วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

VOLUME 9 MAY 1976 NUMBER 2

บริษัท สยามเมดิโก ซัพพลาย จำกัด

26/3 ถนนมหาสักย์ กรุงเทพมหานคร
โทร. 35797, 37433 ต่อ 191, 192 โทรเลขย่อ: เมดิโก กรุงเทพ.

- จัดตั้งขึ้นโดย นักเทคนิคการแพทย์ เพื่อความเจริญก้าวหน้าทางด้านเทคนิคการแพทย์ โดยเฉพาะ
- มีปัญหาด้าน เครื่องมือและอุปกรณ์ ในห้องปฏิบัติการ โปรดเรียกใช้เราได้ทุกเวลา
- ส่วนหนึ่งของสินค้า ที่เราเป็นตัวแทนจำหน่าย ได้แก่ผลิตภัณฑ์จาก

Clay Adams
Division of Becton, Dickinson and Company

GELMAN INSTRUMENT COMPANY

DAMON/IEC DIVISION

SCIENTIFIC INDUSTRIES INC.

THERMOLYNE

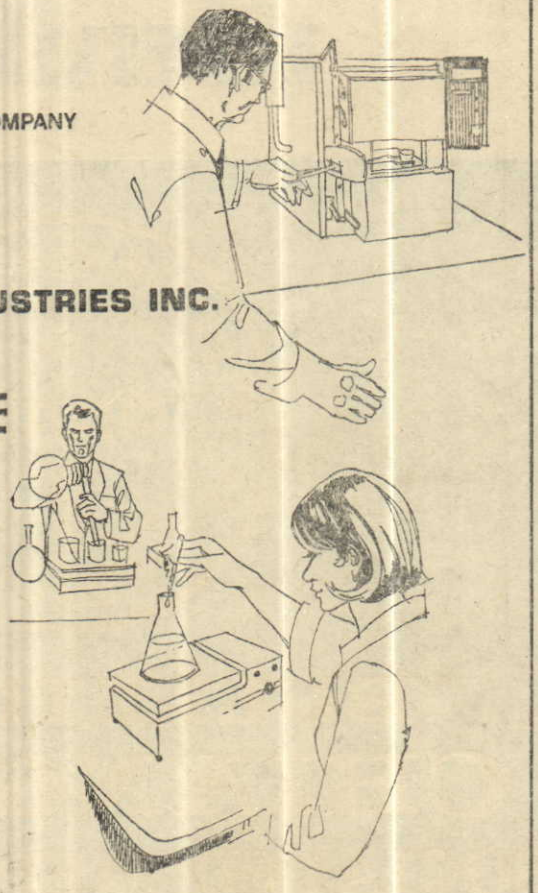
Lipshaw MANUFACTURING CORP.

The Orion ion-team.
ORION RESEARCH

SIGMA
CHEMICAL COMPANY

LAB-LINE

LAB-LINE INSTRUMENTS, Inc.
Designers and Manufacturers



For more information please contact

SIAM MEDICO SUPPLY CO.,LTD.

26/3 MAHAESAK ROAD, BANGKOK
Tel. 35797, 37433 Ext. 191, 192
Cable address: MEDICO BANGKOK

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 9 No. 2
May 1976

FERROKINETIC STUDIES IN YOUNG CHILDREN : IV
MARROW TRANSIT TIME

By

Panja Kulapongs, M.D.
Sanong Chaiyarasamee, B.Sc. (Med. Tech.), M.T. (ASCP)
Tawat Tositarat, B.Sc. (Med. Tech.)

ABSTRACT.

The marrow transit time (MTT) is the time interval required for release of 50% of the maximum radioiron uptake by erythroid marrow into circulation. The MTT value depends on the speed of erythroid maturation and/or the early release of immature red cells from bone marrow. It has been used as a parameter to indicated the erythroid marrow activity since a prolonged MTT is associated with erythroid hypoactivity and short MTT is found in conditions with erythroid hyperactivity. MTT is determined from the red cell utilization curve. The average MTT value of 3.20±0.12 days from our 5 healthy young children is comparable to 3.5 days in normal adults.

INTRODUCTION.

The relative importance of the marrow as compared to other tissue as a receptor for transferrin-iron is indicated by the rapid localization of approximately 80% of injected ^{59}Fe within the bone marrow (1). As the radioiron enters the marrow, it is incorporated into newly formed red cells, and a progressive increase in radioactivity appears in the blood as labeled red cells enter the circulation. The time required for intramedullary maturation of immature red cells is difficult to determine directly. An approximation may be reached by measuring the time needed for the release of 50% of the radioactive iron ultimately found in circulating red cells. This time, so-called marrow transit time (MTT), can be determined by constructing a red cell utilization curve then locate the time at which 50% of maximum red cell utilization has occurred(2).

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

The value of MTT in normal children has never been established. We are reporting the MTT value obtained from 5 normal healthy Thai children.

MATERIAL AND METHOD.

The format of the study was similar to those described by Huff et al (3) and Finch et al (2) as described in detail by Kulapongs et al (4,5). Briefly, approximately 0.2 mCi/Kg. body weight of ^{59}Fe as ferric citrate is incubated with 2 ml. of autologous plasma at 37°C. The ^{59}Fe labeled plasma is injected intravenously into the subject. Whole blood radioiron activity was determined in all blood samples drawn at interval during the first 24 hours, twice a day during the next 3 days and then daily until the maximal red cell radioiron activity is reached (usually 12 to 14 days). The in vivo determination of ^{59}Fe activity in various organs was carried out by frequent scanning of spleen, liver, precordium and sacrum at the time of blood drawing. For sacral counting (bone marrow activity), the probe was centered at the midpoint between the spinous process of L5 and a line between the posterior superior iliac spines. It was placed flatly against the posterior surface of the upper third of the sacrum.

CALCULATION OF MARROW TRANSIT TIME.

Marrow transit time (MTT) is derived primarily from the early portion of the radioiron utilization curve. The values of whole blood radioiron activities on day 1 through 4 are expressed as fractions (%) of the maximum radioiron utilization value at 2 weeks (FIG. I.). On the other hand, these fractions can be expressed as a percent subtracted from 100 and plotted against time (FIG. II.). The MTT value is the time interval required for release of 50% of the maximum radioiron utilization. In normal adult subjects this value is about 84 hours (3 to 4 days) (2,6,7) This figure should be compared with direct marrow (sacral) monitoring (FIG. I.). One hundred percent activity over the sacral marrow is taken as maximum counting during the first 24 hours. and zero activity over the sacrum is taken as the counting level reached at 14 days.

RESULTS.

The values for radioiron utilization during the first 4 days after radioiron injection are shown in TABLE I.. One hundred percent red cell activity is the maximum activity in red cell mass at 12 to 14 days. The calculated values of bone marrow activity are shown in TABLE II. These values derived from the radioiron utilization values in percent subtracted from 100.

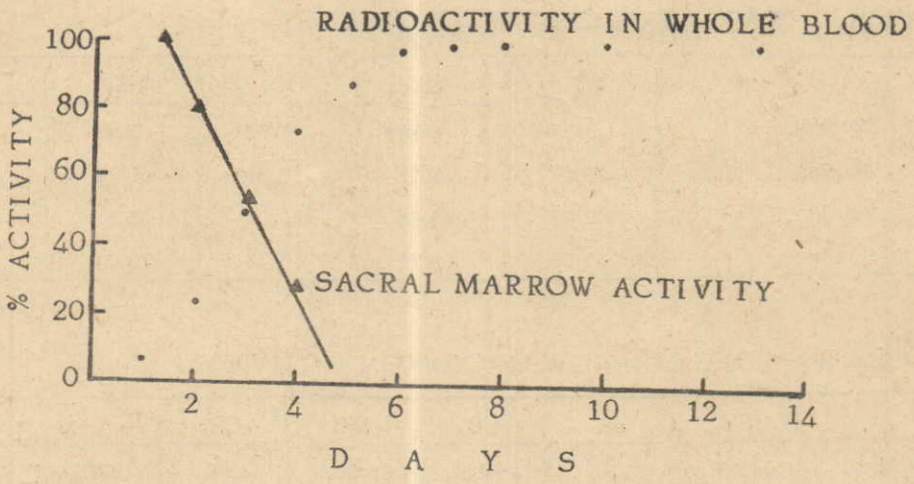


FIGURE I :

RADIOIRON EXCHANGE BETWEEN MARROW AND BLOOD.

Radioiron is injected at zero time. One hundred percent whole blood activity is the value of maximum red cell utilization (activity in red cell mass at 12 to 14 days). The maximum counting over sacrum during the first 24 hours is taken as 100 % sacral marrow activity and the counting level at 12-14 days is taken as zero activity.

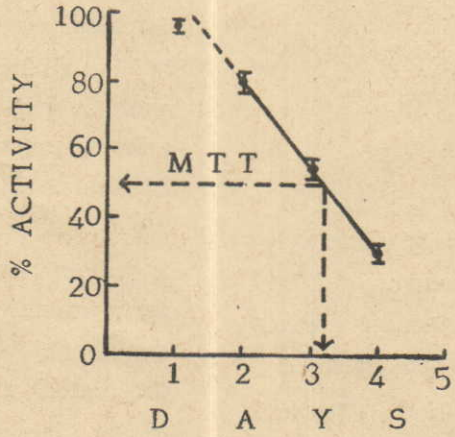


FIGURE II :

CALCULATED MARROW RADIOACTIVITY.

These values derived from the red cell utilization value (%) subtracted from 100. The arrow indicated the average MTT value of 3.2 days in our children.

TABLE I. : RADIOIRON UTILIZATION VALUES.

	ST.	JJ.	UC.	NK.	CP.
24 hrs.	5.07	1.62	1.50	3.70	5.42
48 hrs.	20.07	17.05	15.68	19.89	24.08
72 hrs.	42.77	43.55	41.94	45.56	50.03
96 hrs.	67.38	68.71	68.73	73.21	74.50

TABLE II. : BONE MARROW RADIOIRON ACTIVITY.

	ST.	JJ.	UC.	NK.	CP.	$\bar{x} \pm$ S.D.
24 hrs.	91.93	98.38	98.50	96.30	94.58	96.54 ± 1.85
48 hrs.	79.93	82.75	84.32	80.11	75.92	80.65 ± 3.24
72 hrs.	57.23	56.34	58.06	54.44	49.97	55.21 ± 3.22
96 hrs.	32.62	31.29	31.27	26.79	25.50	29.49 ± 3.14

The individual values of MTT in these children are 3.3, 3.25, 3.25. 3.20 and 3.0 days respectively with the average value of 3.20 ± 0.12 days.

COMMENTS.

When ^{59}Fe is injected intravenously in a normal subject, it is estimated that 85% of the radioactivity goes directly to the marrow while 15% goes first to iron storage areas (liver and spleen), to be released later for red cell production. Approximately 80% of this iron is incorporated into hemoglobin within one hour. The sum total of this movement of iron results in the appearance of 75 to 100% of the injected ^{59}Fe in circulating red cell within 2 weeks. The results of sacral marrow scanning indicates that the radioactivity gradually rises over the marrow, reaching a maximum in 6 to 8 hours. In our children and occasionally in adult subjects, the maximum bone marrow uptake is not reached until 24 hours. After the maximum radioactivity is reached in sacral marrow it remain there for a period of approximately 2 days, with progressive diminution of radioactivity during the next 5 to 6 days. This is due to the incorporation of the ^{59}Fe into the red cells and their release into circulation.

