ ส่วน เก็บไว้ในหลอดทดลอง

ขนาด 12x75 มม. เก็บในตู้แช่แข็ง เพื่อใช้ในการศึกษาความเที่ยงของการทดลอง ตัวอย่างการทดสอบ

ได้จากการเจาะหลอดเลือดดำของคนปกติ จำนวน 24 ราย โดยมี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง ปริมาณ 1 มก. ต่อเลือด 1 มล. และได้จากการเจาะจากปลายนิ้ว ของผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 64 ราย โดยเลือดที่ได้บรรจุใน microhematocrit tube ที่มีเฮปาริน เป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดที่ได้ มาเตรียมเป็นน้ำเม็ดเลือดแดงแตก เก็บไว้ในตู้แช่แข็งเพื่อหาปริมาณ gHb ต่อไป

**วิธีการ**

**ก. วิธีการเตรียมน้ำเม็ดเลือดแดงแตก**

นำตัวอย่างเลือด มาผสมกับน้ำยาทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (0.1% Triron X-100 และ 0.01% NaN<sub>3</sub>) ในอัตราส่วน 1:10 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หากไม่ทำการตรวจวัดระดับของ gHb ในวันนั้น ให้เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

**ข. วิธีการเตรียม m-Aminophenyl boronate sepharose**

หลักการ : m-aminophenyl boronic acid จะรวมตัวกับ sepharose CL-6B ตามวิธีการของ Cuatrecasas and Anfinsen (1)

**ขั้นตอนในการเตรียม : m-aminophenyl boronate sepharose มีดังนี้**

ข.1 ล้าง sepharose CL-6B (Lot 19F0456, Sigma Chemical Co.) ปริมาณ 25 มล. ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น ให้ผสม sepharose ที่ผ่านการล้างแล้ว กับ 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ปริมาณ 10 มล.

ข.2 เติม CNBr (Sigma) จำนวน 7.5 กรัม ใน 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ลงในส่วนผสมของ sepharose

ข.3 กวนสารผสมที่ได้นี้ตลอดเวลา ด้วย

เครื่องกวนแม่เหล็กให้ช้า และปรับ pH ให้ได้ 10-11 คงที่เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ด้วย 50% (w/v) NaOH ที่อุณหภูมิ 20-25 °C

ข.4 หยุดปฏิกิริยาโดยการกรอง sepharose ผ่าน glass wool และล้างด้วย cold 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ปริมาณ 1,000 มล.

ข.5 เตรียม m-aminophenyl boronic acid hemisulfate (Sigma) ปริมาณ 200 มก. ใน 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ปริมาณ 25 มล. และให้ปรับ pH ของสารละลายนั้นจนได้ 7.5 แล้วเติมลงไปบน sepharose ทันทีภายหลังการล้าง

ข.6 นำส่วนผสมที่ได้นี้ ไปเก็บที่ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง

ข.7 นำ m-aminophenyl boronate-coupled sepharose ที่ได้ มาทำปฏิกิริยากับ ethanolamine-HCl (Sigma) ปริมาณ 2.1 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น และปรับ pH จนได้ 7.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 °C

ข.8 เมื่อครบเวลา นำเอา sepharose มาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาณมาก จากนั้น นำ sepharose นี้มาผสมกับ 0.02% NaN<sub>3</sub> และ เก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้หาปริมาณ gHb ต่อไป

#### ค. วิธีการเตรียมคอลัมน์

เติม aminophenyl boronate sepharose ลงไปในคอลัมน์ขนาดเล็ก โดยให้มีความสูงของ sepharose ประมาณ 1 ซม.

#### ง. การวัดระดับของ gHb โดยวิธี Affinity chromatography

หลักการ : gHb จะรวมตัวกับ m-aminophenyl boronate sepharose ในขณะที่ ส่วนของ Hb อื่นๆ จะหลุดออกจากคอลัมน์ จากนั้น ใช้สารละลาย sorbitol ชะเอา gHb ออกมา นำส่วนของ Hb อื่นๆ และ gHb ไปวัดการดูดกลืนแสง (A) ที่ 415

#### นาโนเมตร น้ำยาที่จำเป็น

1) Wash buffer (0.25 M ammonium acetate, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1.0% Triton X-100) pH 7.8. เตรียมโดย ละลาย ammonium acetate 19.27 กรัม และ NaN<sub>3</sub> 0.2 กรัม ในน้ำ เติม Triton X-100 ลงไป 10 มล. จากนั้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.8 เก็บไว้ที่ 4 °C

2) Elution buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Sorbitol, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1.0% Triton X-100) เตรียมโดย ละลาย 15.760 กรัมของ Tris-HCl, 18.2 กรัม sorbitol และ 0.2 กรัมของ NaN<sub>3</sub> ในน้ำกลั่น เติม Triton X-100 ลงไป 10 มล. แล้วปรับปริมาตร จนครบ 1,000 มล.

#### วิธีทำ

ง.1 การ equilibrate sepharose เติม wash buffer ลงไปในคอลัมน์ จำนวน 5 มล. รอจนบัฟเฟอร์ไหลผ่านคอลัมน์หมด เปลี่ยนหลอดที่สวมคอลัมน์

ง.2 เติมน้ำเม็ดเลือดแดงแดง ลงไป 50 ไมโครลิตร และเติม wash buffer ตามลงไป 0.5 มล. เมื่อเห็นส่วนของน้ำเม็ดเลือดแดงเข้าไปใน sepharose หมดแล้วจึงเติม wash buffer ลงไปอีก 4.5 มล. จากนั้น ปล่องยี่ห้อ wash buffer นี้ ผ่านคอลัมน์เข้าไปจนหมด จากนั้นเติม wash buffer ลงไปในส่วนที่ผ่านคอลัมน์ ออกมาอีก 5.0 มล. ผสมน้ำให้เข้ากันดี เก็บไว้เป็นส่วนที่ 1 (Wash fraction)

ง.3 ย้ายคอลัมน์มาสวมในหลอดขนาด 13 x100 มม. เติม eluting buffer ลงไป 3 มล. ปล่องยี่ห้อผ่านคอลัมน์ไปจนหมด และเก็บส่วนน้ำไว้เป็นส่วนที่ 2 (Eluant fraction)

ง.4 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ของทั้ง

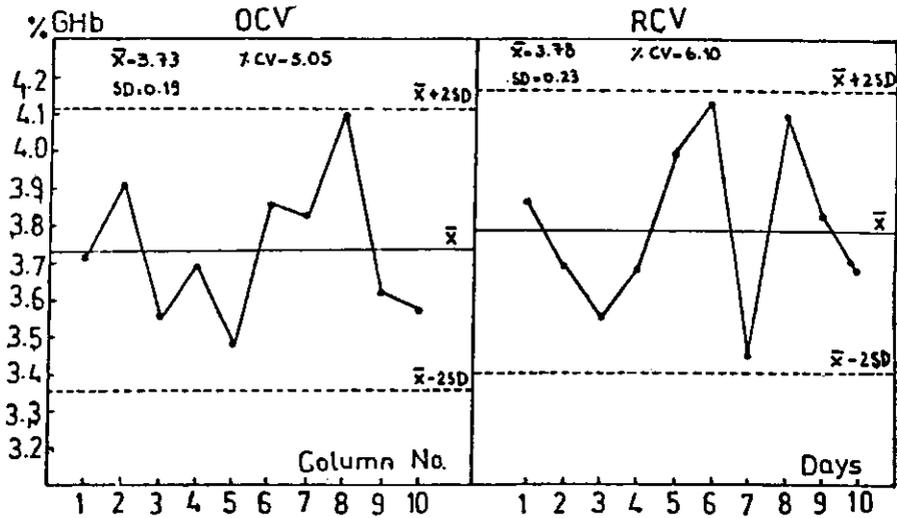
สองส่วน ที่ 415 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับ  
ศูนย์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณหา  
%gHb จากสูตร

$$\%gHb = \frac{3(A_{eluant})}{10(A_{wash}) + 3(A_{eluant})} \times 100$$

๑.5 คอลัมน์ที่ซ้แล้วนี้ สามารถนำมาใช้  
ได้อีก โดยภายหลังจากการซ้แต่ละครั้ง ให้นำเติม  
HCl 0.1N HCl ลงไป 5 มล. แล้วปล่อยให้วาง  
จากนั้นเติม 0.001N HCl ลงไปอีก 5 มล.

ปล่อยให้วางจนเหลือ 2 มล. แล้วปิดคอลัมน์ทั้ง  
ส่วนบน และส่วนล่าง นำไปเก็บที่ 4°C  
ผลการทดลอง

1. ความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ  
พบว่าเมื่อนำน้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของคน  
ปกติมาหาค่า gHb ไปพร้อมๆ กันจำนวน 10  
คอลัมน์ ได้ค่า  $\bar{X} = 3.73\%$ , SD = 0.19 และ  
 $\%CV = 5.05$  เมื่อหาปริมาณ gHb งามแต่ละวัน  
พบว่าได้ค่า  $\bar{X} = 3.78\%$ , SD = 0.23 และ  
 $\%CV = 6.10$  ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงค่าความเที่ยงของการวัดระดับ gHb ในคนปกติ

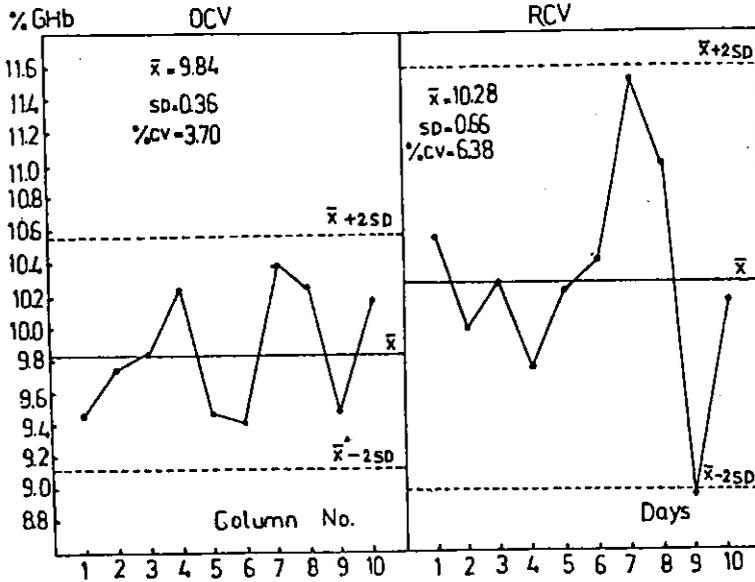
เมื่อนำน้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของผู้ป่วย  
เบาหวานมาหาค่า gHb ไปพร้อมๆ กันจำนวน  
10 คอลัมน์ ได้ค่า  $\bar{X} = 9.84\%$ , SD = 0.36  
และ  $\%CV = 3.70$  เมื่อหาปริมาณ gHb งามแต่ละ  
วัน พบว่าได้ค่า  $\bar{X} = 10.28\%$ , SD = 0.66  
และ  $\%CV = 6.38$  ดังรูปที่ 2

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ sorbitol  
ใน eluting buffer (ตารางที่ 1)  
ความเข้มข้นของ sorbitol เท่ากับ 0.2

M เมื่อทำการวัดระดับ gHb ครั้งแรก ได้  $\bar{X} =$   
9.58% และ เมื่อทำการทดลองติดต่อกันเป็นครั้งที่  
สอง ได้ค่า  $\bar{X} = 6.47\%$

ความเข้มข้นของ sorbitol เท่ากับ 0.1  
M เมื่อทำการวัดระดับ gHb ครั้งแรก ได้  $\bar{X} =$   
9.11% และ เมื่อทำการทดลองติดต่อกันเป็นครั้งที่  
สอง ได้ค่า  $\bar{X} = 7.61\%$