The marrow transit time (MTT) is best defined as the time interval

required for release of 50% of the radioiron measured in circulation at 10 to 14 days (maximum red cell utilization value). Setting the end point at 50% appearance of radioiron minimizes the effect of reflux, and blocking dose of iron have been shown to cause little change in the utilization curve (8, 9). The MTT depends on the speed of erythroid maturation and/or the early release of immature red cells from the bone marrow. A short MTT is found in conditions with erythroid hyperactivity and may be caused by early reticulocyte release because of inadequate bone marrow capacity or by a direct action of erythropoietin on the rate of erythroid maturation and bone marrow release. A prolonged MTT suggests erythroid hypoactivity. The average MTT value of 3.20 ± 0.12 days from our healthy young children is comparable to 3.5 days in the normal adults (2, 6, 7).

SUMMARY.

The marrow transit time(MTT) was determined in 5 healthy children utilizing the red cell utilization curve and occasionally confirmed with the sacral marrow monitoring. The average MTT value of 3.20 ± 0.12 days obtained is comparable to those of normal adults.

REFERENCES

1. Noyes, W.D., Hosain, F., and Finch, C.A.: Incorporation of radioiron into marrow heme. J. Lab. Clin. Med. 64:574, 1964.

2. Finch, C.A., Deubelbeiss, K., Cook, J.D., Eschbach, J.W., Harker, L.A., Funk, O.D., Marsaglia, G, Hillman, R.S., Slichter. S., Adamson, J.W., Ganzoni. A., and Giblett, E.R.: Ferrokinetics in Man. Medicine 49:17, 1970.

3. Huff, R.L., Elmlinger, P.J., Garcia, J.F., Oda, J.M., Cockrell, M.C., and Lawrence, J.H.: Ferrokinetics in normal persons and in patients having various erythropoietic disorders. J. Clin. Invest. 30:1512, 1951.

4 Kulapongs, P., Thumapukgoon, K., and Tositarat, T. : Ferrokinetic studies in young children I. Quantitation of total bone marrow cellularity in vivo by radioiron technique. Bull. C.M. Ass. Med. Sci. 8:63, 1975.

5. Kulapongs, P., Boonpala, O., and Tositarat, T.: Ferrokinetic studies in young children II. Plasma Iron Turnover studies in healthy children. Bull. C.M. Ass. Med Sci. 9:43, 1976.

6. Finch, C.A., and Coleman, D.H.: Erythropoiesis in man. Surgery 26:232, 1955.

7. Erslev, A J.: Erythrokinetics In "Hematology" edited by Williams, W.J., Beutler, E.B., Erslev, A.J. and Rundles. R.W., McGraw-Hill Book Co., USA. 1972.

8. Lockner, D.: Quantitation of erythropoiesis by a new method. I., Studies on healthy subjects. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18: 493, 1966.

9. Stohlman, F.: The use of Fe^{59} and Cr^{31} for estimating red cell production and destruction : an interpretive review. Blood 18: 236, 1961.

สมาชิกวารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ โปรดต่ออายุสมาชิกภาพด้วย
และกรุณาแจ้งให้ผู้จัดการวารสารทราบ กรณีที่ท่านย้ายที่อยู่
ขอขอบคุณในความร่วมมืออย่างดียิ่ง

วารสารเกษตรการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 9 No 2
May 1976

FERROKINETIC STUDIES IN YOUNG CHILDREN: III. RED CELL UTILIZATION, RED CELL IRON TURNOVER AND ERYTHRON TURNOVER STUDY.

By

Panja Kulapongs, M.D.*
Tawat Tositarat, B.Sc. (Med. Tech.)**
Russamee Kawvishit, B.Sc. (Med. Tech.)**

INTRODUCTION:

It is unfortunate that no single ferrokinetic procedure can be relied on to provide unequivocal information regarding the state of erythropoiesis in any given situation. As the radioiron enters the bone marrow it is incorporated into newly formed. red cells, and a progressive increase in radioactivity appears in the blood as labeled red cells enter the circulation. When radioiron is injected intravenously in a normal subject, it is estimated that 85% of the radioactivity goes directly to the marrow while 15% goes first to iron storage areas (liver and spleen), to be released later for red cell production. The sum total of this movement of iron results in the appearance of 75 to 90% of the injected radioiron in circulating red cells within 2 weeks. The average radioiron incorporation or utilization is approximately 80% in 7 to 10 days. The determination of radioiron red cell utilization has been shown to be a valuable measurement of " effective " erythropoiesis. Although it is difficult to make a quantitative estimation of red cell production from this test alone, it generally can be relied on to detect reduced red cell production in instances when the marrow morphology may be misleading.

* Department ef Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.
**Hematology Division, the Anemia and Malnutrition Research Center, Chiang Mai University.

In order to calculate the amount of iron going to the circulating red cells, it is necessary not only to determine the plasma iron turnover (PIT) but also the distribution of radioiron between red cells and other tissues at 2 weeks. A convenient measure of effective red cell production is the red cell iron turnover. It records only that fraction of iron utilize in the synthesis of viable mature red cells. Theoretically, the red cell iron turnover rate should be a more accurate quantitative measurement of effective erythropoiesis than the PIT rate. A calculation of red cell iron turnover rate (RCITR) or erythrocyte iron turnover (EIT) was also devised by Huff et al. [1]. Here, the plasma iron turnover (PIT) was divided into a red cell portion (erythron turnover) and non-red cell portion (non-erythron turnover) according to the amount of radioiron present in the red cell mass at 10 to 14 days. It is possible to assess the erythron turnover by subtract from the PIT, the non-erythron turnover which can be computed from the plasma iron level, plasmatocrit, and a constant (0.0035) (2-3). The erythron turnover value has been claimed to be a highly quantitative measurement of the number of nucleated red cells in the marrow and their hemoglobin synthesizing capacity [3]

We are presenting our results of the detail study of the red cell utilization, red cell iron turnover and erythron turnover in healthy Thai children in Chiang Mai area.

MATERIAL AND METHOD.

The format of the study was similar to those described by Huff et al.[1] and Finch et al[2] as reported in detail by Kulapongs et al.[4,5]. Five healthy young children, 1.5 to 4 years of age, were studied.

CALCULATIONS.

C.P., a 4 year old Thai girl weighed 8.74 Kg. with a hemoglobin level of 12.5 gm/100 ml, hematocrit 38%. plasma iron level of 121 mcg/100 ml with TIBC 330 mcg/100 ml. and the plasma iron turnover PIT value of 0.98 mg/100 ml whole blood/day, 5.91 mg/day or 0.676 mg/Kg/day is used as an example.

I. BLOOD VOLUME AND RED CELL MASS.

$$\text{Blood volume} = \frac{\text{Plasma volume} \times 100}{100 - \text{corrected Hct}}$$

$$= \frac{402 \times 100}{100 - (38 \times 0.96 \times 0.91)} = 602 \text{ ml.}$$

Red cell mass = Blood volume - Plasma volume

= 602 − 402 = 200 ml. or 22. 88 ml/Kg.

II. TOTAL RED CELL IRON.

$$\text{Total red cell iron} = \text{Blood volume (ml)} \times \frac{\text{Hb(gm/100ml)}}{100} \times 3.4$$

$$= 602 \times \frac{12.5}{100} \times 3.4$$

= 255.85 mg total or 29.27 mg/Kg.

Here, 3.4 is the amount of iron (mg) in 1 gm. of hemoglobin.

III. RED CELL UTILIZATION. (RBCU)

The red cell utilization of radioiron expressed as a percent of the injected activity is simply calculated by comparing the highest blood activity (between 10-14 days) with the zero time activity. This calculation is dependent on the accurate determination of the blood activity constant blood volume and the adopted value of the mean body hematocrit (0.91).

$$\text{RBCU} = \frac{\text{14 days activity/ml blood}}{\text{Total injected activity}} \times \text{Blood volume} \times 100$$

$$= \frac{2{,}311 \times 602}{1{,}767{,}589} \times 100 = 78.70\ \%.$$

IV. RED CELL IRON TURNOVER RATE (RCITR) OF ERYTHROCYTE IRON TURNOVER (EIT)

Red cell iron turnover indicates fraction of iron utilized by bone marrow erythroid cells for hemoglobin synthesis.

$$\text{RCITR} = \text{PIT} \times \text{maximal red cell utilization}$$

$$= 1{\cdot}32 \times \frac{78.70}{100}$$

= 1.039 mg/100 ml blood/day.

$$\text{or RCITR} = 7{\cdot}96 \times \frac{78.70}{100}$$

= 6.265 mg/day

or = 0.717 mg/Kg/day.

TABLE 1 : RED CELL UTILIZATION, RED CELL IRON TURNOVER AND ERYTHRON TURNOVER IN HEALTHY CHILDREN.

	S.T.	J.J.	U.C.	N.K.	C.P.	$\bar{x} \pm$ S.D.	ADULT VALUES (2,3,6,)
AGE (yr.)	2.0	1.5	1.5	1.75	4.0		
BODY WEIGH (Kg)	11.24	7.26	6.88	11.20	8.74		
Hb. (gm/100 ml)	12.70	12.30	11.40	12.40	12.50	12.26 ± 0.50	
Hct. (%)	39	35	36	35.5	38	36.70 ± 1.72	
PLASMA IRON (mcg/100 ml)	172	114	189.5	88	121	136.90 ± 42.33	
TIBC (mcg/100 ml)	321	292.5	337.5	286.5	330	313.50 ± 22.77	
BLOOD VOLUME (ml)	771	575	535	836	602		
RED CELL MASS: (ml.)	263	176	168	259	200		
: (ml/Kg)	23 4	24.2	24.4	23.1	22 88	23.59 ± 0.67	
TOTAL RED CELL IRON (mg)	332.92	240.47	207.37	352.46	255.85	277.81 ± 62.15	
RED CELL UTILIZATION (%)	80.54	92.98	90.93	73.31	78.70	83.29 ± 8.37	80 (74 - 86)
PLASMA IRON TURNOVER RATE							
: mg/100 ml blood/day	1.49	1.14	1.73	0.95	1.32	1.32 ± 0.30	0.70 (0.58 - 0.85)
: mg/day	11.47	6.58	9.25	7.98	7.96	8.64 ± 1.84	
RED CELL IRON TURNOVER							
: mg/100 ml blood/day	1.20	1.06	1.57	0.70	1.04	1.11 ± 0.30	0.56 (0.3 - 0.7)
: mg/day	9.238	6.118	8.411	5.850	6.265	7.176 ± 1.54	29 (20 - 39)
: mg/Kg/day	0.822	0.843	1.223	0.522	0.717	0.825 ± 0.255	0.52 (0.43 - 0.72)
RBC IRON RENEWED (%/ day)	2.78	2.54	4.06	1.66	2.45	2.69 ± 0.87	1.3 (0.9 - 1.8)
NONERYTHRON TURNOVER (mg/100 ml blood/day)	0.397	0.277	0.455	0.213	0.283	0.325 ± 0.095	0.15 ± 0.001
ERYTHRON TURNOVER (mg/100 ml blood/day)	1.093	0.863	1.275	0.737	1.037	1.001 ± 0.207	0.60 ± 0.02

V. PERCENT RBC IRON RENEWED PER DAY.

The amount of iron utilized by bone marrow erythroid cells for hemoglobin synthesis can be expressed as fraction of total red call iron as follow:

$$\text{RBC Iron renewed} = \frac{\text{RCITR (mg/day)}}{\text{Total RBC iron (mg)}} \times 100$$

$$= \frac{6.265 \times 100}{255.85} = 2.45\ \%\ \text{per day.}$$

VI. ERYTHRON TURNOVER.

The erythron turnover value is calculated by subtracting the non-erythron turnover from the plasma iron turnover.

$$\text{ET} = \text{PIT} - \text{plasma iron (mcg/ml)} \times \text{Plasmacrit} \times 0.0035$$

$$= 1.23 - \left(\frac{121}{100} \times (100-33.19) \right) \times 0.0035$$

$$= 1.32 - 0.283$$

$$= 1.037 \text{ mg iron/100 ml. Blood/day.}$$

RESULTS.

Results of the study in 5 healthy children is tabulated in Table I.

COMMENTS.

The utilization curve portrays the appearance of radioiron in the circulating red cell mass. In normal adult subjects [2,7] and our normal children, about 80% of injected iron is found in the circulating blood at 14 days. Usually there is a delay of approximately 1.7 days and then an exponential release of radioiron from the marrow with a T $\frac{1}{2}$ of about 1.8 days. Since the radioiron is fixed within a few hours within the erythroid marrow as hemoglobin, the lag phase represents the time required for labeled cells to mature and released into the circulation. Because the normal red cell utilization of radioactive iron may be as high as 90%, a further increase has little significance. A decrease utilization, however, is an important finding and suggests that mature red cell are destroyed shortly after their release from the bone marrow (hemolysis), that immature red cells are destroyed in the bone marrow before their release to the circulation (ineffective erythropoiesis), or that serum iron, because of slow bone marrow uptake, is diverted to non-erythropoietic tissues (bone marrow hypoplasia). Severe peripheral hemolysis can be recognized from the shape of RBCU curve which

displays an early rise (shortened marrow transit time), an early maximum utilization, and a subsequent fall-off (FIG.III). Ineffective erythropoiesis is characterized by a shortened radioactive iron disappearance rate and bone marrow hypoplasia by a prolonged radioactive iron disappearance rate. In ineffective erythropoiesis most of the radioactive is never seen in the circulating red cell mass. One of the most direct way to examine the meaning of the utilization curve is to determine the uptake distribution of radiation among the erythroid cells of the bone marrow and to derive from other parameter of erythropoiesis the time required for these labeled cells to appear in the circulating blood.

Calculation of erythrocyte iron turnover (EIT) or red cell iron turnover rate (RCITR) is the product of plasma iron turnover (PIT) x red cell utilization (RBCU) and is, therefore, influenced by the manner of calculation of each. In addition to the correction factor for trapped plasma volume, another fixed correction factor for the mean body hematocrit is involved. The former is invalid in patients with hypochromic and/or abnormal shape red cell, while the latter correction factor can not be used in splenomegaly. In any patient whose mean body hematocrit may be altered, such as in splenomegaly, it is necessary to determine red cell mass separately with the ^{51}Cr-tagged red cell technique. In "ineffective" erythropoiesis and in "hemolytic anemias" the RCITR value underestimates effective erythropoiesis(3). In these conditions red cell utilization is depressed for 2 different reasons: (1) in hemolytic anemias the continuous turnover of radioiron through the erythron-reticuloendothelial circuit results in a uniform specific activity of its iron and utilization will be depressed proportionate to the radioiron held in the erythroid marrow and RE cells, and(2) in "ineffective" erythropoiesis, the utilization curve has not yet reached an equilibration state at 2 weeks, since most of the radioiron is still cycling between erythroid marrow and RE cells. While the RCITR value can not be considered to have quantitative meaning in patients with hemolytic anemia or ineffective erythropoiesis, it can be used as a rough indication of the efficiency of erythropoiesis.

A convenient and more precise index of effective red cell production is the erythron iron turnover since

it records only that fraction of iron utilized in the synthesis of viable mature red cells. Theoretically both the RCITR and erythron iron turnover rate should be the more accurate quantitative measurements of effective erythropoiesis than the PIT rate. But these tests are also dependent upon the measurement of plasma disappearance rate and PIT and hence are limited by the errors inherent in those determinations. At any rate, the erythron turnover value has been found to be a highly quantitative measurement of the number of nucleated red cells in the marrow and their hemoglobin synthesizing capacity(3)

Results of our study indicated the higher iron turnover rate in young children than adult subjects, confirmed the results obtained from the plasma radioiron turnover study.

SUMMARY.

Detailed study of the kinetic of the injected radioactive iron ($_{3}^{59}Fe$) in the body is carried out in 5 healthy young children. The results of red cell utilization study indicated that 83.29 ± 8.37% of injected radioiron is taken up by the hemopoietic and storage tissues and later incorporated into the hemoglobin of circulating red cell mass. Theoretically the effectiveness of bone marrow erythropoiesis can be more accurately estimated by the determination of red cell iron turnover rate (RCITR) or erythrocyte iron turnover (EIT.) From the present study it was found that the average RCITR in our children is 1.11 ± 0.30 mg/100 ml whole blood/24 hour or 0.825 ± 0.255 mg/Kg body weight/24 hour which slightly higher than those of the adult subject. The more important parameter is the erythron turnover rate which has been found to be a highly quantitative measurement of the number of erythroid precursor and their hemoglobin synthesizing capacity. The erythron turnover rate in our children is 1.001 ± 0.207 mg/100 ml. whole blood/24 hour which is also higher than the adult value. Results of the study indicated that in normal situation iron turnover is higher in young children and that those observed in diseased children should be compared with these values rather than the adult's values in literature.

ย่อเรื่อง

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับรายละเอียดด้าน Kinetic ของ Radioactive Iron (^{59}Fe) ที่ฉีดเข้าไปในร่างกายของเด็กไทยที่มีสุขภาพสมบูรณ์จำนวน 5 คน ผลที่ได้จาก Red cell Utilization แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ Radioiron ที่ฉีดเข้าไปจำนวน 83.29 ± 8.37% จะถูกจับโดย Hemopoietic และ Storage Tissues ซึ่งต่อมาจะเข้าไปรวมตัวกับ Hemoglobin ของเม็ดเลือดแดงในวงจรโลหิต

ตามทฤษฎีนั้นชี้ความสามารถของ Bone Marrow Erythropoiesis จะวัดได้อย่างแม่นยำด้วยการตรวจหา Red Cell Turnover Rate (RCITR) หรือ Erythrocyte Iron Turnover (EIT) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่าเฉลี่ย RCITR ในเด็ก คือ 1.11 ± 0.30 mg/100 ml/ Whole blood/24 ชั่วโมง หรือ 0.825 ± 0.255 mg/Kg น้ำหนักตัว/24 ชั่วโมง ซึ่งจะสูงกว่าค่าที่ได้ในผู้ใหญ่เล็กน้อย

เครื่องชี้บ่งที่สำคัญอีกอันก็คือ Erythron Turnover Rate ซึ่งพบว่าเป็นปริมาณที่สามารถวัดได้ของจำนวน Erythroid Precursor และความสามารถที่จะสังเคราะห์ Hemoglobin ได้ ซึ่งมีปริมาณ Erythron Turnover Rate ที่ตรวจได้ในเด็กครั้งนี้คือ 1.001 ± 0.207 mg/100 ml Whole blood/24 ชั่วโมง ซึ่งก็สูงกว่าค่าที่ได้จากผู้ใหญ่ด้วย

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงช่วยชี้ให้เห็นว่าในภาวะปกติ Iron Turnover ในเด็กจะมีค่าสูงกว่าผู้ใหญ่ อย่างไรก็ตามก็น่าที่จะได้ศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ในเด็กผู้ป่วย เพื่อที่จะได้นำค่ามาเปรียบเทียบกับค่าเด็กปกติมากกว่าที่จะนำไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้ในผู้ใหญ่

REFERENCES

1. Huff, R.L., Elmlinger, P.J., Garcia, J.F., Oda, J.M., Cockrell, M.C., and Lowrence, J.H: Ferrokinetics in normal persons and in patients having various erythropoietic disorders. J. Clin. Invest. 30: 1512, 1951.
2. Finch, C.A., Deubelbeiss, K., Cook, J.D., Eschbach, J.W., Harker. L.A., Funk, D.D, Marsaglia, G., Hillman R.S., Slichter, S., Adamson; J.W., Ganzoni, A., and Giblett, E.R.: Ferrokinetics in man. Medicine 49: 17,1970.
3. Cook, J.D., Marsaglia, G., Eschbach, J.W., Funk, D.D., and Finch, C.A.: Ferrokinetics: a biological model for plasma iron exchange in man. J. Clin. Invest. 49: 197,1970.

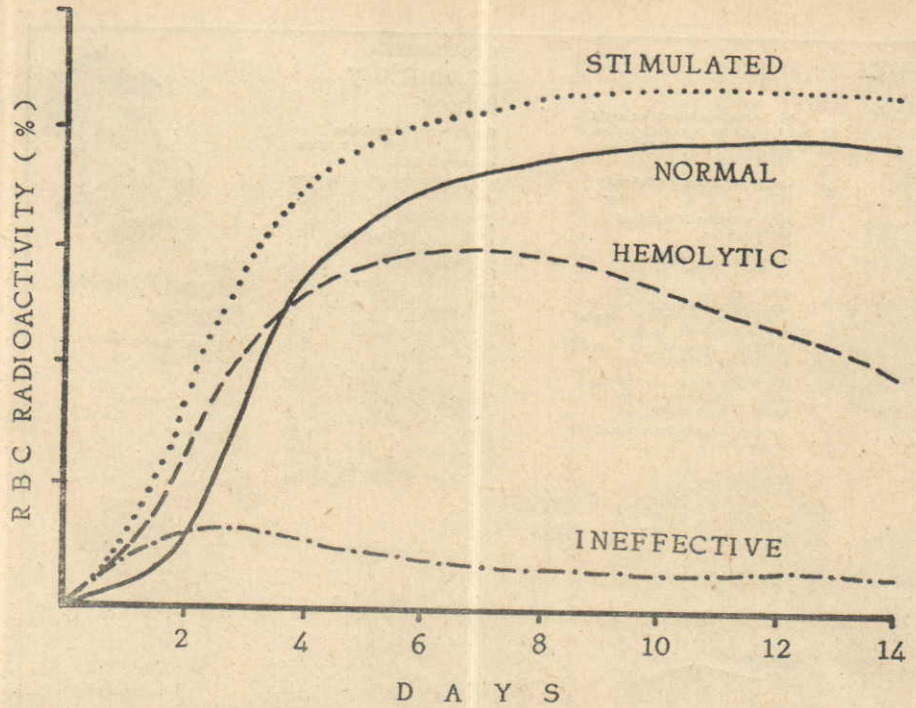


FIGURE III. RED CELL UTILIZATION CURVE :

In normal person a maximum utilization is reached in 2 weeks. With increased stimulation of the marrow, the appearance of radioiron in red cell is accelerated. In hemolytic anemias the curve displays an early rise, early maximum utilization and a subsequent early fall-off within 2-weeks. Ineffective erythropoiesis is characterized by a flat curve since most of the radioactivity is never seen in the circulating red cell mass.