3. จำนวนครั้งที่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกของ  
คอลัมน์ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงค่าความเที่ยงของการวัดระดับ gHb ในผู้ป่วยเบาหวาน

ตารางที่ 1 แสดงระดับของ gHb เมื่อใช้ความเข้มข้นของ sorbitol ต่างกันใน eluting buffer

ความเข้มข้นของ sorbitol	%gHb ( $\bar{X}$ )		% ที่ลดลงของระดับ gHb
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
0.1 M	9.11	7.61	16.5
0.2 M	9.58	6.47	32.5

เมื่อใช้น้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 265 มก./ดล. มาหาค่า gHb พร้อมๆ กันจำนวน 10 คอลัมน์ ได้ค่า  $\bar{X} = 8.87\%$ ,  $SD = 0.21$  พบว่าเมื่อใช้วิธีการล้างคอลัมน์ ตามวิธีที่กล่าวแล้ว คอลัมน์นั้นสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกจำนวน 5 ครั้ง โดยที่ค่า gHb ที่ได้ไม่แตกต่างกันกับค่าที่ได้ครั้งแรกเกิน  $\pm 2SD$

เมื่อใช้น้ำเม็ดเลือดแดงแตก ของคนปกติที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 87 มก./ดล. มาหาค่า

gHb พร้อมๆ กันจำนวน 10 คอลัมน์ ได้ค่า  $\bar{X} = 2.36\%$ ,  $SD = 0.12$  พบว่าคอลัมน์นี้สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกไม่ต่ำกว่า 5 ครั้ง โดยที่ค่า gHb ที่ได้ไม่แตกต่างกันกับค่าที่ได้ครั้งแรกเกิน  $\pm 2SD$

4. ความแตกต่างของระดับ gHb ในคนปกติกับผู้ป่วยเบาหวาน

ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า gHb ในกลุ่มคนปกติและผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 84 ราย เท่ากับ  $2.39 \pm 0.50\%$  และ

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนครั้งที่สามารถนำกลับมาใช้ได้ของคอลัมน์

ครั้งที่	%gHb ในคนปกติ	%gHb ในผู้ป่วยเบาหวาน
1	2.47	8.47
2	2.58	7.69*
3	1.95*	9.64
4	2.81	9.12
5	2.45	8.65
6	2.09*	10.07*
7	2.38	7.92*
8	2.02	6.01*
9	2.29	8.43*
10	1.45*	5.58*
11	2.17	8.16*
12	1.89*	6.71*
13	1.51*	7.74*
14	2.35	5.72*
15	2.26	5.20*
16	2.07*	6.58*
$\bar{X} \pm 2SD$	$2.36 \pm 0.24$	$8.87 \pm 0.42$

\* ค่าที่ได้ เกินช่วง  $\pm 2SD$ 

5.34  $\pm$  1.98% ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี unpaired t test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.005$ )

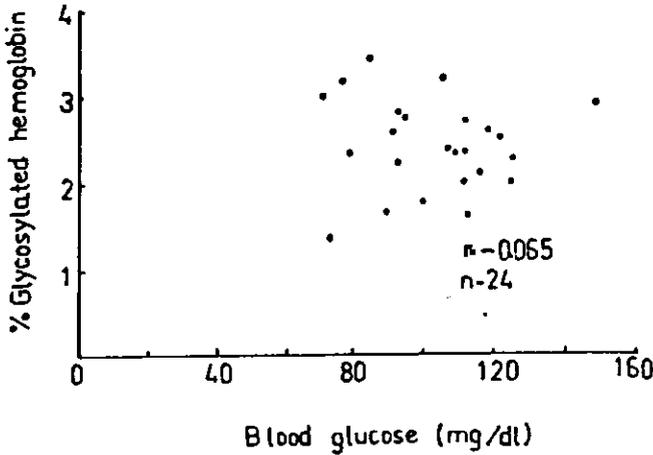
5. ความสัมพันธ์ของระดับน้ำตาลในเลือด กับ gHb

ในคนปกติ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ = - 0.065 จากจำนวนตัวอย่าง 24 ราย ดังแสดงในรูปที่ 3

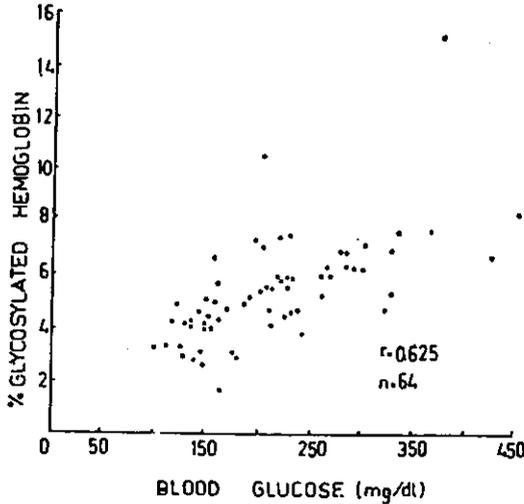
ในผู้ป่วยเบาหวาน ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ = 0.625 จากจำนวนตัวอย่าง 64 ราย ดังแสดงในรูปที่ 4

6. ค่าเฉลี่ยของ gHb ของผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่างๆ กัน

พบว่าค่าเฉลี่ยของ gHb จะเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงตั้งแต่ 101-150 มก./ดล.ขึ้นไป จะให้ค่า gHb ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือดกับ gHb ของคนปกติ



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือดกับ gHb ของผู้ป่วยเบาหวาน

คียงทางสถิติกับค่าเฉลี่ยของ gHb ในคนปกติ ( $t = 3.4029, p < 0.005$ ) ดังแสดงในรูปที่ 5

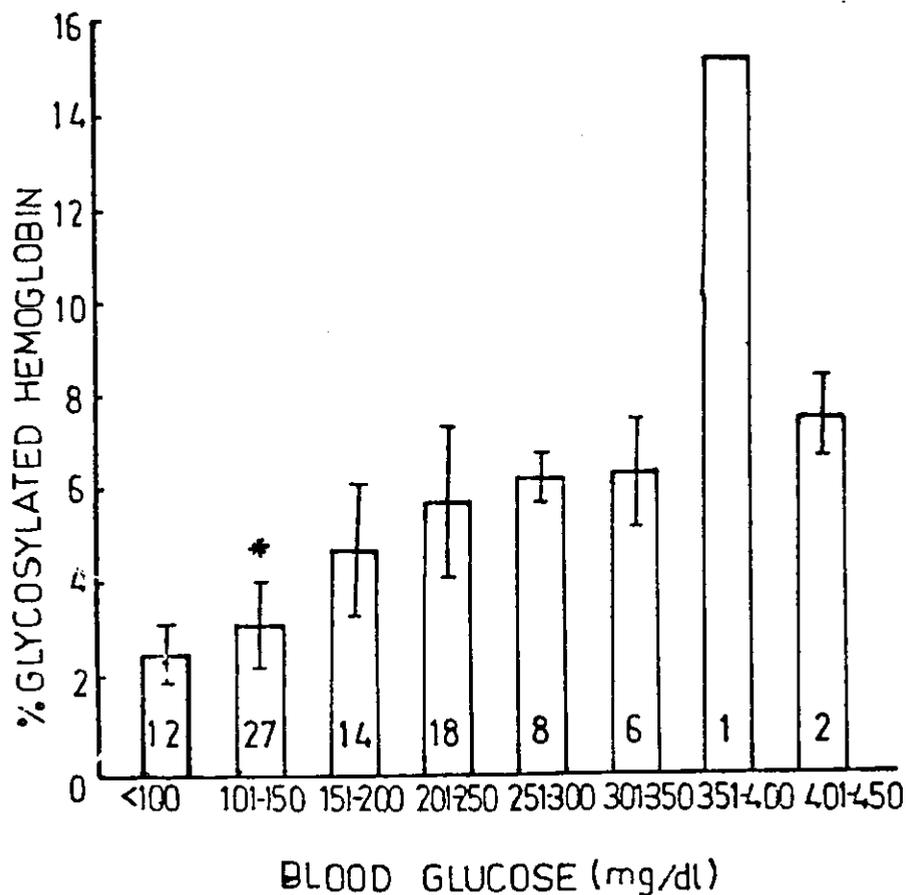
7. ระดับของ gHb ที่ได้จากการเตรียม *m-aminophenyl boronate sepharose* แต่ละครั้ง

ค่าที่ได้ของ gHb ในการเตรียม *m-aminophenyl boronate sepharose* แต่ละครั้ง

จะแตกต่างกันเล็กน้อย แต่เมื่อทดสอบทางสถิติโดยการทำ *paired t test* พบว่า ค่าที่ได้แตกต่างกันนี้ ไม่นัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3

บทวิจารณ์

จากการศึกษาถึงความเที่ยงของการวัดระดับ gHb เมื่อใช้น้ำเม็ดเลือดแดงแตกของคนปกติและ



รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยของ gHb ของผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่างๆ กัน (ตัวเลขในกราฟแสดงถึงจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม, \* เริ่มมีความแตกต่างจากกลุ่ม <100 มก./ดล. อย่างมีนัยสำคัญ)

ตารางที่ 3 แสดงระดับ gHb ที่ได้จากการเตรียม aminophenyl boronate sepharose ๑๓ แต่ละครั้ง

Sample No.	Blood glucose (mg/dl)	%gHb ( $\bar{X}$ )		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	265	12.26	10.89	9.79
2	117	4.06	3.86	4.27
3	87	4.14	3.19	3.96

ผู้ป่วยเบาหวาน พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%CV) ของตัวอย่างทั้งสองระดับนี้ ไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งการทำไปพร้อมๆ กันในวันเดียว และการทำคนละวันกัน

จากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ sorbitol ใน eluting buffer โดยการใช้น้ำเมดิเลียดแดงแดง ของผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 265 มก./ดล. พบว่าความเข้มข้นของ sorbitol เพียง 0.1 M ก็เพียงพอแล้วสำหรับการเข้าแทนที่ gHb ที่รวมตัวกับ m-aminophenyl boronate sepharose ได้ เพราะมีความเข้มข้นมากกว่า gHb ที่มีความเข้มข้นเพียงประมาณ 10  $\mu$ M หลายเท่า นอกจากนี้ เมื่อทำการล้างคอลัมน์ภายหลังการใช้แล้ว และนำมาทดลองวัดระดับของ gHb ในหมักที่พบว่าค่าของ gHb ที่ได้ครั้งหลังนี้ จะลดลงจากเดิม 16.5% เมื่อใช้ sorbitol 0.1 M ในขณะที่เมื่อใช้ sorbitol 0.2 M จะทำให้ระดับ gHb ลดลงถึง 32.5% ผลดังกล่าวนี้ เนื่องมาจากน้ำยาที่ใช้ล้างคอลัมน์เพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำอีกนั้นสามารถไปแทนที่ sorbitol ออกจาก amino-phenyl boronate sepharose ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในความเป็นจริงของ sorbitol 0.1 M นี้ การแทนที่ด้วยกรด HCl จะกระทำได้ง่ายกว่า ดังนั้น การใช้ ความเข้มข้นของ sorbitol 0.1 M ในบัฟเฟอร์สำหรับล้างคอลัมน์ จึงมีความเหมาะสมมากกว่าความเข้มข้น 0.2 M ในการนำมาใช้ซึ่งที่กล่าวมา สำหรับการนำกลับมาใช้ใหม่ของคอลัมน์นั้น รายงานนี้ขอแนะนำว่า ไม่ควรนำมาใช้ทันทีภายหลังการล้างด้วยกรด ควรจะทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนนำมาใช้ เพื่อให้ sorbitol หลุดออกจาก aminophenyl boronate sepharose ได้อย่างสมบูรณ์หรือมากที่สุดเสียก่อน