4. Kulapongs, P., Thumapukgoon, K., and Tositarat, T.: Ferrokinetic studies in young children : I. Quantitation of total bone marrow cellularity in vivo by radioiron technique. Bull. C.M. Assoc. Med. Sci. 8: 63, 1975.

5. Kulapongs, P., Boonpala, O., and Tositarat, T.: Ferrokinetic studies in young children : II. Plasma iron turnover studies in healthy children. Bull. C.M. Assoc. Med. Sci. 9: 43,1976.

6. Figueroa, W.G., and Weinstein, I.M.: Erythropoietic measurements with radioiron. In Mechanism of Anemia. Weinstein, I.M., and Beutler. E., Eds. The McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1962.

7. Hosain, F., Marsaglia, G., and Finch, C.A.: Blood ferrokinetics in normal man. J. Clin. Invest. 46: 1, 1967.

AUTOCRIT Centrifuge

High speed centrifugation, rapid braking 3 minute centrifugation cycle—stops automatically in 90 seconds

Hematocrit values read directly in head

Accommodates 24 standard capillary tubes

Fast, accurate, simple reading technique

Avoids specimen mix up or loss. Entire procedure from specimen collection to reading is performed without removing tubes from the clearly numbered slots in the Carrying Tray

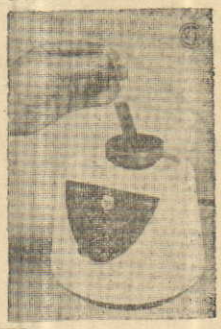
Attached magnifier for optional use provides for convenient, more accurate reading

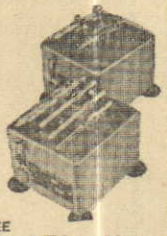
Safe, quiet, will not creep, cool in operation

CYCLO-MIXER

Laboratory Mixer

For use in all laboratories wherever quick mixing in tubes or flasks is indicated





YANKEE

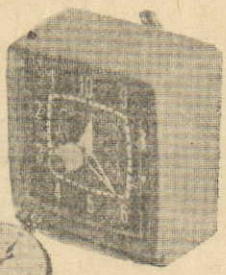
Blood Pipette Shaker

Motor operated controlled rocking motion gives a fast homogeneous mixture in 30 seconds, as required in performing accurate reproducible blood counts

Adjustable timer

Interchangeable 2 & 6 unit heads

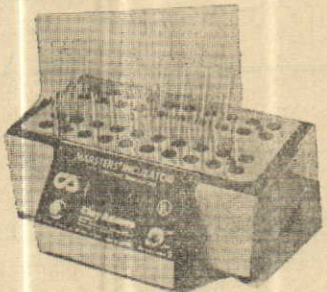
All pipettes receive identical shaking on either size head



Interval Timers

MARSTERS

Incubator



For use in Blood Banks, and Hematology Laboratories, for 37°C Incubation in cross matching, blood typing, serum antibody screening, Coombs test and prothrombin time determinations.

ADAMS

Physicians Compact Centrifuge

4-Place Angle Head for 15 ml. heavy duty tubes with adapters for 5 ml. or smaller tubes

Fixed speed of 3400 RPM (1315 RCF) fully loaded

Tubes concealed inside head and housing

Tube slots in head numbered for positive identification

Oilite motor bearings

Shock mounted on three rubber suction feet

YANKEE

Rotators

SERO-FUGE Centrifuge

Specifically designed for Blood Grouping, Typing and Cross-Matching

Tubes filled, centrifuged, transported, incubated and emptied while in head

High speed—3400 RPM (1000 RCF)

Interchangeable 6 and 12 place heads

Tube positions are numbered for easy identification

See-thru shockproof plastic cover

Shock mounted on 4 rubber feet

ADAMS

Laboratory Counters

Blood counting less tedious

Speeds up counting and classifying

Reduces possibility of errors

Calculations done automatically

Clay Adams

For more information please contact

SIAM MEDICO SUPPLY CO.,LTD.

26/3 MAHAESAK ROAD. BANGKOK

Tel. 35797, 37433 Ext. 191, 192

Cable address: MEDICO BANGKOK.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

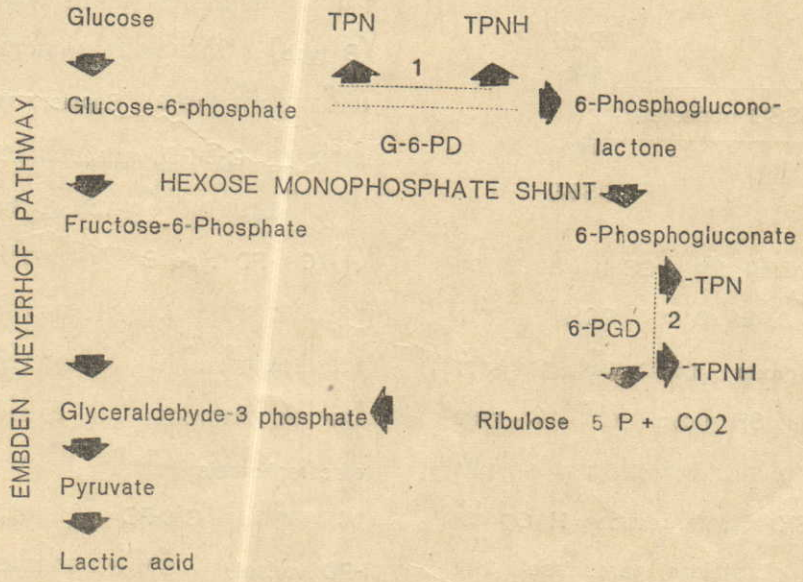
Vol. 9 No. 2
May 1976

G-6-PD AND NEONATAL JAUNDICE

วิไลวรรณ จันทร์พ่วง, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
สุรพร มาตระกูล, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)*
ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, พ.บ.**

บทนำ

Glucose-6-Phosphate dehydrogenase (G-6-PD) เป็น enzyme ประเภท oxido-reductase ตัวหนึ่งของขบวนการ Glycolysis ใน hexose monophosphate shunt โดยเป็น catalyst ของปฏิกริยาการเปลี่ยน Glucose-6-Phosphate ไปเป็น 6-phospho-gluconolactone จากปฏิกริยาที่จุดนี้จะได้ reduced Triphosphonucleotide (TPNH) ตัวหนึ่ง TPNH อีกตัวหนึ่งจะได้จากจุดที่ 2 ซึ่งมี 6-PGD เป็น enzyme ดังรูป

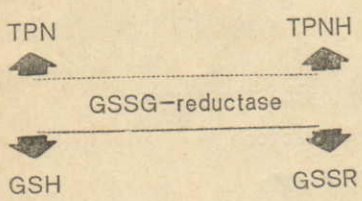


*ภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
**ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

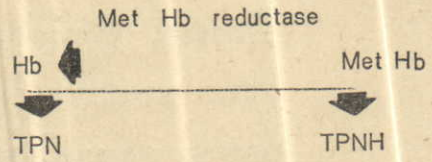
เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้วไม่มี nucleus และ metabolism ของมันมีเพียง glucose เป็นตัวให้พลังงานนั้น glycolysis metabolism แบ่งเป็น 2 สายคือ anaerobic หรือ monoxidative หรือ Embden Meyerhof pathway ซึ่งให้พลังงานในรูป ATP และ DPNH

ส่วนสาย Hexose monophosphate shunt นั้น พลังงานได้มาในรูปของ TPNH.

ดังนั้นจึงเห็นว่า G-6-PD เป็น enzyme สำคัญที่จะทำให้มี TPNH เกิดขึ้นเพื่อใช้ใน reduction ของ glutathione (GSSG) ให้เป็น reduced glutathione (GSH) ซึ่งสารนี้มีความสำคัญมาก ในการรักษาความแข็งแรงของผนังเม็ดเลือดแดง.



Mechanism ของ GSH ในการช่วยป้องกันผนังเม็ดเลือดแดงคือ GSH จะช่วยรักษา SH group ของผนังเม็ดเลือดแดงไว้ ถ้ามีการสูญเสีย SH group จะทำให้ผนังของเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลงเสื่อมสภาพ ไปทำให้แตกง่าย GSH จะช่วย reduce H_2O_2 ให้เป็นน้ำโดยมี glutathione peroxidase ช่วยทำให้ Hemoglobin และ Protein ไม่ต้องถูก oxidize โดย hydrogen peroxide นอกจากนี้ TPNH ยังไป reduce methemoglobin ให้เป็น Hemoglobin.



glucose-6-phosphate dehydrogenase เป็น enzyme ที่ประกอบด้วย peptide 2 เส้น ปลาย N ของเส้นหนึ่งเป็น tyrosine และอีกปลายหนึ่งเป็น alanine

G-6-PD ในคน ที่รู้จักกันแพร่หลายมี 2 แบบคือแบบอาฟริกัน (A type) มักพบแต่ในประชากรนิโกรหรือผู้ที่มีเชื้อสายนิโกรเท่านั้น อีกแบบหนึ่งคือแบบเมดิเตอร์เรเนียน (B type) พบส่วนมากในคนผิวขาวและทางเอเชีย ในปี 1973 Supalert et al ได้สำรวจพบ G-6-PD variant ในผู้ชายไทยทางภาคเหนือพบว่าปกติเป็นแบบ B type (B^+)

(1) G-6-PD type B ถ้ามีความผิดปกติจะรุนแรงกว่าแบบ A พบครั้งแรกตามชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน มีลักษณะโครงสร้างในโมเลกุลต่างจากแบบ A และมีความเร็วใน electrophoresis ช้ากว่า ต่อมามีการศึกษามากเข้าก็พบ G-6-PD อีกหลายแบบ (G-6-PD variant) ซึ่งมีโครงสร้างและคุณสมบัติต่างกันออกไป เท่าที่ตรวจพบในเวลานี้มีมาก

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

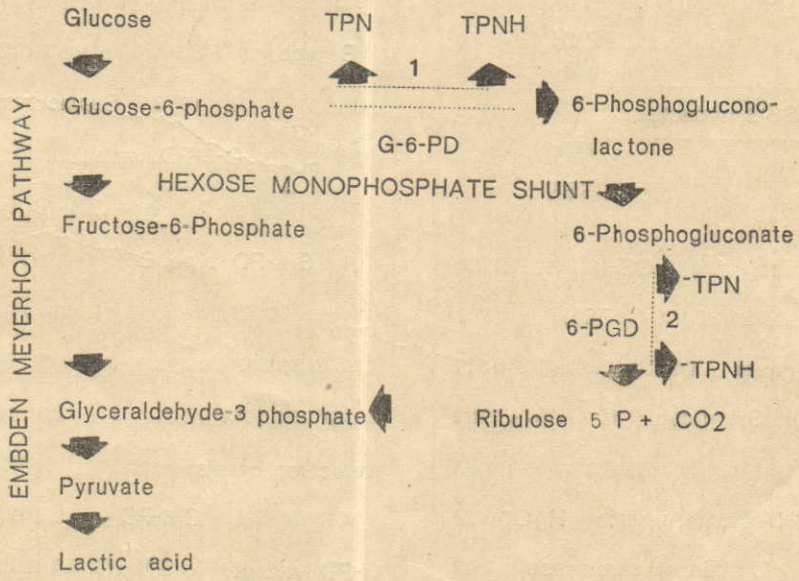
Vol. 9 No. 2
May 1976

G-6-PD AND NEONATAL JAUNDICE

วิไลวรรณ จันทร์พ่วง, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
สุรพร มาตระกูล, วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)*
ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี, พ.บ.**

บทนำ

Glucose-6-Phosphate dehydrogenase (G-6-PD) เป็น enzyme ประเภท oxido-reductase ตัวหนึ่งของขบวนการ Glycolysis ใน hexose monophosphate shunt โดยเป็น catalyst ของปฏิกริยาการเปลี่ยน Glucose-6-Phosphate ไปเป็น 6-phospho-gluconolactone จากปฏิกริยาที่จุดนี้จะได้ reduced Triphosphonucleotide (TPNH) ตัวหนึ่ง TPNH อีกตัวหนึ่งจะได้จากจุดที่ 2 ซึ่งมี 6-PGD เป็น enzyme ดังรูป

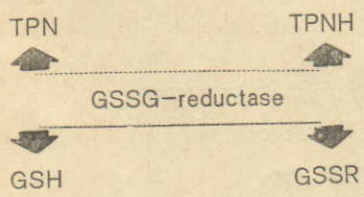


*ภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
**ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

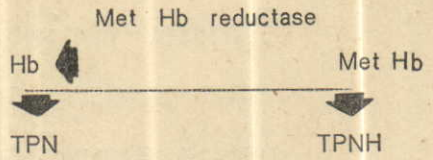
เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่เจริญเต็มที่แล้วไม่มี nucleus และ metabolism ของมันมีเพียง glucose เป็นตัวให้พลังงานนั้น glycolysis metabolism แบ่งเป็น 2 สายคือ anaerobic หรือ monoxidative หรือ Embden Meyerhof pathway ซึ่งให้พลังงานในรูป ATP และ DPNH

ส่วนสาย Hexose monophosphate shunt นั้น พลังงานได้มาในรูปของ TPNH.

ดังนั้นจึงเห็นว่า G-6-PD เป็น enzyme สำคัญที่จะทำให้มี TPNH เกิดขึ้นเพื่อใช้ใน reduction ของ glutathione (GSSG) ให้เป็น reduced glutathione (GSH) ซึ่งสารนี้มีความสำคัญมาก ในการรักษาความแข็งแรงของผนังเม็ดเลือดแดง.



Mechanism ของ GSH ในการช่วยป้องกันผนังเม็ดเลือดแดงคือ GSH จะช่วยรักษา SH group ของผนังเม็ดเลือดแดงไว้ ถ้ามีการสูญเสีย SH group จะทำให้ผนังของเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลงเสื่อมสภาพไปทำให้แตกง่าย GSH จะช่วย reduce H_2O_2 ให้เป็นน้ำโดยมี glutathione peroxidase ช่วยทำให้ Hemoglobin และ Protein ไม่ต้องถูก oxidize โดย hydrogen peroxide นอกจากนี้ TPNH ยังไป reduce methemoglobin ให้เป็น Hemoglobin.



glucose-6-phosphate dehydrogenase เป็น enzyme ที่ประกอบด้วย peptide 2 เส้น ปลาย N ของเส้นหนึ่งเป็น tyrosine และอีกปลายหนึ่งเป็น alanine

G-6-PD ในคน ที่รู้จักกันแพร่หลายมี 2 แบบคือแบบอาฟริกัน (A type) มักพบแต่ในประชากรนิโกรหรือผู้ที่มีเชื้อสายนิโกรเท่านั้น อีกแบบหนึ่งคือแบบเมดิเตอร์เรเนียน (B type) พบส่วนมากในคนผิวขาวและทางเอเชีย ในปี 1973 Supalert et al ได้สำรวจพบ G-6-PD variant ในผู้ชายไทยทางภาคเหนือพบว่าปกติเป็นแบบ B type (B^+)

(1) G-6-PD type B ถ้ามีความผิดปกติจะรุนแรงกว่าแบบ A พบครั้งแรกตามชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน มีลักษณะโครงสร้างในโมเลกุลต่างจากแบบ A และมีความเร็วใน electrophoresis ช้ากว่า ต่อมามีการศึกษามากเข้าก็พบ G-6-PD อีกหลายแบบ (G-6-PD variant) ซึ่งมีโครงสร้างและคุณสมบัติต่างกันออกไป เท่าที่ตรวจพบในเวลานี้มีมาก

กว่า 70 ชนิด (2) และคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปี 1969 Talalak et al ได้พบ G-6-PD แบบใหม่ในเด็กชายไทยและให้ชื่อว่า G-6-PD Bangkok (3) ในผู้ที่แสดงภาวะบกพร่อง G-6-PD บางรายงานพบว่าการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของ G-6-PD เหมือนกับแบบ A และ B จึงเรียกว่าเป็น A^-และ B^- ในปี 1973 มีรายงานว่า G-6-PD deficiency ที่พบในภาคเหนือของไทยเป็นแบบ B^- 4 % (1)

อาการผิดปกติขั้นรุนแรงมักจะไม่แสดงออกใน G-6-PD deficiency สำหรับภาวะ hemolytic anemia นั้นในเวลาปกติอาจไม่เกิด แต่จะแสดงให้เห็นชัดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาเหตุหลายอย่าง เช่น รับประทานยาที่ใช้รักษามาเลเรีย เช่น Primaquine, ยาอื่น ๆ บางชนิด โดยเฉพาะพวกที่เป็นสารอ๊อกซิไดซ์, ถั่วปากอ้า (vicia faba) หรือจากการติดเชื้ออย่างรุนแรงจาก bacteria และ virus เป็นต้น.

พวกที่มีอาการรุนแรงมากที่สุดคือพวกที่ขาด enzyme G-6-PD แล้วมี hemolysis ตลอดเวลาโดยไม่ต้องสัมผัสสารเคมีใด ๆ ได้แก่โรคที่เรียกว่า hereditary nonspherocytic hemolytic anemia ซึ่งพบใน enzyme G-6-PD Oklahoma I และ Chicago I. (2)

ระดับของ enzyme G-6-PD ในเม็ดเลือดแดงอาจเปลี่ยนแปลงไป พบว่าเม็ดเลือดแดงที่สร้างใหม่มีระดับ G-6-PD สูงกว่าในเม็ดเลือดแดงที่มีอายุมาก นอกจากนั้นยังพบว่าในเด็กแรกเกิดจะมีระดับของ G-6-PD สูงกว่าในผู้ใหญ่ปกติ(4) G-6-PD นอกจากจะพบในเม็ดเลือดแดงแล้วยังพบในเม็ดเลือดขาว, platelet, tissue, แก้วตาของตา, ผิวหนัง, น้ำลาย, ตับ, ไต, adrena gland และในน้ำนม แต่จากรายงานปรากฏว่าผู้ที่ขาด G-6-PD ที่เป็นนิโกรระดับของ G-6-PD ในเม็ดเลือดขาวปกติ และมีรายงานว่า ระดับ enzyme ในเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยนั้นไม่สัมพันธ์กัน

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่า ความบกพร่องของ G-6-PD พบประมาณ 100 ล้านคนในโลก (4) ในปี 1970 Flatz et al ได้สำรวจ G-6-PD deficiency ในภาคเหนือของไทยโดยวิธี dye Elution method พบว่ามี 12.5% (5) ในปี 1973 Sanpitak et al ได้สำรวจ G-6-PD deficiency ในภาคเหนือของไทย 1,107 ราย พบมี G-6-PD deficiency 117 ราย (10.6 %) ที่น่าสนใจคือจำนวนผู้ที่มาบริจาคเลือด 165 ราย พบมี G-6-PD deficiency ถึง 26 ราย (15.8 %)(6)

ความบกพร่องของ G-6-PD เป็นภาวะผิดปกติที่ถ่ายทอดได้ทางกรรมพันธุ์ และ gene ที่ควบคุม G-6-PD นี้อยู่บน X-chromosome ฉะนั้น ในผู้ชายซึ่งมี X-chromosome เพียงตัวเดียว เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้น (hemizygote)

จะมีการแสดงออกอย่างเต็มที่ (fully expressed) ส่วนในผู้หญิงต้องมี X-chromosome ผิดปกติทั้ง 2 ตัว (homozygote) จึงมีการแสดงออกอย่างเต็มที่เหมือนในผู้ชาย หรือ อาจ แสดง ออกเป็นบางส่วน (partial expressed) เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับ X-chromosome เพียงตัวเดียว (heterozygote).

เรื่องของ G–6–PD deicency ได้มีคนสนใจว่าจะเป็นสาเหตุในการทำ ให้เกิด ภาวะ ตัวเหลือง (jaundice) ในเด็กคลอดใหม่หรือไม่ เพราะทั้ง neonatal jaundice และ G-6-PD deficiency พบว่ามีอุบัติการสูงเหมือน ๆ กัน ในปี 1969 Phornphatkul[7] พบว่าในเด็กไทยที่มี G-6-PD deficiency 25 คน มี Severe jaundice 16 คน (64%) อย่างไรก็ตามการตรวจ G-6-PD ในเด็กตัวเหลืองก็ยังมีประโยชน์ในการวินิจฉัย แยกจาก สาเหตุ อื่น ซึ่ง ทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดง

การศึกษาครั้งนี้ นอกจากจะตรวจ G-6-PD ในเด็กตัวเหลืองเปรียบเทียบกับเด็กปกติแล้วยังได้ เปรียบเทียบผลการตรวจโดยวิธี Screening ธรรมดาและ Electrophoresis ของ enzyme ตัวนี้ด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาดูว่า G-6-PD deficiency อาจ เป็น สา เหตุ ใน การ ทำ ให้เกิดตัวเหลือง (Severe jaundice) ในเด็กคลอดใหม่ จึงได้ทำการตรวจหา G-6-PD ในเด็กคลอดใหม่ในโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ เพื่อเป็นการช่วยในการศึกษาถึงสาเหตุของ Severe Jaundice ว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องอยู่กับการขาด enzyme G-6-PD บ้างหรือไม่.

วัตถุและวิธีการ

เลือดที่ใช้เจาะจากเด็กคลอด ใหม่ อายุ ไม่เกิน 20 วัน ทั้งเด็กปกติและตัวเหลืองและ Specimen อีกส่วนหนึ่งเก็บจากสายสะดือของเด็กคลอด ใหม่ แล้ว ตาม สืบ ประวัติ ว่า เด็ก เกิดภาวะตัวเหลืองหรือไม่ภายใน 10 วัน การเก็บเลือดใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งนำไปทำการตรวจ G-6-PD โดย 2 วิธีคือ Methylene blue reduction test และ G-6-PD electrophoresis

1. Methylene blue reduction test

REAGENTS- Sodium Nitrite– Glucose solution ชั่ง 1.25 gm ของ $NaNO_2$ ละลายใน 5% Glucose 100 ml.