สำหรับจำนวนครั้งที่สามารถนำกลับมาใช้ได้

อีกของคอลัมน์นั้น ได้จากค่า  $\bar{X} \pm 2SD$  ของการทำ RCV โดยสำหรับผู้ป่วยเบาหวานนั้น ได้ใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 265 มก./ดล. มาทำ ส่วนคนปกตินั้น ได้ใช้ตัวอย่างจากคนสุขภาพดี ที่มีระดับน้ำตาลในเลือด 87 มก./ดล. มาทำ จากนั้น ค่าที่ได้จากการนำกลับมาใช้ในแต่ละครั้งนั้น ค่าที่ได้เกินจากช่วง  $\bar{X} \pm 2SD$  หรือไม่ หากพบว่า ค่าที่ได้ในการทดสอบแต่ละครั้ง ไม่อยู่ในช่วง  $\bar{X} \pm 2SD$  เป็นจำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์นั้นหมดสภาพ ไม่ควรนำกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ พบว่าคอลัมน์ที่ใช้กับตัวอย่างจากผู้ป่วยเบาหวานนั้น สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก 5 ครั้ง ส่วนคอลัมน์ที่ใช้กับตัวอย่างจากคนปกติ สามารถนำกลับมาใช้ได้มากกว่า 5 ครั้ง จากการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่าคอลัมน์แต่ละอันนั้น สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ซึ่งนับว่ามีประโยชน์มาก เพราะจะเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดระดับ gHb โดยวิธี Affinity chromatography ที่มีราคาแพงลงได้

เมื่อทำการทดลองวัดระดับ gHb ในกลุ่มคนปกติ 24 ราย พบว่าค่า  $\bar{X} \pm SD$  ของกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ  $2.39 \pm 0.50\%$  และในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานได้ค่า  $\bar{X} \pm SD$  เท่ากับ  $5.34 \pm 1.98\%$  ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ถึงแม้ว่าจะได้ค่าไม่เท่ากับที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งอาจจะเป็นเนื่องจากเป็นกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน แต่ก็พบว่าสามารถชี้แสดงถึงความแตกต่างกันของระดับ gHb ของกลุ่มตัวอย่างทั้งสองอย่างชัดเจน โดยพบว่าเมื่อทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของระดับ gHb ของทั้งสองกลุ่มวิธี unpaired t test พบว่าค่าทั้งสองนี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.005$ )

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับน้ำตาลในเลือดกับ gHb นั้น เมื่อทำการศึกษาในกลุ่ม

คนปกติจำนวน 24 ราย พบว่าค่า  $r = -0.065$  ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในกลุ่มตัวอย่างคนปกติ ค่าทั้งสองนี้ไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นผู้ป่วยเบาหวาน จำนวน 64 ราย และกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 88 ราย พบว่าค่า  $r$  ที่ได้เท่ากับ 0.625 และ 0.754 ซึ่งค่าที่ได้ทั้งสองค่านี้ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับน้ำตาลในเลือด กับ gHb ในกลุ่มตัวอย่างนี้ว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างดี ดังนั้น เราสามารถใช้อัตราวัดระดับ gHb นี้เป็นตัวควบคุมคนปกติ และผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อที่จะคาดเดาถึงระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงที่ผ่านมาของผู้ป่วยได้ และเมื่อนำมาเทียบกับการศึกษาค่าเฉลี่ยของ gHb ในผู้ที่มิระดับน้ำตาลในเลือดต่างๆ กันแล้ว พบว่าระดับของ gHb จะเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นโดยระดับน้ำตาลในเลือดตั้งแต่ช่วง 101-150 มก./ดล. ขึ้นไป จะให้ค่าของ gHb สูงกว่าระดับ gHb ของกลุ่มคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.005$ ) ซึ่งค่าที่ได้จากการศึกษาทั้ง 2 แบบนี้ มีความสอดคล้องกัน

ในการเตรียม aminophenyl boronate sepharose แต่ละครั้งนั้น พบว่า ค่าของ gHb ที่ได้ มีความแตกต่างกันอยู่บ้าง แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ โดยการทำ unpaired t test สาเหตุที่ทำให้ได้ผลดังกล่าวนี้ เนื่องมาจากการเตรียม aminophenyl boronate sepharose แต่ละครั้งนั้น ผู้ทำการทดลองได้เตรียมในปริมาณที่ไม่เท่ากัน แต่ได้ใช้สภาวะต่างๆ ในการเตรียม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง sepharose กับ m-aminophenyl boronic acid เท่ากันทุกครั้ง ซึ่งคาดว่าจากสาเหตุดังกล่าวนี้ เป็นผลทำให้การทำปฏิกิริยาดังกล่าว เกิดไม่สมบูรณ์และทั่วถึงพอในการเตรียมในปริมาณมาก ซึ่งจากสาเหตุนี้ สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารทั้งสองดังกล่าวให้มากขึ้น และควรมีการควบคุมผลตลอดเวลาด้วย

## เอกสารอ้างอิง

1. King ME. Glycosylated Hemoglobin. In Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Co, 1987.
2. Koenst MH and Edstrom RD. Determination of glycosylated hemoglobin : A laboratory experiment relevant to diabetes mellitus. Biochem Ed 1985; 13: 7-9.
3. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, et al. Glucose regulation and HbA<sub>1c</sub> in diabetes. New Engl J Med 1976; 295: 417-420.
4. นันทยา ชนะรัตน์, ประสิทธิ์ ชนะรัตน์ และ มณี แก้วปลั่ง. กลัยเคมิโมโกลบิน : วิธีการที่เหมาะสม. วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ 2531; 21: 31-38.
5. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography : comparison with colorimetric and ion exchange methods, and effects of common interference. Clin Chem 1982; 28: 2088-2094.

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

# Zinc Protoporphyrin ในหญิงมีครรภ์

ประสิทธิ์ ชะวีรัมย์ บุญเกียรติ แซ่ตั้ง สมพงษ์ ไชยารัตน์ และ นันทยา ชะวีรัมย์



**บทคัดย่อ** วัตถุประสงค์ ศึกษา Zinc protoporphyrin (ZPP) โดยวิธีเครื่อง Protofluoro-Z ในหญิงมีครรภ์ อายุระหว่าง 18-40 ปี จำนวน 57 รายที่มารับการตรวจ ณ โรงพยาบาลสมทวารานนครเชียงใหม่ พบที่มีระดับ ZPP สูงกว่า 80 ไมโครกรัม/ดล. ซึ่งแสดงถึงการมีภาวะพร่องเหล็กจำนวน 7 คน(12.28%) และยังพบความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และฮีมาโตคริตด้วย รายงานนี้ชี้ให้เห็นว่าการหาภาวะระดับ ZPP เป็นวิธีที่สามารถตรวจพบภาวะโลหิตจางเนื่องจากการพร่องเหล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การตรวจพบภาวะโลหิตจางแต่เนิ่นๆจะเป็นแนวทางให้ได้รับการเสริมเหล็ก ซึ่งเพียงพอแก่ความต้องการของร่างกายมารดา และทารกในครรภ์ (คำรหัส : ZPP, หญิงมีครรภ์, โลหิตจาง) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2534 หน้า 47-52

**Abstract** Zinc Protoporphyrin in Pregnancy. Chanarat P, Sae-Tung B, Chaiyarasamee S and Chanarat N.

Zinc Protoporphyrin (ZPP) was determined by Protofluoro-Z in 57 pregnant women aged 18-40 years who attended at Chiang Mai University Hospital. There were 7 (12.28%) of 57 pregnant women had ZPP more than 80 µg/dl which indicated the iron deficiency status. The ZPP found was also correlated with hemoglobin and hematocrit levels. The ZPP determination is simple, convenient, rapid and is an effective test for detecting iron deficiency status. Early detection will enable them to acquire adequate iron supplementation to fulfill the maternal and fetal requirement. (Keyword : ZPP, Pregnancy, Anemia) Bull Chiang Mai AMS 1991; 24: 47-52

ภาคินพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) ของ นายบุญเกียรติ แซ่ตั้ง ปีการศึกษา 2532  
 \*อาจารย์ \*\*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก \*\*\*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี  
 คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Zinc protoporphyrin (ZPP) ในภาวะปกติจะมีอยู่เป็นจำนวนน้อย แต่เมื่อมีภาวะพร่องเหล็กเกิดขึ้น Zn จะมีการรวมตัวกับ protoporphyrin เกิดเป็น ZPP ได้มากขึ้น ระดับ ZPP ในเม็ดเลือดแดงจึงสามารถชี้เป็นดัชนีบอกภาวะพร่องเหล็กได้<sup>(1)</sup> ในผู้ป่วยตะกั่วเป็นพิษจะมีระดับ ZPP สูงขึ้นเช่นเดียวกัน วิธีการวัด ZPP มี 2 ทางคือ

1. วัดทั้ง ZPP และ free protoporphyrin โดยทั่วไปใช้การสกัดเอาเฟอร์ริตินออกจากเลือดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีกรดเล็กน้อย เช่นกรดอะซิติกในเอทิลอะซิเตต ซึ่งโพรตีนจะตกตะกอนออกไปด้วยเหลือแต่เฟอร์ริตินอยู่ในสารละลาย หากปริมาณโดยวิธีการเรืองแสงได้ด้วยเครื่องวัดการเรืองแสง

2. วัด ZPP โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องเจือจางหรือสกัดออกจากเลือดก่อน ด้วยเครื่อง Protofluoro-Z หรือ Hematofluorometer ในห้องมีครก บ่อยครั้งจะพบภาวะโลหิตจางเนื่องจากการพร่องเหล็ก (Iron deficiency anemia) ซึ่งอาจตรวจพบได้จากค่าเหล็กในซีรัม (Serum iron, SI), ค่าความสามารถในการจับเหล็กทั้งหมด (Total iron binding capacity, TIBC), %Transferrin saturation, เฟอร์ริติน (Ferritin) และ ZPP รายงานนี้ เพื่อวัด ZPP เพื่อดูภาวะพร่องเหล็กในห้องมีครก

**วัสดุและวิธีการ**

ตัวอย่างทดสอบ จะะเลือด (EDTA blood) จากห้องมีครก 57 รายที่มารับการตรวจร่างกายที่แผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จำนวน 1 มล. และทำการทดสอบค่า complete blood count (CBC) และ ZPP การวัด ZPP วัดโดยใช้เครื่องและหลักการของเครื่อง Protofluoro-Z (Helena Labora-

tories)<sup>(2)</sup> ทำดังนี้

- 1) ปรับเครื่องด้วยน้ำยามาตรฐานให้ได้ตามกำหนด
- 2) นำ EDTA blood มาผสมให้เข้ากันดี แล้วนำมาหยดในหลอดทดลองขนาด 10x75 มม. 2 หยด
- 3) หยดน้ำยา Proto-Fluor จำนวน 1 หยด ปิดหาราฟิล์ม เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 10-20 วินาที เพื่อให้เกิดการ reoxygenate อย่างสมบูรณ์
- 4) เหล้าผสมลงบนกระงกบาง วางบน sample holder
- 5) นำ sample holder ใส่เข้าไปในเครื่อง กดปุ่ม 'MEASURE' ภายใน 5 วินาที เครื่องจะอ่านค่า ZPP ออกมาเป็น ไมโครกรัม/ดล.