–Methylene blue solution ชั่ง 0.015 gm Methylene blue ในน้ำ 100 ml.

วิธีทำ จัด tube 3 tube

tube แรกใส่เลือด 200 ul $NaNO_2$ Solution 10 ul.

tube 2 เหมือน tube แรกแต่เติม Methylene blue 10 ul.

tube 3 ใส่เลือด 200 ul อย่างเดียว

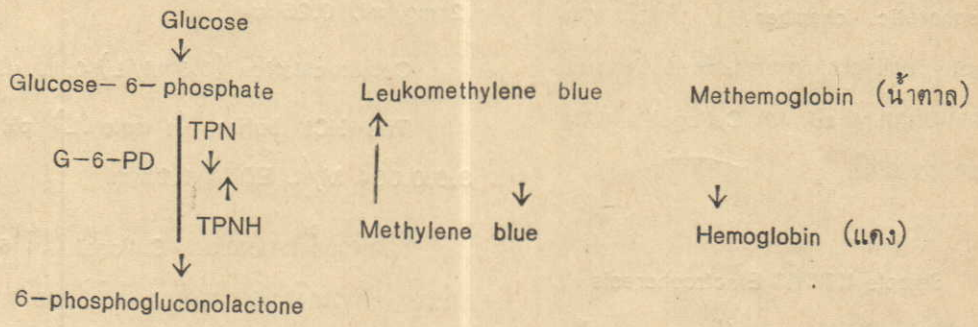
นำ tube ทั้ง 3 มา mix แล้ว incubate 37°C นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบชั่วโมงที่ 3 mix เลือดอีกครั้งหนึ่งแล้วละลาย 50 ul ลงในน้ำกลั่น 5 ml ทั้ง 3 tube

การดูผลสังเกตสีของ tube ที่ 2 ในน้ำกลั่นดังนี้

ถ้าสีน้ำตาล เหมือน tube 1 เป็น Complete deficiency

ถ้าสีแดงเหมือน tube 3 เป็น Normal

ถ้าเป็นสีแดงน้ำตาล เป็น partial deficiency ปฏิกิริยาเป็นดังนี้



2. G-6-PD Electrophoresis

นำเลือดส่วนหนึ่งมาทำ hemolysate เพื่อตรวจ G-6-PD โดย Electrophoresis

วิธีทำ Hemolysate

ใช้เลือดประมาณ 500 ul นำมาล้างด้วยNSS 4 ครั้งเมื่อดูดครั้งสุดท้ายออกแล้วใช้ capillary pipette ดูดเอาเลือดที่อยู่ส่วนล่างมาใส่ใน tube ใหม่ (ที่ต้องนำเอาส่วนล่าง tube เพื่อป้องกันไม่ให้มี WBC ปนมาด้วยอาจทำให้ผลที่ออกมาไม่แน่นอนเพราะใน WBC ก็มี Enzyme G-6-PD) จากนั้นนำไป freeze and thaw เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกนำไปปั่นที่ 2000 g นาน 6 นาที ดูดน้ำ hemolysate ข้างบนมา run Electrophoresis ใช้ Cellulose acetate gel etectrophoresis โดยวิธีของ Ratazzi [8]

REAGENT. BRIDGE BUFFER เตรียมโดย250 ml of 0.075 M citric acid ผสมกับ 1000 ml of 0.75 M Tris HCl (0.004 M EDTA รวมด้วย) นำมาปรับ pH ให้ได้ 7.5

การเตรียมแผ่น Cellulose acetate gel

นำแผ่น Cellogel ของ Chemetron–Milano ซึ่งแช่อยู่ใน 50% Methanol ออกมา

ซับกระดาษกรองแช่ Cellogel ใน bridge buffer ประมาณ 1 ช.ม. โดยเปลี่ยน buffer อย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี Methanol เหลืออยู่ หลังจากนี้ซับอีกครั้งพอหมาด แล้ววางแผ่น Cellogel ลงบนแผงวางของเครื่องให้ด้านหยาบขึ้นอยู่ข้างบน ถ้าวางเรียบร้อย Cellogel จะตึงพอดี และมีชายห้อย 2 ข้างจุ่มอยู่ใน bridge buffer ซึ่งใส่ไว้ใน electrophoretic chamber ปรับให้แผ่น Cellogel อยู่ในสภาพพอเหมาะโดยใช้กระแสไฟฟ้าผ่านขนาด 4 mA ต่อ Cellogel 1 แผ่น เป็นเวลา 10 นาที.

การใส่ Sample และทำ Electrophoresis

หลังจากปรับสภาพแล้ว ปิดกระแสไฟฟ้า ใส่ hemolysate ประมาณ 0.1 ul ลงบนแผ่น Celiogl 1 แผ่นใส่ Sample ได้ 3 Sample ปล่อยให้ Cellogel ดูดซับเลือดไว้ประมาณ 1 นาที จึงปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านในขนาด 4 mA ต่อ 1 แผ่น เป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

การย้อมสี เพื่อดูแถบของ G-6-PD

สีที่ใช้ย้อมประกอบด้วย

Glucose-6-phosphate (G-6-P) (25 mg/ml) 0.15 ml

NADP (10 mg/ml) 0.01 ml

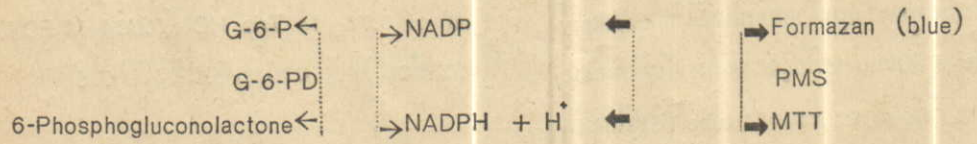
MTT tetrazolium (2 mg/ml) 0.25 ml

Phenozine methosulfate (PMS) (2 mg/ml) 0.25 ml

Cobalt chloride (0.5 M/L) 0.10 ml

Tris–HCl buffer (1 mole/L) pH 8.6,0.004 M/L EDTA 1.25 ml

สีจำนวนนี้จะพอย้อม Cellogel ได้ 6 แผ่น การเตรียมสีควรเตรียมทันทีก่อนย้อม หลังจากเตรียมเสร็จแล้วปิดกระแสไฟฟ้า ตัด Cellogel ออกจากแผงวางคว่ำด้านบนลงในสีย้อมที่เตรียมไว้ประมาณ 5 วินาที ซับเอาส่วนเกินออก นำไปใส่ภาชนะที่ชื้นด้วย buffer และอบที่ 37°C ประมาณ 5 นาที จะเห็นแถบสีน้ำเงินของ G-6-PD ในกรณีที่ activity สูง อาจเห็นได้ทันที ปฏิกริยาการเกิดสีเป็นดังนี้



นอกจากจะย้อมเพื่อดูสีของ formazan ที่เกิดขึ้นแล้วยังได้ดู NADPH ที่เกิดขึ้นได้ด้วย UV light การเกิดสีหรือเกิดแถบที่เรืองแสงกับ UV light แสดงถึงการมี enzyme-G-6-PD

อยู่ สำหรับการตรวจ G-6-PD โดยวิธี electrophoresis นี้ยังได้เก็บ Specimen อีกบางส่วนจากเลือดที่ส่งตรวจ bilirubin ของเด็ก Nursery เลือดนี้เจาะจากส้นเท้าของเด็ก โดยใช้ heparinize Capillary tube นำไปล้างเม็ดเลือดและทำ hemolysate แบบเดียวกันกับที่กล่าวมาแล้ว.

ผล

ในการศึกษาครั้งนี้ทำในเด็ก 220 คน ผู้ชาย 108 คน ผู้หญิง 112 คนพบว่ามี G-6-PD deficiency แบบ Complete 44 คน หรือ 20% (ผู้หญิง 17 คน ผู้ชาย 27 คน) และแบบ Partial deficiency 29 คน หรือ 13.18% (ผู้ชาย 6 คน ผู้หญิง 23 คน) รายละเอียดได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 1.

ในเด็กที่มี G-6-PD deficiency (partial และ complete) 73 คน เป็น Severe Jaundice 11 คน (15.06%) ในเด็ก normal 147 คนเป็น Severe jaundice 16 คน (10.88%) จากตารางที่ 2 และ 3 ได้แสดงการเปรียบเทียบผลของ G-6-PD ในเด็กปกติ และเด็กที่มี Severe Jaundice จากการตรวจเด็กที่มี Severe Jaundice 27 คน พบ complete deficiency 5 คน (18.51%) partial deficiency 6 คน (22.22%) เด็กปกติ 138 คน พบ Complete deficiency 26 คน (18.84%) และ partial deficiency 16 คน (11.59%)

จากการนำเอา indirect bilirubin ของเด็กที่ตัวเหลืองมาหาค่า mean และ standard Deviation (SD) ได้ดังนี้ เด็ก normal ผู้ชาย mean = 13.05 SD = 4.55 Complete deficiency ผู้ชาย mean = 13.70 SD = 3.72 partial deficiency ผู้หญิง mean = 14.17 SD = 1.65 normal ผู้หญิง mean = 12.75 SD = 4.73 Complete deficiency ผู้หญิง mean = 12.23 SD = 2.46 partial deficiency ผู้หญิง mean = 15.43 SD = 3.42 (หน่วยเป็น mg%)

จากการศึกษาเกี่ยวกับ enzyme G-6-PD โดยใช้ Electrophoresis จำนวน 138 ราย ปรากฏว่าเป็นแบบช้า 5 รายและเร็ว 1 ราย

ตารางที่ 1 แสดง G-6-PD ในเด็กที่ตรวจทั้งหมด

เพศ	จำนวนผู้ถูกตรวจ	Complete deficiency		Partial deficiency	
		คน	%	คน	%
ผู้ชาย	108	27	25	6	5.56
ผู้หญิง	112	17	15.17	23	20.53
รวม	220	44	20	29	13.18

ตารางที่ 2 แสดง G-6-PD ในเด็กที่มี hyperbilirubinemia (indirect bilirubin) มากกว่า 15 mg%

เพศ	จำนวนผู้ถูกตรวจ	Complete deficiency		Partial deficiency	
		คน	%	คน	%
ผู้ชาย	14	5	35.71	1	7.14
ผู้หญิง	13	0	0	5	38.46
รวม	27	5	18 51	6	22.22

ตารางที่ 3 แสดง G-6-PD ในเด็กที่มี bilirubin ปกติ

เพศ	จำนวนผู้ถูกตรวจ	Complete deficiency		Partial deficiency	
		คน	%	คน	%
ผู้ชาย	70	14	20	4	5.71
ผู้หญิง	68	12	17.64	12	17.64
รวม	138	26	18.84	16	11.59

วิจารณ์ผล

ในการหา enzyme G-6-PD ใน cord blood และเลือกจาก newborn จำนวน 220 คน เป็นผู้ชาย 108 คน และผู้หญิง 112 คน พบว่ามี G-6-PD deficiency แบบ Complete ใน 44 คน หรือ 20% โดยเป็นผู้หญิง 17 คน (15.17 %) และผู้ชาย 27 คน (25%) เป็นแบบ partial deficiency 29 คน หรือ 13.18% โดยเป็นผู้ชาย 6 คน ผู้หญิง 23 คน ผลที่ได้จะเห็นว่า G-6-PD deficiency ในเด็กเกิดใหม่ในจังหวัดเชียงใหม่ค่อนข้างสูง หรืออาจนับได้ว่า อุบัติการของ G-6-PD deficiency มีแนวโน้มที่จะสูงขึ้น เพราะได้เคยมีผู้ทำการทดลองในผู้ใหญ่จาก blood donor พบสูงถึง 15.8% แต่การตรวจในเด็กคลอดใหม่คราวนี้พบสูงถึง 20% ความบกพร่องของ G-6-PD เป็นภาวะผิดปกติทางกรรมพันธุ์โดย gene ที่ควบคุม G-6-PD นี้อยู่บน X-chromosome ฉะนั้นในผู้ชายซึ่งมี X-chromosome เพียงตัวเดียว เมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้น (hemizygote) จะมีการแสดงออกอย่างเต็มที่ แต่การทดลองครั้งนี้พบ partial deficiency ในเด็กผู้ชาย 6 คน อาจเป็นเพราะว่าในเด็กผู้ชายเหล่านี้มีภาวะบกพร่องจริงแต่มี young red cell มาก ทั้งนี้เนื่องจากใน young red cell จะมี enzyme G-6-PD สูงกว่าใน red cell ที่แก่กว่า ในปี 1964 Sansoone et al[9] ได้ทำการหา G-6-PD enzyme โดยวิธี Methylene blue

reduction test และวิธี Cyanmethemoglobin elution test พบว่าใน male G-6-PD เป็นแบบ partial deficiency เขาจึงได้วัด activity ปรากฏว่ามี enzyme เป็น 20% ของ normal เมื่อเขาศึกษาต่อไปพบว่าในผู้ชายพวกนี้มี young red cell สูงหรืออาจเป็นเพราะ G-6-PD ของเขาเกิด mutation ใน molecule ทำให้บางส่วนเสีย activity ไปจึงออกมาในรูปของ partial deficiency.

จากการตรวจทั้ง 2 วิธี ปรากฏว่าให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เกือบทั้งหมดจะเป็นไปในทำนองเดียวกัน กล่าวคือ blood sample ที่มี activity สูงนั้นเมื่อนำมาตรวจด้วย electrophoresis แล้วย้อมสีจะเห็นเข้มในทันทีและเรืองแสงชัดมาก ส่วนในคนที่ตรวจพบ G-6-PD deficiency จากวิธี Methylene blue reduction test ก็ไม่ปรากฏสี และเรืองแสงให้เห็นหรือไม่ก็ติดสีจาง ๆ เมื่อตั้งทิ้งไว้ มีเลือดบาง specimen ที่พบว่าย้อมสีติดแต่ไม่เรืองแสงกับ UV light นั้น ได้ทำการทดลองโดยวิธี electrophoresis ใหม่ แต่ solution ที่ใช้ย้อมสีตัด MTT และ PMS ออกเพื่อไม่ให้ develop สีปรากฏว่าเห็นเรืองแสงได้ทั้งนี้อธิบายได้ว่า NADPH ที่เกิดขึ้นนั้นมีน้อย จึงถูกใช้หมดในการเปลี่ยน MTT เป็น Formazan จึงจัดไว้ในพวก partial deficiency

การตรวจพบ G-6-PD ที่มีอัตราการวิ่งช้า และเร็วไม่กี่รายนั้น ยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัดว่าจะเป็น variant ใหม่อย่างไรหรือไม่จำเป็นต้องทำการศึกษาค้นคว้าต่อไปถึงคุณสมบัติอย่างอื่นอีก

สรุปผล

1. จากการตรวจเด็กทั้งหมด 220 ราย พบ G-6-PD Complete deficiency 44 ราย และ partial deficiency 29 ราย คิดเป็น 20 และ 13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ.

2. เด็กที่มีภาวะ Severe Jaundice เมื่อเปรียบเทียบกับเด็กปกติ พบว่ามีอัตราการขาด enzyme G-6-PD ที่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ กล่าวคือเด็ก Severe Jaundice 27 คน มีภาวะบกพร่องของ G-6 PD 40.74% ในขณะที่เด็กปกติจำนวน 138 คน พบว่ามีภาวะบกพร่องถึง 30.43%

3. เด็กที่ขาดหรือไม่ขาด enzyme G-6-PD ก็ตาม มีโอกาสเป็น Severe Jaundice ได้ไม่ต่างกันชัดเจน เด็ก G-6-PD dificiency 73 คน มี Severe Jaundice 15.60% และเด็กที่มี enzyme ปกติก็พบว่าเกิด Severe Jaundice ถึง 10.88% เด็ก 2 กลุ่มนี้ที่เกิดภาวะ Severe Jaundice ก็ปรากฏว่ามีความรุนแรงเท่า ๆ กันจากการหาค่าเฉลี่ยของระดับ indirect bilirubin.

ABSTRACT :

Capillary blood of the newborn infants as well as cord blood specimens in Chiang Mai Hospital were used for the evaluation of the incidence of G-6-PD deficiency and the babies were observed for the presence of jaundice within the first ten days of life. Both Methylene blue reduction test and Electrophoresis using for the detection of G-6-PD giving the comparable results. Among 220 male and female newborns, 44 cases (20%) revealed complete deficiency and 29 of them (13%) were partial deficiency.

In 73 neonates with G-6-PD deficiency, only 11 neonates developing severe jaundice while 15 out of 143 normal G-6-PD neonates developed. This difference was found to have statistically no significance. The newborns both with severe jaundice (indirect bilirubin more than 15 mg%) and normal seem to have the same rate of G-6-PD deficiency. Among the babies those developed jaundice have no difference in average indirect bilirubin level whether they are enzyme deficiency, partial deficiency, or normal in both male and female.

According to these results we can not conclude that G-6-PD deficiency is the most important cause of severe jaundice in neonates in Chiang Mai Hospital.

ย่อเรื่อง

ผู้รายงานได้ทำการทดลองตรวจ G-6-PD ในเด็กแรกเกิด และจาก cord blood ในโรงพยาบาลนครเชียงใหม่ โดยใช้วิธี Mehtylene blue reduction test และ Electrophoresis เพื่อเปรียบเทียบกับ การเกิดภาวะตัวเหลืองจัดภายใน 10 วันหลังคลอด จากการตรวจทั้งหมด 220 ราย พบ complete deficiency 44 ราย และ partial deficiency อีก 29 ราย ในหมู่เด็กที่มีการพร่องของ G-6-PD 73 รายนี้เกิด severe jaundice (ระดับของ Indirect bilirubin มากกว่า 15 mg%) 11 ราย (15.06%) ในขณะที่เด็กปกติ 147 ราย พบว่าเกิด severe jaundice 16 ราย(10.88%) เด็กคลอดใหม่ทั้งที่เกิดและไม่เกิด severe Jaundice พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการพร่อง G-6-PD เท่าๆกัน คือ เด็กตัวเหลือง พบ complete deficiency 18.5% และ partial deficiency 22.22% และเด็ก normal พบ complete deficiency

18.54% partial deficiency 11.59% ทั้งค่าเฉลี่ยระดับของ indirect bilirubin ที่วัดได้ในเด็กที่เกิด Jaundice ก็ไม่แตกต่างกันในระหว่างพวกที่ปกติและที่ขาด enzyme G-6-PD จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ ในทางสถิติสรุปไม่ได้ว่าเด็กที่ขาด G-6-PD enzyme จะเป็นสาเหตุสำคัญ ที่จะทำให้เกิดภาวะตัวเหลืองจัดในเด็กแรกเกิด

REFERENCES

1. Supalert, y., et al, Cellulose acetate gel Electrophoresis of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase., Chiang Mai Medical Bulletin 12:19, 1973
2. Akira Yoshida, A., et al, Human Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Variants : Bulletin of W.H.O. 45.243 1971
3. Talalak, P And Bevtler E., G-6-PD Bangkok : A New Variant Found in Congenital non-spherocytic Hemolytic Diseases., Blood 33:77, 1969
4. NA-Nakon, S.; Glucose-6-phosphate dehydrogenase Deficiency Haematology p 273, 1970
5. Flatz G and Tantachamroon T., Glucose 6-phosphate Dehydrogenase in the Population of Northern Thailand. Human genetik 10:335 1970
6. Sanpitak, N., et al: A Survey of Erythrocytes Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency In Northern Thailand, Chiangmai Medical Bulletin 12:11,1973
7. Phornphutkul, C., et al: Severe Hyperbilirubinemia in Thai Newborn in Association with Erythrocyte G-6-PD Deficiency: Clinical Pediatrics 8:275, 1969
8. Ratazzi et al: Electrophoresis of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase a new technique. Nature 213:79, 1967
9. Sansoone, G. Rasore-Quartino, A, Veneziano, G. Pathologica, 55;371, 1963.
10. YUE,P: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Neonatal Jaundice in Chinese Male Infants in Hong Kong, Lancet 350:13,1965.
11. Doxiadis, S.A.: Risk of Severe Jaundice in Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency of The Newborn Lanxcet. 1210:5, 1964
12. Fessas, Ph, Doxiadis, S.A., Valaes, T., Brit. Med. 1359:11, 1962.

ปัจจุบันนี้ ความยุ่งยากในการตรวจเลือดไม่เป็นปัญหาอีกต่อไป ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทุกระดับ สามารถตรวจได้โดย วิธีง่าย สะดวก และรวดเร็ว

PRODUCT	TEST	SPECIMEN	TIME	CALIBRATION CURVE	N-RANGE
Acc Uric	Uric Acid	Serum 0.2 ml	20 min.	Linear to 15mg%	M3.7-7 6 mg% F 2.9-6.8 mg%
Albustrate	Albumin	Serum 0·01 ml	3 min.	linear	M3.5-4 7 gm% F 3 8-4.9 gm%
Bilistrate (Total)	T-Bilirubin	Serum 0.2 ml	7 min.	linear to20mg%	0-1.5 mg%
Bilistrate (Direct)	D-Bilirubin	Serum 0.2 ml	7 min	Same curve as T-Bilirubin	0-0.5 mg%
BUNStrate	BUN	Serum 0.01 ml	25 min.	linear	10-20 mg%
Dy-Amyl-L	Amylase	Serum 0.2 ml	15 min.	linear	30-170 S U. (Somogyi Unit)
Glucostrate	Glucose	Serum 0.02 ml Plasma0.02 ml	15 min.	linear	60-110 mg%
Lac-Dehystrate	LDH	Serum 0.2 ml	10 min	linear	24-78 I.U.
Phosphastrate	Alk. Phos.	Serum 0.1 ml.	25 min.	linear	Adult = 9-35 I U.
Alkaline				(Infant =	40 90 I.U.
Phosphastrate Acid	Acid. Phos.	Serum 0.2 ml	35 min	linear	0-2.0 I.U.
Trans Ac.	SGOT.	Serum 0.2 ml	35 min.	Smooth Curve	9-36 I U.