**ผลการทดลอง**

จากการศึกษาในห้องมีครก 57 ราย (ตารางที่ 1) พบว่ามีค่า ZPP มากกว่า 80 ไมโครกรัม/ดล. จำนวน 7 คน โดยพบผู้มี ZPP สูงและฮีโมโกลบินต่ำ (น้อยกว่า 1 กรัม/ดล.) ร้อยละ 7.02 ผู้ที่มี ZPP สูงแต่ฮีโมโกลบินปกติ ร้อยละ 5.26 ผู้ที่มี ZPP ปกติ (ไม่เกิน 80 ไมโครกรัม/ดล.) และฮีโมโกลบินต่ำ ร้อยละ 12.28 และผู้ที่มีทั้ง ZPP และฮีโมโกลบินปกติ ร้อยละ 75.44 ซึ่งพบว่าค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

เมื่อเทียบค่าฮีมาโตคริตกับค่า ZPP พบการมี ZPP สูงและฮีมาโตคริตต่ำ (น้อยกว่า 33%) ร้อยละ 5.26 ผู้ที่มี ZPP สูงและฮีมาโตคริตปกติ ร้อยละ 7.02 ผู้ที่มี ZPP ปกติและฮีมาโตคริตต่ำ ร้อยละ 7.02 และผู้ที่มีทั้ง ZPP และฮีมาโตคริตปกติ ร้อยละ 80.70 โดยที่ค่าทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

จำนวนห้องที่มีค่า ZPP สูงในร้อยละ 3

เดือนที่สองและสามของการตั้งครรภ์ คิดเป็นร้อยละ 26.32 และ 7.14 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นตัวเลขที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) จำนวนหญิงที่มีค่าฮีโมโกลบินต่ำในระยะเวลา 3 เดือนแรก, ที่สองและที่สามของการตั้งครรภ์คิดเป็นร้อยละ 10.00, 26.32 และ 17.86 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) อีกทั้งพบหญิงมีครรภ์ที่มีค่าฮีมาโตครีตต่ำในระยะเวลา 3 เดือนที่สองและที่สามของการตั้งครรภ์คิดเป็นร้อยละ 15.79 และ 14.29 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ )

หญิงมีครรภ์ที่มีอายุในช่วง 21-30 ปี และ 31-40 ปี (ตารางที่ 3) พบที่มีค่า ZPP สูงอยู่ร้อยละ 13.04 และ 14.29 ตามลำดับ ถ้าใช้ค่าฮีโมโกลบินเป็นเกณฑ์ จะพบที่มีฮีโมโกลบินต่ำ

ตารางที่ 1 ร้อยละของหญิงมีครรภ์ที่มีระดับ ZPP, ฮีโมโกลบิน (Hb) และฮีมาโตครีท (Hct) ต่างๆ

Parameter	ZPP( $\mu$ g/dl)		X <sup>2</sup>
	>80	≤80	
N	7	50	
Hb (g/dl)			
<11	7.02	12.28	7.34*
≥11	5.26	75.44	
Hct (%)			
<33	5.26	7.02	6.92*
≥33	7.02	80.70	

\* ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 2 ร้อยละของหญิงที่มีค่า ZPP, Hb และ Hct ผิดปกติในแต่ละช่วงของการตั้งครรภ์

Parameters	trimester			X <sup>2</sup>
	1	2	3	
N	10	19	28	
ZPP > 80 $\mu$ g/dl	0	26.32	7.14	1.19
Hb < 11 g/dl	10	26.32	17.86	1.19
Hct < 33%	0	15.79	14.29	1.72

เป็นร้อยละ 17.39 และ 42.86 แต่ถ้าใช้ค่าฮีมาโตครีทเป็นเกณฑ์ จะพบที่มีค่าต่ำเป็นร้อยละ 10.87 และ 28.57 ตามลำดับ ซึ่งค่าทั้งหมดนี้มีความแตกต่างกัน ( $p > 0.05$ )

จำนวนครึ่งของการตั้งครรภ์ ค่า ZPP ที่พบสูงในหญิงที่ตั้งครรภ์ครั้งแรกและครั้งที่ 2 คิดเป็น

ร้อยละ 11.63 และ 15.38 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ถ้าใช้ค่าฮีโมโกลบินเป็นเกณฑ์ จะพบที่มีฮีโมโกลบินต่ำเป็นร้อยละ 18.60 และ 23.08 แต่ถ้าใช้ค่าฮีมาโตครีทเป็นเกณฑ์ จะพบที่มีค่าต่ำเป็นร้อยละ 13.95 และ 7.69 ตามลำดับ ซึ่งค่าทั้งหมดนี้มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 3 ร้อยละของหญิงที่มีค่า ZPP, Hb และ Hct ผิดปกติในช่วงอายุต่างๆ

Parameters	Age (Years)			X <sup>2</sup>
	21	21-30	31-40	
N	4	46	7	
ZPP > 80 ug/dl	0	13.04	14.29	0.61
Hb < 11 g/dl	0	17.39	42.86	3.56
Hct < 33%	0	10.87	28.57	2.37

ตารางที่ 4 ร้อยละของหญิงที่มีค่า ZPP, Hb และ Hct ผิดปกติในแต่ละครั้งของการตั้งครรภ์

Parameters	จำนวนครั้งของการตั้งครรภ์			X <sup>2</sup>
	1	2	3	
N	43	13	1	
ZPP > 80 ug/dl	11.63	15.38	0	0.27
Hb < 11 g/dl	18.60	23.08	0	0.37
Hct < 33%	13.95	7.69	0	0.51

**วิจารณ์**

หญิงมีครรภ์ที่มีค่า ZPP เกิน 80 ไมโครกรัม/ดล. ทั้ง 7 ราย ไม่พบ basophilic stippling ในเม็ดเลือดแดงเนื่องจากพิษตะกั่วเลย คนที่มีฮีโมโกลบินต่ำกว่า 11 กรัม/ดล. พบ ZPP เกิน 80 ไมโครกรัม/ดล. อยู่ร้อยละ 7.02 นั่นคือ เมื่อใช้ค่าฮีโมโกลบินเป็นเกณฑ์จะพบหญิงมีครรภ์ที่มีภาวะโลหิตจาง เนื่องจากการพร่องเหล็กร้อยละ 7.02 ผู้ที่มีภาวะพร่องเหล็กแต่ไม่มีโลหิตจางร้อยละ 5.26 ทั้งนี้เนื่องจากภาวะพร่องเหล็ก สามารถตรวจพบได้ก่อนที่จะมีอาการโลหิตจาง (1) และพบหญิงที่มีภาวะโลหิตจางแต่ไม่พบภาวะพร่องเหล็กร้อยละ 12.28 ซึ่ง

อาจจะเป็นโลหิตจาง เนื่องจากสาเหตุอื่น ที่ไม่เกี่ยวกับภาวะพร่องเหล็ก แต่เมื่อใช้ค่าฮีมาโตคริตและค่า ZPP เป็นเกณฑ์ จะพบหญิงมีครรภ์ที่มีภาวะโลหิตจางร้อยละ 7.02 และโลหิตจางโดยไม่พร่องเหล็กร้อยละ 7.02 นอกจากนั้น จากตารางที่ 1 จะพบการกระจายของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญ (X<sup>2</sup> = 7.34 และ X<sup>2</sup> = 6.92) แสดงว่าค่า ZPP กับค่าฮีโมโกลบินและค่า ZPP กับค่าฮีมาโตคริต มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน

หญิงมีครรภ์โดยทั่วไป จะเริ่มพบระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินและฮีมาโตคริตลดลงตั้งแต่ระยะการตั้งครรภ์ช่วง 3-5 เดือนแรก (2) จากการศึกษาภาวะโลหิตจางในหญิงมีครรภ์ในจังหวัด

เชียงใหม่เมื่อปี พ.ศ. 2525 พบผู้ที่มึระดับฮีโมโกลบินต่ำกว่า 11 กรัม/ดล. ในระยะ 3 เดือนที่ 1, 2 และ 3 ของการตั้งครรภ์เป็นร้อยละ 2.00, 11.11 และ 9.85 ตามลำดับ<sup>(3)</sup> ในการศึกษาครั้งนั้นพบมากขึ้นเป็น 10.00, 26.32 และ 17.86 ตามลำดับ ทั้งนี้จำนวนข้อมูลการศึกษาครั้งนี้มีน้อยกว่า นอกจากนั้น ยังพบผู้ที่ ZPP สูงในระยะตั้งครรภ์ช่วง 1 เดือนที่ 1, 2 และ 3 เป็นร้อยละ 0, 26.32 และ 7.14 พบผู้ที่ระดับฮีมาโตคริตต่ำร้อยละ 0, 15.79 และ 14.92 ตามลำดับ จะเห็นว่าหญิงมีครรภ์ระยะ 3 เดือนที่สอง จะมีภาวะโลหิตจางและภาวะพร่องเหล็กสูงกว่าระยะสามเดือนที่ 1 และที่ 3 แต่ไม่มีความสำคัญ สาเหตุที่เป็นไปได้ คือในระยะสามเดือนแรกของการตั้งครรภ์ มักจะมีการเบื่ออาหารและคลื่นไส้อาเจียน ทำให้มีการขาดสารอาหารรวมทั้งธาตุเหล็กได้ จึงทำให้พบภาวะโลหิตจางและพร่องเหล็กในระยะสามเดือนที่ 2 อีกทั้งทารกในครรภ์จะมีการใช้ธาตุเหล็ก เพื่อนำไปสร้างเม็ดเลือดอย่างมากในช่วง 5 เดือนแรกของการตั้งครรภ์ โดยที่ 3 เดือนแรกจะสร้างที่ yolk sac อย่างมาก และเดือนที่ 4-5 จะสร้างที่ตับอย่างมาก<sup>(4)</sup> จึงทำให้พบภาวะพร่องเหล็กในแม่ได้

หญิงมีครรภ์ช่วงอายุ 21-30 ปีและ 31-40 ปี มีระดับฮีโมโกลบินต่ำเป็นร้อยละ 17.39 และ 42.86 และมีฮีมาโตคริตต่ำร้อยละ 10.87 และ 28.57 ส่วน ZPP พบสูงขึ้นร้อยละ 13.04 และ 14.29 ตามลำดับ แสดงว่าภาวะโลหิตจางและพร่องเหล็กจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น แต่ในการศึกษานี้ไม่พบมีความสำคัญ สาเหตุที่พบดังนี้ อาจเป็นเนื่องจาก เมื่ออายุมากขึ้น ปริมาณไซโครดกแดง ที่ใช้สำหรับการสร้างเลือดจะลดลง ร่วมกับมีภาวะท็อกซิกนการตั้งครรภ์ข้างต้นด้วย

หญิงมีครรภ์ครั้งแรก และครั้งที่ 2 พบภาวะโลหิตจางเนื่องจากมีระดับฮีโมโกลบินต่ำ ร้อยละ

18.60 และ 23.08 มี ZPP สูงขึ้นร้อยละ 11.63 และ 15.38 ตามลำดับ แม้จะไม่พบมีความสำคัญ แต่ก็แสดงว่าจำนวนการตั้งครรภ์เพิ่มทำให้เกิดภาวะโลหิตจางและพร่องเหล็กได้มากขึ้น

จากการศึกษาทั้งหมด พบว่าสามารถใช้ค่า ZPP ในการตรวจหาภาวะโลหิตจางจากการพร่องเหล็กในหญิงมีครรภ์ได้ และเป็นเกณฑ์ดีกว่าการใช้ระดับฮีโมโกลบินและฮีมาโตคริต ทั้งนี้เนื่องจาก เป็นการตรวจหาสาเหตุเนื่องจากการพร่องเหล็กโดยตรง ซึ่งระดับฮีโมโกลบินและฮีมาโตคริต ไม่สามารถบอกสาเหตุของการมีภาวะโลหิตจางได้ วิธีอื่นๆ ที่ใช้ตรวจสอบภาวะพร่องเหล็กได้ เช่นการทำ iron stain ของไซโครดก<sup>(5)</sup> แต่เป็นวิธีที่ยังยาก ผู้ป่วยต้องถูกเจาะไซโครดกซึ่งต้องกระทำโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ ฉะนั้นรายงานนี้ จึงแนะนำการใช้ค่า ZPP ในการตรวจสอบภาวะโลหิตจางจากการพร่องเหล็ก ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวกรวดเร็วกว่ามาก

**เอกสารอ้างอิง**

1. นันทยา ชนะรัตน์ และ ประสิทธิ์ ชนะรัตน์. Erythrocyte Zinc Protoporphyrin. Bull Chiang Mai AMS 1991; 24: 1-8.
2. Laboratory Manual for ProtoFluoro-Z, Helena Laboratories.
3. สมอง ไชยรัตน์, อรพันธ์ ไชยรัตน์ และ ปัญจะ กุลพงษ์. การศึกษาภาวะโลหิตจางเนื่องจากการพร่องเหล็กในแต่ละช่วงของการตั้งครรภ์. งานวิจัยของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2525.
4. ชัยวีรจน์ แสงอดม. Hematopoiesis. ภาควิชาคลินิกโลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. Yip R, Schwartz S, Deindard AS. Screening for iron deficiency

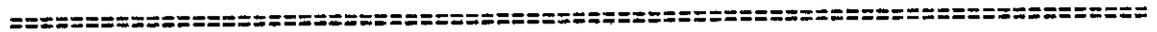
with the erythrocyte protopor-  
phyrin test. Pediatrics 1983;

72: 214-219.

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)  
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะแพทยศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บันทึก

# การควบคุมคุณภาพภายนอก ของการตรวจสอบแผ่นสเมียร์เลือด ประสิทธิ์ ธีระวัฒน์\* และ ศุภาดา ไชยสวัสดิ์\*\*



การตรวจสอบสเมียร์เลือดได้แก่ การดูจำนวน การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว การดูรูปร่างของเม็ดเลือดแดง การดูขนาด จำนวน และคุณสมบัติของเกร็ดเลือด มีความสำคัญในทางคลินิก สามารถที่จะช่วยในการวินิจฉัยโรคได้ ถ้าหากทำด้วยวิธีการที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ประโยชน์ที่ได้จากการตรวจสอบสเมียร์เลือดนี้ ในปัจจุบันยังเอาไปใช้กันน้อยอยู่ อาจเป็นเพราะความเชื่อถือของแพทย์ต่อผลทางห้องปฏิบัติการยังอยู่ในระดับที่ไม่สูงนัก การควบคุมคุณภาพของการทดสอบจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องนำเข้ามาใช้ในงานประจำวัน เพื่อผลที่ได้จะคุ้มกับการลงทุนที่เสียไป เนื่องจากการทดสอบ การใช้เวลาและการใช้สารเคมี ในการย้อมสเมียร์เลือดเพื่อตรวจสอบสเมียร์เลือด ซึ่งทำอยู่ทั่วไปในทุกรังพยาบาล

การตรวจสอบสเมียร์เลือด เพื่อให้ได้ผล การตรวจที่ถูกต้องขึ้นอยู่กับคุณภาพของการเก็บตัวอย่างเลือด การทำสเมียร์เลือด การย้อมสี ทิศทางการนับ การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว การกำหนดเกณฑ์การอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดง (Grading of red cell morphology) ที่ถูกต้อง ข้อควรคำนึงในการควบคุมคุณภาพของการตรวจสอบสเมียร์เลือดมีดังนี้

### 1. การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อทำสเมียร์เลือดนั้น สามารถเก็บได้ทั้งจากหลอดเลือดดำและหลอดเลือดฝอย จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือด มีความแตกต่างกันเล็กน้อยในระหว่างหลอดเลือดดำ และหลอดเลือดฝอย แต่โดยทั่วไปแล้วไม่มีความสำคัญในการแปลผลทางคลินิก ถ้าการเก็บตัวอย่างเลือด กระทำโดยถูกต้องทุกวิธีการวิธีที่นิยมทำคือเก็บเลือดจากหลอดเลือดฝอย โดยหลีกเลี่ยงการใช้สารกันเลือดแข็ง การเก็บตัว

อย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ และใช้สารกันเลือดแข็ง และถ้าทำสเมียร์เลือดอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด ก็สามารถยอมรับได้เช่นเดียวกัน สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่แนะนำให้เลือกใช้

1.1 การเจาะเลือดจากหลอดเลือดฝอย  
ก. อดบุหรี่ของผิวหนัง บริเวณที่จะเจาะเลือดก็มีความสำคัญ กล่าวคือถ้าอดบุหรี่ของผิวหนังเย็นหรือมี cyanosed capillaries การจะทำให้เลือดไหลออกมาอย่างอิสระนั้น กระทำได้ยาก ควรจะทำให้อุ่นเสียก่อน โดยอาจจะจุ่มนิ้วมือหรือมือทั้งโพ้เสียก่อนโดยเฉพาะในฤดูหนาวของทางภาคเหนือของประเทศไทย

\* อาจารย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์  
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ข. ความลึกของการเจาะ อุปกรณ์ที่นิยมใช้คือ Lancet ชนิดปราศจากเชื้อและใช้ครั้งเดียว (sterile prepacked disposable lancet) จะให้ความลึก 2-3 มม. การเจาะ lancet ไม่ควรนำไปฆ่าเชื้อแล้วใช้อีก เพราะอาจเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรคติดเชื้อของตับ หรือไวรัสเอดส์ เป็นต้น และอีกประการหนึ่ง ความคมของเข็มจะลดลงอีกด้วย การเจาะที่ไม่ลึก และต้องบีบเค้นให้เลือดออกมานั้นจะทำให้สัดส่วนของเซลล์และน้ำเลือดผิดปกติไปจากที่เป็นจริง

ค. การลำดับขั้นตอน การทำสเต็มเมอร์เลือดหลังจากเข็ดเลือดหยุดแรกทั้งไปแล้ว หยุดที่สองควรจะทำสเต็มเมอร์ก่อนแล้วจึงจะทำอย่างอื่น และเมื่อตะเลือดบนสไลด์แล้ว ควรรีบโกส สเต็มเมอร์ทันที มิฉะนั้น เกร็ดเลือดก็จะไปเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่ ทำให้การประมาณจำนวนเกร็ดเลือด และคุณสมบัติของการเกาะกลุ่มผิดปกติ

1.2 การเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ

ปกตินิยมเจาะ anti-cubital fossa แต่หลอดเลือดดำในส่วนอื่นๆ ของแขนก็สามารถใช้ได้ ในเด็กเล็กนิยมเจาะที่ scalp vein หรือ femoral vein การรัดแขนด้วยสายยางไม่ควรแน่นเกินไป ประมาณความดัน 60 มม. ของปรอท ถ้าใช้ที่วัดความดันของเลือดรัดแขนหรือการรัดแขนนานเกินไป จะทำให้สัดส่วนของเลือดที่เป็นเซลล์กับพลาสมาผิดปกติไป ฉะนั้นก่อนที่จะรัดแขนผู้ป่วยจำเป็นต้องตรวจสอบความพร้อมเสียก่อน ได้แก่การเตรียมเข็มเจาะเลือดเสียติดกับกระบอกฉีดยา และขวดเก็บเลือดจำนวนที่ต้องการ ชนิดของสารกันเลือดแข็ง ให้พร้อมแล้ว จึงลงมือรัดแขน และเจาะเลือดตามลำดับ

สิ่งที่ต้องระมัดระวังอย่างหนึ่งของการเจาะเลือดคือ การป้องกันเลือดแตก (hemolyse) เพราะจะทำให้ การตรวจของเม็ดเลือดแดง

(red blood cell morphology) ผิดไป ปัจจัยที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือด ได้แก่

ก. ขนาดของเข็มที่เจาะเลือด เข็มเจาะเลือด ไม่ควรเล็กเกินไป เพราะจะทำให้เมมเบรนของเม็ดเลือดแดงมีขนาดเม็ดเลือดแดงแตกได้ ตามปกติเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงสามารถทนต่อ shearing stress ได้ในขนาดที่ต่ำกว่า 4000 dynes ต่อตารางเซนติเมตร การเจาะเข็มเจาะเลือดที่ขนาดใหญ่มากเกินไป สัดส่วนของการไหลของพลาสมาต่อเซลล์ อาจผิดปกติได้ ขนาดเข็มที่แนะนำให้ใช้คือ เข็มเบอร์ 20 หรือ thin wall เบอร์ 19

ข. แอลกอฮอล์ที่ใส่ เมื่อเข็ดบริเวณผิวหนังที่จะเจาะเลือดด้วยแอลกอฮอล์แล้ว ต้องรอให้แห้งสนิทเสียก่อน มิฉะนั้นแอลกอฮอล์ อาจทำให้เม็ดเลือดแตกได้

ค. กระบอกฉีดยา (Syringe) ที่ใช้ต้องตรวจสอบเสียก่อนว่าแห้งสนิท

ง. เมื่อเจาะเลือดเสร็จเรียบร้อยแล้ว อย่าปล่อยให้เลือดออกจากกระบอกฉีดยานานเกินไป ให้ปลดเข็มออกเสียก่อน และค่อยๆ ปล่อยให้เลือดไหลช้าๆ ลงในขวดเก็บเลือด

จ. การผสมกับสารกันเลือดแข็ง ควรผสมแบบคว่ำแล้วหงายสลับกันไปอย่างช้าๆ ไม่ควรเขย่าหรือ กระทำแรงๆ และเร็วๆ จะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (Mechanical hemolysis)

2. ผลของสารกันเลือดแข็ง

EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่นิยมใช้ในการเก็บเลือดทางโลหิตวิทยา เพื่อการนับและการทำสเต็มเมอร์เลือด ไม่นิยมใช้เซปาริน เพราะมักจะทำให้เกิดปัญหาในการย้อมสี เนื่องจากเซปารินรวมตัวกับ basic dye ได้ดีมาก ทำให้สีของสเต็มเมอร์เลือดติดสีไปทางน้ำเงิน นอกจากนี้ยังทำให้เกร็ดเลือดจะจับกลุ่มกันเป็นก้อนใหญ่

ผลของ EDTA ต่อสเต็มเมอร์เลือด ขึ้นอยู่กับ

ระยะเวลาที่เลือดผสมอยู่กับสารกันเลือดแข็งก่อนทำสเมียร์และขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ EDTA ถ้าใช้ EDTA เพียง 0.44 มก. ก็เพียงพอต่อการจับ (chelate) กับ calcium ion ( $Ca^{+2}$ ) ในเลือด (whole blood) ของคนปกติ 1 มล. แต่เลือดของคนที่มีภาวะโลหิตจางปริมาณของแคลเซียมต่อเลือด 1 มล. จะสูงกว่าคนปกติ ฉะนั้น ควรใช้ EDTA ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.75 มก. ต่อเลือด 1 มล. การควบคุมคุณภาพของการใช้ EDTA ในสหราชอาณาจักรแนะนำให้ใช้  $1.5 \pm 0.25$  มก. ของ  $K_2$  EDTA ต่อเลือด 1 มล. ได้มีผู้สังเกตว่าถ้าใช้ tri-potassium salt ของ EDTA จะละลายได้ดีกว่า dipotassium salt และให้ใช้  $K_3$  EDTA 1.2 มก. ต่อเลือด 1 มล. (1)

ในการเตรียมขวดที่เก็บเลือด ที่ใส่สารกันเลือดแข็ง EDTA ถ้าตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จะเป็นก้อนใหญ่ ทำให้ละลายกับเลือดได้ช้ากว่าการทำเป็น EDTA spray กับหลอดเลือดหรือหมุนกลับไปมาตลอดเวลาตอนทำให้แห้งติดผิวแก้ว ความเข้มข้นของ EDTA ต่ำกว่า 4 มก./เลือด 1 มล. ไม่มีผลต่อการวัดฮีโมโกลบิน, การนับเม็ดเลือดขาว, การนับเม็ดเลือดแดง, การทำ Hematocrit ผลของ EDTA ต่อเลือดมีดังนี้

### 2.1 ผลต่อเกร็ดเลือด

ปกติเกร็ดเลือดจะพบมีการจับกลุ่ม (aggregation) บนสเมียร์เลือดที่ได้จากการเจาะเลือดจากหลอดเลือดฝอยบริเวณผิวหนัง ถ้าไม่มีการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดให้เห็น เป็นข้อบ่งชี้ถึงความผิดปกติของการทำงานของเกร็ดเลือด ซึ่งพบได้ในโรค Glanzmann's disease เกร็ดเลือดปกติจะมีขนาดเล็ก (1-5 ไมครอน) และมีแกรนูล และจะพบขนาดใหญ่ได้ในโรค May-Hegglin anomaly และ Bernard Soulier

(giant platelet) syndrome

เกร็ดเลือดใน EDTA blood จะบวม และใหญ่กว่าในสเมียร์เลือดที่ไม่ใส่สารกันเลือดแข็ง อีกประการหนึ่ง EDTA จะไปบดบังกันไม่ให้เกิดการจับกลุ่มกัน ฉะนั้นสเมียร์เลือดที่ใช้ EDTA จะไม่สามารถบอกได้ว่า มีความผิดปกติของการทำหน้าที่ และหรือขนาดของเกร็ดเลือดได้ หรือในบางครั้ง แต่โอกาสเกิดขึ้นได้ค่อนข้างยากมากคือ EDTA ทำให้เกร็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวจับกลุ่มกันได้ บางทีอาจทำให้เห็นเป็นก้อน clump ใหญ่บนสเมียร์เลือดได้ หรืออาจพบ clump ในขวดเลือด ถ้ามีปริมาณเกร็ดเลือด จะทำให้ได้ค่าต่ำ แต่ชนิดที่เห็นการมีชนพบได้บ่อยมาก นอกจากนั้น EDTA อาจทำให้เกร็ดเลือดเกิด satellitosis ได้ด้วย

### 2.2 ผลต่อเม็ดเลือดแดง

ขนาด, รูปร่าง และการติดสีของเม็ดเลือดแดงของสเมียร์เลือด เป็นสิ่งจำเป็นที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคทางคลินิก EDTA สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ของรูปร่างลักษณะของเม็ดเลือดแดงทำให้เห็นเป็น artifacts ได้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำสเมียร์เลือดหลังจากเก็บด้วย EDTA ภายใน 1 ชั่วโมง โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง ไม่จำเป็นที่ต้องใส่ตู้เย็น

การใช้ EDTA ปริมาณน้อยเกินไปทำให้ไม่เพียงพอต่อการจับแคลเซียมได้อย่างหมด ก็ยังสามารถทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้ แม้จะเกิดเพียงบางส่วน (partial clot) จะทำให้ผลของการทดสอบผิดพลาดไปอย่างมาก ฉะนั้นต้องตรวจสอบก่อนทุกครั้งว่าเลือดที่เก็บมี partial clot หรือไม่ ถ้ามี ก็ไม่ควรทำตัวอย่างเลือดนั้น ให้เจาะเลือดใหม่ทุกครั้ง ดีกว่าทำการทดสอบไปแล้วได้ค่าที่ไม่ถูกต้อง จำนวน EDTA ปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้รูปร่างของเม็ดเลือดแดงผิด



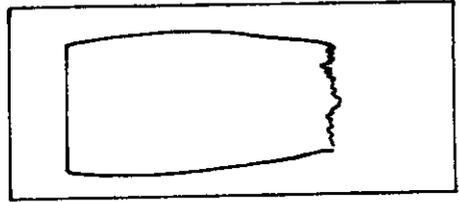
ในระยะแรกของการเปลี่ยนแปลง PMN จะ บวม และเสียคุณสมบัติของโครงสร้างภายใน interlobular bridge จะเสียไปจะเกิด vacuolation ในนิวเคลียส หรือในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ผลของ EDTA ต่อเม็ดเลือดขาวตัวอื่น เช่น mononuclear cell ก็จะทำให้เกิดเช่นเดียวกัน

3. การทำแผ่นสเมียร์เลือด

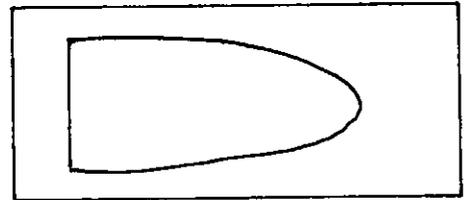
การทำแผ่นสเมียร์ทำได้ทั้งวิธี coverslip และ slide methods แต่ตามห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปนิยมทำบนแผ่นสไลด์ การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว (differential white blood cell count) ให้ถูกต้องนั้น ขึ้นอยู่กับ การกระจายของเลือด ซึ่งขึ้นอยู่กับการโรสเมียร์เป็นอย่างมาก สไลด์ที่นำมาใช้ต้องสะอาด โดยทั่วไปใช้ขนาด 25 มม. x 75 มม. (1 x 3 นิ้ว) หนา 0.8 - 1.2 มม. คนส่วนมากมักจะเข้าใจว่าสไลด์ที่ซื้อมาใหม่สะอาดดีแล้ว แต่เมื่อนำมาใช้สเมียร์เลือด จะทำให้ได้สเมียร์ที่ทำได้ยาก เพราะจะมีไขมันเกาะอยู่ จึงจำเป็นอย่าง ยิงที่จะต้องทำความสะอาดก่อนใช้ทุกครั้ง โดยแช่ใน dichromate cleaning solution นาน 12 - 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปาจนหมด คราบ และแช่ใน ethyl alcohol 95% แล้ว เช็ดให้แห้ง สำหรับสไลด์ที่เคยใช้แล้วนำมาใช้ได้ อีกเหมือนกัน โดยนำมาแช่ใน 3% lysol นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปาและต้มในน้ำผงซัก พอก เพื่อกัดสิ่งสกปรก ล้างด้วยน้ำประปาและแช่ใน ethyl alcohol แล้วเช็ดให้แห้ง ถ้าไม่สะอาด อาจแช่ใน dichromate cleaning solution อีกครั้งหนึ่งก็ได้

เลือดสำหรับทำสเมียร์ ไม่ควรเก็บไว้นาน ๕ วัน ควรรับทำสเมียร์ภายใน 1 ชั่วโมงหลัง เจาะเลือด การโรสเมียร์ไม่ควรหนาหรือบาง เกินไป ซึ่งจะต้องใช้การฝึกฝน ข้อควรคำนึงใน

การโรสเมียร์ประการหนึ่งคือปลายสุดของสเมียร์ ควรจะตรง (straight) จะทำให้เม็ดเลือด ขาวกระจายสม่ำเสมอว่าการโรสเมียร์ ที่ขอบ ปลายมน (bullet shaped)



straight-edged smear



bullet shaped smear

การทำให้ขอบปลายตรงนั้น สามารถทำได้ โดยใช้ตัวโร (spreader) ที่ขนาดความกว้าง น้อยกว่าความกว้างของสไลด์ หรือใช้ cover slip เป็นตัวโร ซึ่งข้อดีของ cover slip คือ จะให้ขอบปลายตรง และใช้โรได้ทกอันไม่ต้อง เลือกลงเหมือนสไลด์ที่มักมีขอบปลายไม่เรียบ แต่ข้อ เสียคือแฉกง่าย

การทำแผ่นฟิล์มควรยาวอย่างน้อย 2.5 ซม. และปลายสุดของฟิล์ม ห่างจากปลายขอบ สไลด์ 1 ซม. เมื่อโรเสร็จควรทำให้แห้งเร็ว ถ้าช้าจะเกิด "punched out" ได้ ไม่ควรใช้ ความร้อนช่วย เนื่องจากจะทำให้เซลล์เหี่ยว (shrink) ได้ และควรย้อมด้วยเร็ว ถ้าสไลด์ เก็บไว้นานหลายเดือน แล้วนำมาย้อมจะทำให้ตัด เป็นสีน้ำเงินได้

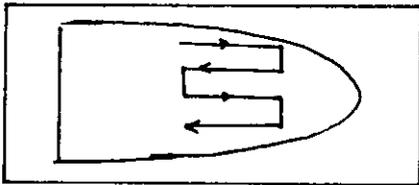
4. การย้อมสี

การย้อมสีส่วนใหญ่ นิยมย้อมแผ่นสเมียร์ด้วย Wright's stain หรือ Wright-Giemsa's

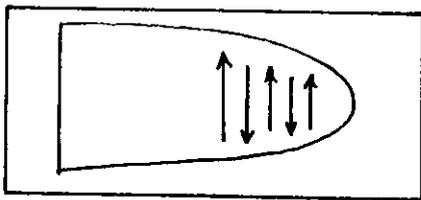
stain ซึ่งเป็นสีที่จัดอยู่ในประเภท Romanowsky dyes ซึ่งประกอบด้วย anionic dye eosin และ cationic methylene blue การเตรียมสี จะต้องเตรียมให้ได้ตามมาตรฐาน และมีการตรวจสอบก่อนนำไปใช้ เช่นเดียวกับ pH ของ buffer ก็มีความสำคัญสำหรับการย้อม เช่นเดียวกัน

5. ทิศทางของการนับ

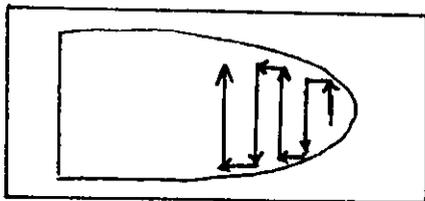
ทิศทางของการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว จากสไลด์บนแผ่นฟิล์มที่ย้อมสีดีแล้วนั้น ปกติมีทิศทางการนับอยู่ 3 แบบคือ การนับตามแนวยาว แนวขวาง และสลับกันคล้ายฟันปลา ดังรูป



ทิศทางการนับตามแนวยาว



ทิศทางการนับตามแนวขวาง



ทิศทางการนับสลับกันคล้ายฟันปลา

ทิศทางของการนับซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันคือแบบที่ 3 โดยจะเลือกทิศทางของการนับจากส่วนบางของปลายสไลด์ ตรงบริเวณที่เม็ด

เลือดเรียงตัวกันอย่างสม่ำเสมอ และทิศทางการนับสลับกันคล้ายฟันปลา ทำให้สามารถศึกษาเม็ดเลือดได้ทั่วถึง และยังเป็นการป้องกันไม่ให้เกิดเม็ดเลือดซ้ำเม็ดกันอีกด้วย

6. การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว

การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว มีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ง่าย สิ่งที่จะต้องคำนึงถึงในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ได้แก่

6.1. คน ในที่นี้หมายถึงผู้ซึ่งรับผิดชอบงานในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ซึ่งผู้ที่ทำหน้าที่นี้ อย่างน้อยที่สุดจะต้องมีความรับผิดชอบ และเห็นความสำคัญของงานที่ตนเองรับผิดชอบอยู่มากพอสมควร

6.2. ความรู้ของคน นอกจากจะต้องมีความรับผิดชอบ และเห็นความสำคัญของงานที่ตนเองรับผิดชอบอยู่นั้น ระดับความรู้ของคนก็เป็นสิ่งสำคัญมากอย่างหนึ่ง ผู้ที่รับผิดชอบในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ควรจะทราบถึงรายละเอียดของหลักฐาน, ชนิดของเม็ดเลือด ทั้งชนิดที่ปกติและผิดปกติ ถึงลักษณะที่ผิดปกติอื่นๆ ที่สามารถบอกได้ ในขณะที่ทำการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวด้วย

6.3. ความละเอียดและรอบคอบ ในที่นี้หมายรวมถึงความละเอียดรอบคอบในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวและความละเอียดรอบคอบในด้านต่างๆ เช่น หยิบสไลด์ให้ถูกต้อง, ทำตามขั้นตอนต่างๆ ให้ถูกต้อง

6.4. กล้องจุลทรรศน์ เป็นอุปกรณ์สำคัญมากที่สุด ในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ดังนั้น จึงควรดูแลเอาใจใส่รักษาทำความสะอาดให้อยู่ในสภาพที่เตรียมพร้อม สำหรับการปฏิบัติงาน ได้ตลอดเวลา และควรตรวจสอบหัวเลนส์อยู่เป็นประจำและทำความสะอาดทุกวัน

ในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวนั้น ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง และผู้ปฏิบัติการแต่ละคน

จะใช้หัวเลนส์กำลังขยาย 100x หรือ 40x ก็  
แล้วแต่ดุลยพินิจของแต่ละคน และแต่ละห้องปฏิบัติการ  
อื่นสืบเนื่องมาจากคน, ความรู้ของคน,  
ความละเอียดรอบคอบในการปฏิบัติงาน เพราะ  
ในการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว โดยใช้หัว  
เลนส์กำลังขยาย 40x ถ้าเป็นผู้ที่มีความรู้ ความ  
ชำนาญ และมีประสบการณ์มาก ก็สามารถที่จะนับ  
แยกชนิดของเม็ดเลือดขาวออกได้ด้วยกำลังขยาย  
ดังกล่าว แต่ในกรณีที่ต้องการรายละเอียดอื่น ๆ  
เช่น ความผิดปกติของเม็ดเลือดขาว และเม็ด  
เลือดแดงบางอย่าง ต้องใช้กำลังขยาย 100x  
หรือ oil immersion lens เท่านั้น ซึ่งการดู  
ด้วยกำลังขยาย 40x จะทำให้คุณภาพด้อยลงไป  
เหมาะแต่เพียงเพื่อใช้ในการดูคร่าว ๆ เท่านั้น  
และใช้กำลังขยาย 100x ทำการนับแยกชนิดของ  
เม็ดเลือดขาวต่อไป

7. การให้เกณฑ์ การอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดง

การอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดงทั้งชนิดที่  
ปกติและผิดปกติ นั้น ต้องมีเกณฑ์เพื่อเป็นมาตรฐาน  
ในการอ่านรูปร่างของเม็ดเลือดแดงให้เหมือนกัน  
ทุกห้องปฏิบัติการ ซึ่งโดยปกติแล้วหากผู้รับผิดชอบ  
มีความชำนาญหรือมีประสบการณ์ในการทำมา  
นานพอสมควร จะสามารถตรวจรูปร่างเม็ด  
เลือดแดงควบคู่กันไปด้วยกับการนับแยกชนิดของเม็ด  
เลือดขาวได้ เกณฑ์ในการอ่านรูปร่างของเม็ด  
เลือดแดงมีดังนี้

7.1 ลักษณะการติดสีของเม็ดเลือดแดง

ค่าติดสีจาง (hypochromia) กว้างกว่าปกติหรือไม่  
ซึ่งลักษณะการติดสีจาง จะสังเกตได้จากบริเวณ  
ขอบของเซลล์ ซึ่งติดสีชมพูแดงแคบลงกว่าปกติ  
โดยให้เปรียบเทียบกับ การติดสีของเม็ดเลือด  
แดงปกติในบริเวณใกล้เคียงกัน การให้เกณฑ์ของ  
hypochromia มีดังนี้

1+ hypochromia : ที่ขอบของเม็ดเลือดแดง

ติดสีลดลงไป 1 ใน 4 ของการติดสีตามปกติ  
2+ hypochromia : ที่ขอบของเม็ดเลือดแดง  
ติดสีลดลงไปครึ่งหนึ่งของการติดสีตามปกติ  
3+ hypochromia : ที่ขอบของเม็ดเลือดแดง  
ติดสีลดลงไป 3 ใน 4 ของการติดสีตามปกติ  
4+ hypochromia : ที่ขอบเม็ดเลือดแดงติดสี  
ลดลงมากจนเห็นเพียงเส้นบางๆ เรียกชื่ออีก  
อย่างว่า leptocyte

ต่อไปให้ประมาณจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ติดสี  
จางตามเกณฑ์ดังกล่าว ว่าเป็นอัตราส่วนร้อยละ  
เท่าใดของเม็ดเลือดแดงในแต่ละ field  
(population) แล้วรายงานผล ตัวอย่างเช่น  
3+ hypochromia in 20% population of  
red cell เป็นต้น

7.2 ลักษณะของรูปร่างของเม็ดเลือดแดง

เม็ดเลือดแดงปกติมีรูปร่างเป็น biconcave แต่  
หากเม็ดเลือดแดงมีรูปร่างผิดปกติเรียกว่า poi-  
kilocyte ซึ่งได้แก่ spherocyte, schis-  
tocytes, ovalocytes, elliptocytes,  
target cells, tear drop cells,  
acanthocytes, sickle cells, stoma-  
tocytes, echinocytes และ burr cells  
ถ้าตรวจพบ poikilocytes มากกว่า 5% ของ  
population ของเม็ดเลือดแดง ให้รายงาน  
รายละเอียดของแต่ละชนิดของ poikilocyte  
นั้นว่ามีชนิดละกี่ % ของ population แต่ถ้ามี  
น้อยกว่า 50% ของ population ก็ให้บอก  
เพียงแต่ว่ามี poikilocyte กี่ % เท่านั้น

เกณฑ์ของการรายงาน poikocytosis  
มีดังนี้

- 1+ poikilocytosis : มี poikilocyte  
2-6 cells/oil field
- 2+ poikilocytosis : มี poikilocyte  
7-10 cells/oil field
- 3+ poikilocytosis : มี poikilocyte

11-20 cells/oil field

4+ poikilocytosis : มี poikilocyte มากกว่า 21 cells/oil field

7.3 ขนาดของเม็ดเลือดแดง เม็ด

เลือดแดงปกติมีขนาดประมาณ 7.2 ไมครอน เม็ดเลือดแดงที่มีขนาดผิดปกติเรียกว่า anisocytosis ซึ่งอาจเป็นมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (macrocytes) ขนาดเล็กกว่าปกติ (microcyte) การรายงานให้สังเกตเม็ดเลือดแดงขนาดปกติที่ปรากฏให้เห็นเป็นหลัก

เกณฑ์ของการรายงาน anisocytosis มีดังนี้

1+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติ = 4-8 cells/oil field

2+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติ = 9-14 cells/oil field

3+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติ = 15-25 cells/oil field

2+ anisocytosis : มีเม็ดเลือดแดงขนาดผิดปกติมากกว่า 25 cells/oil field

ในบางห้องปฏิบัติการ ที่สามารถทำการนับเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่อง electronic count อาจรายงานความผิดปกติของขนาดเม็ดเลือดแดงควบคู่ไปกับค่าของ red cell indices คือ Mean corpuscular volume (MCV)

หากตรวจพบภาวะ macrocytosis คือ มีปริมาณของ macrocytes มากกว่า 50% ของเม็ดเลือดแดง ให้เพิ่มเติมรายละเอียดในการรายงาน เพื่อให้ทราบถึงขนาดที่ใหญ่ขึ้นกว่าปกติ ดังนี้

1+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV 98-105 fl

2+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV 106-111 fl

3+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV

112-120 fl

4+ macrocytosis : รายงานเมื่อ MCV มากกว่า 121 fl

ในกรณีที่ตรวจพบเม็ดเลือดแดงชนิด polychromasia หรือ polychromatophillic red cell ร่วมไปกับ macrocytes เช่นมี macrocytes 20% ของ population ด้วย ก็รายงานว่า 4+ polychromasia and 20% macrocytes

หากตรวจพบภาวะ microcytosis คือ มีปริมาณ microcytes มากกว่า 50% ของเม็ดเลือดแดง ให้เพิ่มเติมการรายงาน เพื่อให้ทราบถึงขนาดที่เล็กกว่าปกติ ดังนี้

1+ microcytosis : MCV 75-83 fl

2+ microcytosis : MCV 70-74 fl

3+ microcytosis : MCV 64-69 fl

4+ microcytosis : MCV น้อยกว่า 64 fl

ในกรณีที่พบ microcyte ส่วนใหญ่เป็น microspherocyte ให้รายงานจำนวน % ของ microspherocyte ที่พบได้เลยทันที เช่น microspherocyte 60%

7.4 Red cell inclusion ภาวะที่ภายในไซโตพลาสซึมของเม็ดเลือดแดงปรากฏสิ่งแปลกปลอม (inclusion) ให้เห็นเป็นก้อนอาจจะเป็นเย็ดหรือเป็นท่อนๆ ซึ่งสามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสียาร์ท อินาโต้แก basophilic stippling, Howell-Jolly body ซึ่งมีเกณฑ์การรายงานดังนี้

Occasional : พบโดยเฉลี่ย 1 cell/oil field หรือน้อยกว่า

moderate : พบโดยเฉลี่ย 2-4 cells /oil field

many : พบโดยเฉลี่ย 5 cells/oil field

ในกรณีที่พบ malarial pigments หรือ

Cabot's ring ไม่ว่าจะพบมากหรือน้อยเพียงไร ให้รายงานว่ามี malarial pigment หรือพบ Cabot's ring เสมอ

#### 8. บทส่งท้าย

การทำ internal quality control ของการตรวจ blood smear นี้จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการเก็บเลือด การโกลสเมียร์ การย้อมสี การดัดลักษณะรูปร่าง การนับจำนวน ฯลฯ เป็นต้นให้ถูกต้อง เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดความผิดพลาด ซึ่งเป็นการกันไว้ดีกว่าแก้ การทำ internal QC ไปด้วย preventive program นี้ จะช่วยงานการตรวจสเมียร์เลือดมีคุณภาพเพิ่มขึ้น หรือรักษาคุณภาพให้ด้อยลงไป นอกจากนั้น

เราควรจะได้มีการตรวจสไลด์ย้อนหลังดูบ้างทั้งที่ปกติและผิดปกติ ว่าที่เราเคยรายงานไปแล้วถ้ามาดูใหม่อีกครั้งหนึ่งจะเหมือนเดิมหรือไม่ หากได้ปฏิบัติด้วยความระมัดระวัง และมีจิตสำนึกเรื่องคุณภาพแล้ว คิดว่างานพัฒนาคุณภาพในทางโลหิตวิทยา จะพัฒนาขึ้นได้เป็นอย่างมาก

#### เอกสารอ้างอิง

1. Lewis SM, Coster JF. In "Quality Control in Haematology". Academic Press, 1975.
2. Cavil I. In "Method in Hematology". Quality Control, Churchill Livingstone, 1982.

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)  
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะเทคนิคการแพทย์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## ข่าวประชุมวิชาการ

### ASIAN PACIFIC CONGRESS ON BLEEDING DISORDERS AND TRANSFUSION MEDICINE

May 12 - 16, 1992, กรุงเทพฯ

ค่าลงทะเบียน	ก่อน 15 Oct, 1991	380	US\$
	หลัง 15 Oct, 1991	430	US\$

ติดต่อได้ที่

Dr.Thip Sripaisal  
Division of Pediatrics  
Hematology  
ร.พ.พระมงกุฎฯ  
กรุงเทพฯ 10400

ถาม - ตอบ

Hematocrit (Automate vs. Centrifugation)

ปัญหา :- การหาค่า hematocrit (Hct) โดยวิธีการปั่น กับวิธีใช้เครื่อง คำนวณไปด้วยกัน และในบางรายหาค่า Hct กับ red count ไม่สอดคล้องกัน

ตอบ :- การหาค่า Hct จากการนับด้วยเครื่อง และการปั่นด้วย microhematocrit centrifuge นั้น ค่าที่ได้จะไม่เท่ากัน เพราะมีหลักการวัดต่างกัน เครื่อง automate ใช้หลักการคำนวณจากสูตร  $Hct = RBC \times MCV$  โดยใช้ค่า red count และ MCV จากค่าเฉลี่ยของความสูงของ pulse (pulse height) ในขณะที่ทำการนับ red count

โดยทั่วไปวิธีปั่นด้วย microhematocrit centrifuge จะให้ค่าสูงกว่าถึง 3% เพราะมีพลาสมาแทรกอยู่ (trapped plasma) ในเม็ดเลือดแดง (red cell column)

เสนอแนะว่า ในห้องปฏิบัติการเดียวกันที่มีการทำทั้งสองวิธี ควรจะระบุในใบรายงานผลให้ชัดเจนว่าทำด้วยวิธีใด เช่น

Hematocrit (Automate) = .....%

(Centrifugation) = .....%

การหาค่า Hct นั้น กำหนดให้มี reproducibility ได้  $\pm 2\%$  การประมาณค่า hemoglobin (Hb) กับ Hct สามารถคำนวณได้จากสูตร  $Hb \times 3 = Hct \pm 2\%$

แต่ในผู้ป่วยบางราย มีค่า Hb สูง แต่ค่า Hct ต่ำ ไม่สอดคล้องกันได้ เช่น ในผู้ป่วย hemolytic anemia มี intravascular hemolysis จะพบ Hb ในพลาสมาได้

ในการทำ complete blood count (CBC) เพื่อให้ได้ค่าที่ดี ว่าจะเป็นการนับด้วย

เครื่องหรือการนับด้วยมือก็ดี สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งก็คือการผสมเลือดให้เข้ากันตลอดก่อนการทำ หากผสมเลือดไม่ดีแล้ว อาจจะทำให้ผลทั้งหมดผิดพลาดได้ ลักษณะของผลที่ผิดพลาด เป็นแบบเฉพาะราย (Individual error)

ในการนับเม็ดเลือดแดงและ Hct นั้น สามารถตรวจประมาณได้ จากสูตร  $Hct + 6 \pm 3 =$  เลขสองตัวแรกของ การนับเม็ดเลือดแดง เช่น  $Hct = 30\%$  แทนค่าได้  $30 + 6 \pm 3 = 33-39$  ดังนั้น  $Hct 30\% = 3.3 \times 10^{12} /L - 3.9 \times 10^{12}/L$  ของ RBC

หากได้ค่าไม่สอดคล้องกัน ควรทำซ้ำใหม่อีกครั้งหนึ่ง

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, วท.ม(พยาธิวิทยาคลินิก)  
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก  
คณะเทคนิคการแพทย์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การตรวจหาเชื้อมาลาเรีย

ถาม :- การตรวจหาเชื้อมาลาเรียปกติใช้ thin film และ thick film มีวิธีการใดบ้างที่เพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อมาลาเรีย

ตอบ :- ในห้องปฏิบัติการขั้นสูงทั่วไปนิยมตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยวิธี thin film หรือ thick film ที่ย้อมด้วย Wright's หรือ Giemsa's stain จากเลือดที่เจาะจากปลายนิ้วเพียงอย่างเดียวนั้น โอกาสที่จะตรวจไม่พบเชื้อเลยมีได้ค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในระยะที่เชื้อมาลาเรียปรากฏตัวในกระแสเลือดในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย

วิธีการที่จะเพิ่มความไว (sensitivity)

ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในไข่มูกนั้น อาจทำได้หลายวิธี คือ

### 1. DNA Hybridization Assay<sup>(1)</sup>

มีรายงานการวิจัย DNA probe เพื่อตรวจแยกเชื้อ *P. falciparum* โดย cloned ใน PBR322 และติดสลากรังสีด้วย <sup>32</sup>P โดยวิธี Nick translation วิธีนี้จะทำให้เพิ่มความจำเพาะ (specificity) สำหรับเชื้อ *P. falciparum* ถึง 100% โดยมีความไว 68% จะพบผลลบปลอม (false negative) เฉพาะในรายที่มีเชื้อมาลาเรียในเลือดต่ำเท่านั้น นอกจากนี้ ยังพบว่า ถ้านำเลือดผู้ป่วยมาแช่แข็งไว้ที่ -20° ซ นาน 1 ปี ผลการตรวจจะมีความไวสูงมากขึ้นเป็น 85% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจทันที หลังการเจาะเลือด กับการแช่แข็งไว้ที่ -20° ซ นาน 2 สัปดาห์ พบว่า กระบวนการแช่แข็งและทำละลาย (thawing) จะช่วยเพิ่มอัตราการตรวจพบผลบวกขึ้นอีก 21% และความไวเพิ่มขึ้นเป็น 100% การตรวจเชิงปริมาณของ autoradiographs ด้วยตา และการนับปริมาณรังสี จะมีความสัมพันธ์กับการนับจำนวนเชื้อมาลาเรีย วิธีนี้ เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ตรวจในเขตที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรียเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม เนื่องจากวิธีนี้ ใช้สารกัมมันตรังสีในการติดสลากรังสี ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้ตรวจได้ จึงมีผู้เสนอแนะให้ใช้สารอินแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งจะสามารถให้ทั้งความปลอดภัยและความจำเพาะในการตรวจยิ่งขึ้น

### 2. Quantitative buffy coat (QBC) analysis<sup>(2)</sup>

วิธีนี้ปรับปรุงโดยวิธี tube ที่ทำสำเร็จรูป เรียกว่า QBC tube เพื่อให้ได้เชื้อมาลาเรียจำนวนมาก ในบริเวณส่วนบนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และสามารถอ่านผลผ่านผนังของหลอดแก้วได้ ภายในหลอดแก้วนี้เคลือบไปด้วย potassium oxalate และสี

acridine orange เลือดที่ใส่เต็มในหลอดประมาณ 55-65 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที วิธีย้อมติดตรงที่หลังจากปั่นแล้ว เชื้อมาลาเรียจะไปรวมกันอยู่บริเวณรอยต่อระหว่าง granulocytes และชั้นของเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้ เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย จะมีความหนาแน่นน้อยกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ DNA ในตัวเชื้อมาลาเรียจะจับเอาสี acridine orange เมื่อนำไปติดด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นจุดเรืองแสงได้ชัดเจน สำหรับอุปกรณ์การตรวจนั้น บริษัทผู้ผลิต QBC tubes ได้ผลิตเครื่องปั่น Parafuge และ UV Paralens adapter ที่สามารถติดตั้งกับกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา และอุปกรณ์ทั้งสองชนิดสามารถนำไปใช้กับไมโครสโคปได้ ซึ่งสะดวกสำหรับการนำไปใช้ตรวจภาคสนามได้เป็นอย่างดี

วิธีนี้ นอกจากจะใช้เวลาสั้นกว่าวิธี blood smear ประมาณ 8 เท่า) ต่อการตรวจเชื้อมาลาเรียแล้ว หากห้องปฏิบัติการใดที่มีงบประมาณพอที่จะจัดซื้อเครื่องมือ QBC II Plus System ก็สามารถนำเอาวิธี QBC tubes มาใช้ ซึ่งจากการปั่นครั้งเดียว สามารถอ่านผลได้ถึง 8 การทดสอบคือ Hct, Hb, platelet count, WBC count, granulocyte count, % granulocyte, Lymphocyte/Monocyte count และ % Lymphocyte/Monocyte count ด้วย

### 3. Microhematocrit centrifugation technic (MCT)<sup>(3)</sup>

วิธีนี้ สามารถนำไปใช้กับห้องปฏิบัติการเล็กๆ ทำมาได้ โดยนำเลือดมาบรรจุในหลอดแก้วที่มีไมโครสโคป หลังจากปั่นที่ 25,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้ว ตัดเอาส่วนของ buffy coat และส่วนบนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น มาทำ blood smear

ย้อมด้วยสี Wright-Giemsa แล้วอ่านผลด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา พบว่ามีเม็ดเลือดแดง ที่ติดเชื้อ *P. vivax* จะพบได้เป็นส่วนมากบริเวณ ส่วนล่างของ buffy coat ส่วนเชื้อ *P. falciparum* จะกระจายอยู่ทั่วไปในส่วนของ เม็ดเลือดแดงอัดแน่น การตรวจด้วยวิธีนี้จะให้ ผลบวกของเชื้อมาลาเรียต่อ oil power field สูงกว่าวิธี blood smear ธรรมดาหาก มีผู้ป่วยมาคัดค้นหาวิธีอื่นๆ อีก เช่นวิธี Radioimmunoassay หรือ Antibody binding-inhibition assay (\*) วิธีนี้ใช้ monoclonal antibody (D5) ทำปฏิกิริยา ข้ามสาย (cross-reacting) กับเชื้อมาลาเรียชนิด *P. berghei* และ *P. falciparum* ทำได้โดยนำเม็ดเลือดแดงมา incubate กับ แอนติบอดีแล้วทดสอบ binding activity ส่วนที่เหลือใน microtiter plates ที่เคลือบ ด้วยแอนติเจน ถ้าเกิดการยับยั้งการรวมตัวของ แอนติบอดีในปริมาณมากกว่าหนึ่งเลือด negative control ซึ่งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ก็ อ่านผลได้ว่า Positive การตรวจด้วยวิธีนี้ จะ มีความไวต่ำกว่าการตรวจ blood film ด้วย กล้องจุลทรรศน์ กล่าวคือ ต้องมีเชื้อมาลาเรียใน เลือดอย่างน้อย 200 ตัว/ไมครอลิตร ถึงจะ ตรวจพบ ในขณะที่เชื้อมาลาเรียประมาณ 20-40 ตัว/ไมครอลิตร ก็สามารถตรวจพบได้ด้วยกล้อง จุลทรรศน์ธรรมดา

## เอกสารอ้างอิง

1. Holmberg M, et al. Use of DNA hybridization assay for the detection of Plasmodium falciparum in field trials. Am J Trop Med Hyg 1987; 37: 230-234.
2. Patton CL, et al. Diagnosis of malaria using quantitative buffy coat (QBC) tubes. Presented at the 3rd International Conference on Malaria and Babesiosis, Annecy, France, September, 7-11, 1987.
3. Avidor B, et al. A radioimmunoassay for the diagnosis of malaria. Am J Trop Med Hyg 1987; 37: 225-229.
4. Tumhun S, et al. Increased sensitivity to malaria detection on blood smear. Presented at the 14th Annual Scientific Meeting, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, September 24, 1990.

สนอง ไชยรัตน์, ๗๓.๒. (เทคนิคการแพทย์),

MT(ASCP)

ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**แบบฟอร์มรับเป็นสมาชิก  
วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่**

ที่ .....

วันที่ .....

ถึง บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ข้าพเจ้า ยินดีขอรับเป็นสมาชิก วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ โปรดจัดส่งวารสาร  
ถึงข้าพเจ้า ดังนี้

นาม ..... สำนักงาน .....

..... บ้านเลขที่ .....

ถนน ..... ตำบล .....

อำเภอ ..... จังหวัด .....

ข้าพเจ้า ได้ส่งเงินจำนวน ..... บาท สำหรับเป็นค่าบำรุงสมาชิก

รายปี       ตลอดชีพ      ส่งจ่ายนามหรือผู้วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ณ. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาพร้อมกับแบบฟอร์มนี้แล้ว

ลงชื่อ .....

หมายเหตุ	ค่าบำรุงสมาชิกรายปี	60 บาท
	ค่าบำรุงสมาชิกตลอดชีพ	500 บาท