Note: I.U. = Internatianal Unit. (Micromole of Substrate/litre of serum/minute)

QUALITY CONROL ในห้องปฏิบัติการทุกชนิด

★ Clinical Chemistry ★ Coagulation Test ★ Urinalysis (Urine Control)
★ Blood Gas Control

เพื่อเป็นหลักประกันในการทำงานให้มีประสิทธิภาพเป็นที่เชื่อถือได้

PREGNANCY TEST (QUICK TEST)

Sensitive มากเพราะเป็น Direct Method ตรวจได้ทั้ง Serum และ Urine ไม่มี False Positive เพราะมี Negative Control (ของ Urine) ไม่ต้องกรอง และป็นเมื่อใช้มี Disposable pipet และ Slide ให้ครบตามจำนวน Test ทำง่าย ใครก็ทำได้

ราคาเป็นเรื่องสำคัญ แต่คุณภาพสำคัญกว่า คุณมีสิทธิเลือกได้ดังใจ เลือกให้ดีที่สุด เพื่อความมั่นใจของคุณเอง **Warner-Lambert** เสนอราคาที่คุณพอใจ และให้คุณภาพที่คุณเชื่อถือได้

Warner - Lambert (Thailand) Ltd.

415 สุขุมวิท สำโรงเหนือ จ. สมุทรปราการ

โทร. 933162-3, 931142, 932286

วารสารกลุ่มวิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences

Vol. 9 No. 2
May 1976

FOLIC ACID ANTAGONISTS (THE DIHYDROFOLATE REDUCTASE INHIBITORS): APPLICATION OF TETRAZOLIUM BIOAUTOGRAPHY ON DETERMINATION OF SERUM AND URINE METHOTREXATE

by

*Kwanchai Ratanasthien Ph.D.

SUMMARY.

The inhibition effects of methotrexate upon the growth of microorganisms used in the microbiological assays of folate were studied. Small degree of inhibition effects were seen with S.faecalis and P.cerevisiae. Total inhibition of the growth of L.casei was seen when the concentration of methotrexate in the growing culture is as low as 0.01 ng/ml. The application of L.casei-tetrazolium bioautography with unwashed culture led to a method for the determination of antifolate. Studies on the oral absorption of 10 mg methotrexate in psoriasis patients indicated that a peak level of about 200 ng/ml was reached within 1 hour after doses and declined to zero level within 48 hours.

INTRODUCTION

The folic acid antagonists are known to have anti-leukemia activity (Farber et al 1948). The 4-amino-4-deoxy-10-methylpteroylglutamic acid (methotrexate) one of the folate antagonists has been shown to have the most effective curing effect in cancer chemotherapy and known to have a biochemical role as dihydrofolate reductase inhibitor (Condit, 1960; Condit and Eliel, 1960; Wright et al 1960; Hertz et al 1961; Hustu et al 1973; Frei et al 1975) and this property is used as a method for its detection (Bertino and Fischer, 1964). Since folate antagonists had a competitive action with folic acid and its derivatives thus we would expect to see growth inhibition of folate dependent microorganisms. Using this principle and

*Department of Clinical Chemistry, Facultry of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

the tetrazolium bioautographic techniques we can see the inhibition zone or zones and thus detection the inhibitor.

MATERIALS AND METHODS.

The 4-amino-4-deoxy-10-methylpteroylglutamic acid (methotrexate) tablets or parenteral doses were obtained from Lederle laboratories devision, American Cyanamid Company. They were used for oral absorption studies and also used for the inhibition studies. Microbiological assays with Lactobacilus casei, Streptococcus faecalis and Pediococcus cerevisiae were carried out using aseptic technique (Herbert, 1966) and a semiautomated method (Leeming and Portman-Graham, 1973)

Pteroylglutamic acid (Folic Acid) was purchased from Koch-Light Laboratories, Colnbrook, Buckinghamshire, UK. 5-formyltetrahydropteroylglutamic acid (Folinic Acid) was a gift from Laderle Laboratories. 10-formylpteroylglutamic acid was prepared according to Blakley (1959), 5-methyltetrahydropteroylgutamic acid was prepared according to the method of Blair and Saunders (1970) and Dihydropteroylglutamic acid was prepared by the method modified from Futterman (1963).

Triphenyltetrazolium (chloride) was purchased from BDH Chemicals Ltd; Poole, England. Thin layer chromatographic plates were Art. 5716 DC-Fertigplatten cellulose (Pre-coated TLC plates without fluorescent indicator) dimension 0.1 mm x 20 mm x 20 cm and purchased from Merck (U.K.). After 2 to 5 ul of samples were applied onto the thin layer chromatographic plates with sterilized micropipettes they were developed with 3% aqeous ammonium chloride containing 1% ascorbic acid (W/V). The distance from the application points to the solvent front is adjusted for 15 cm. The developed plates were left to half dried in refrigerator at 6°C before putting on the tray (culture trays Code Number H 43/1 purchased from Jencons Scientific Ltd, England.) of settled sterilized plain agar (Oxoid Ionagar No. 2, purchased from Oxoid, England or this can be substituted by Noble, Agar special of Difco, U.S.A.).

The plain agar was prepared by dissolving 3 to 5 g of the agar powder in 250 ml distilled water and sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes. The agar medium was prepared by adding

appropriate assay media, 3 to 5 g of agar powder, 0.5 g ascorbic acid, 30 ml 0.1M phosphate buffer pH 6.1, 5 ml of 2% sterilized tetrazolium solution (W/V), 10 ml of diluted appropriate microorganism in the final volume of 300 ml adjusted by distilled water. The agar media were prepared in such a manner that the media were sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes and cooled to 45°C before the tetrazolium solution and diluted microorganism solutions were added. The cooled agar media (45°C) were poured to cover the developed thin layer chromatographic plates and let settle before covering with thin film of plastic sheet and covered. The prepared plates were incubated in the air-ventilated incubator at 37°C for 24 hours. The inhibition zone or zones could be seen at the various Rf values of the inhibitors detected. By varying the amount of standard methotrexate applied onto the chromatographic plates this can be used as standard curve and thus unknown could be determined.

The inhibition effects of various concentrations of methotrexate in the microbiological assays with L. casei, S. faecalis and P. cerevisiae were set out as shown in Table I.

Patients with psoriasis on treatment with methotrexate were used in the studies of serum methotrexate levels. These subjects had oral doses of 10 mg of methotrexate after the first venous blood samples were taken and then at 1,2,3, 4,24 and 48 hours after doses.

Table I Schedule of the studies of inhibition of methotrexate on microbiological asssay of folates with L. casei, S. faecatis and P. cerevisiae.

Concentration of methotrexate (ng/ml)	Concentration of added folate* (ng/ml)					
	1	2	3	4	5	6
0	0	2	5	10	20	30
0.5	0	2	5	10	20	30
5.0	0	2	5	10	20	30
50.0	0	2	5	10	20	30
500.0	0	2	5	10	20	30

*indicates pteroylglutamic acid, 7,8-dihydropteroylglutamic acid,5-methyltetrahydropteroylglutamic acid, 10-formylpteroylglutamic acid and 5-formyltetrahydropteroylglutamic acid were used in the studies with L. casei. Pteroylglutamic acid, 7-8-dihydropteroylglutamic acid and 5-formyltetrahydropteroylglutamic acid were used with P. cerevisiae. Concentrations of the appropriate folates in each assay media were similar to those of the assay media without methotrexate and as shown in the results section.

RESULTS.

The inhibition effects of methotrexate were studied in the growing cultures of L. casei, S. faecalis and P. cerevisire. Various degrees of inhibition effects were seen in all three cultures. With L. casei total inhibition was seen at a concentration as low as 10 pg/ml of methotrexate in the growing cultures as shown in Table II. With S. faecalis and P. cerevisiae some inhibition effects were seen as shown in Tables III and IV, respectively.

The bioautography of standard methotrexate and serum methotrexate were shown in Plates I and II. The serum methotrexate levels from psoriasis subjects after 10 mg of methotrexate orally were shown in Table V.

TABLE II The inhibition of methotrexate on the microbiological assay of folates with L. casei.

Concentration of methotrexate (ng/ml)	Concentration of folate (ng/ml)*					
	1	2	3	4	5	6
0	0	2	5	10	20	30
0.5	0	0	0	0	0	0
5.0	0	0	0	0	0	0
50.0	0	0	0	0	0	0
500.0	0	0	0	0	0	0

*detected results from all folates as shown in Table I.

TABLE III The inhibition effect of methotrexate on the growing cultures of S. faecalis.

Concentration of methotrexate (ng/ml)		Concentration of folate (ng/ml)					
		1	2	3	4	5	6
A	0.00	0	2.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	10.0 ± 0	20.0 ± 0	30 ± 0.0
A	0.50	0	1.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2	9.6 ± 0.5	19 ± 1	27 ± 2.0
A	5.00	0	1.0 ± 0.1	3.2 ± 0.3	6.0 ± 1.0	11 ± 2	20 ± 1.0
A	50.00	0	0	0	0	1.0 ± 0	2.0 ± 0
A	500.00	0	0	0	0	0	0
B	0.00	0	2.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	10 ± 0
B	0.50	0	1.8 ± 0.2	2.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	7.5 ± 0.5	9.7 ± 0.3
B	5.00	0	1.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	3.0 ± 0.5	5.0 ± 0.5	6.0 ± 1.0
B	50.00	0	0	0	0	0	0
B	500.00	0	0	0	0	0	0
C	0.00	0	1.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1	5.0 ± 0.5	8.0 ± 1.0	13.0 ± 1.0
C	0.50	0	1.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.9 ± 0.5	7.9 ± 1.0	12.8 ± 1.0
C	5.00	0	1.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.5 ± 0.5	6.0 ± 1.0	11.0 ± 1.0
C	50.00	0	0	0	0	2.5 ± 0.5	5.0 ± 0.5
C	500.00	0	0	0	0	0	0

A = Studies when pteroylglutamic acid is used.
B = Studies when dihydropteroylglutamic acid is used.
C = Studies when 5-formyltetrahydropteroylglutamic acid is used.

TABLE IV. The inhibition effect of methotrexate on the growing cultures of P. cerevisiae.

Concentration of methotrexate (ng/ml)	Concentration of folate* (ng/ml)					
	1	2	3	4	5	6
0.0	0	1.0 ± 0.0	3.0±0.5	5.0 ± 0.5	8.0 ± 0.5	13.0±0.5
0.5	0	1.0 ± 0.0	3.0±0.5	5.0 ± 0.5	8.0 ± 0.5	13.0±0.5
5.0	0	1.0 ± 0.0	3.0±0.0	4.8 ± 0.5	6.5 ± 0.5	11.0±0.5
50.0	0	0.9 ± 0.1	2.9±0.1	4.8 ± 0.5	7.0 ± 1.0	8.5±0.5
500.0	0	0.5 ± 0.0	2.6±0.2	4.2 ± 0.5	5.0 ± 0.5	5.7±0.2

* 5-formyltetrahydropteroylglutamic acid is used in the studies.

TABLE V The serum methotrexate from 2 subjects after 10 mg of orally administered methotrexate.

Time after doses (h)	Methotrexafe concentration (ng/ml)
0	0
1	200±25
2	100±0.0
3	70±5.0
4	50±0.0
24	20±5.0
40	0

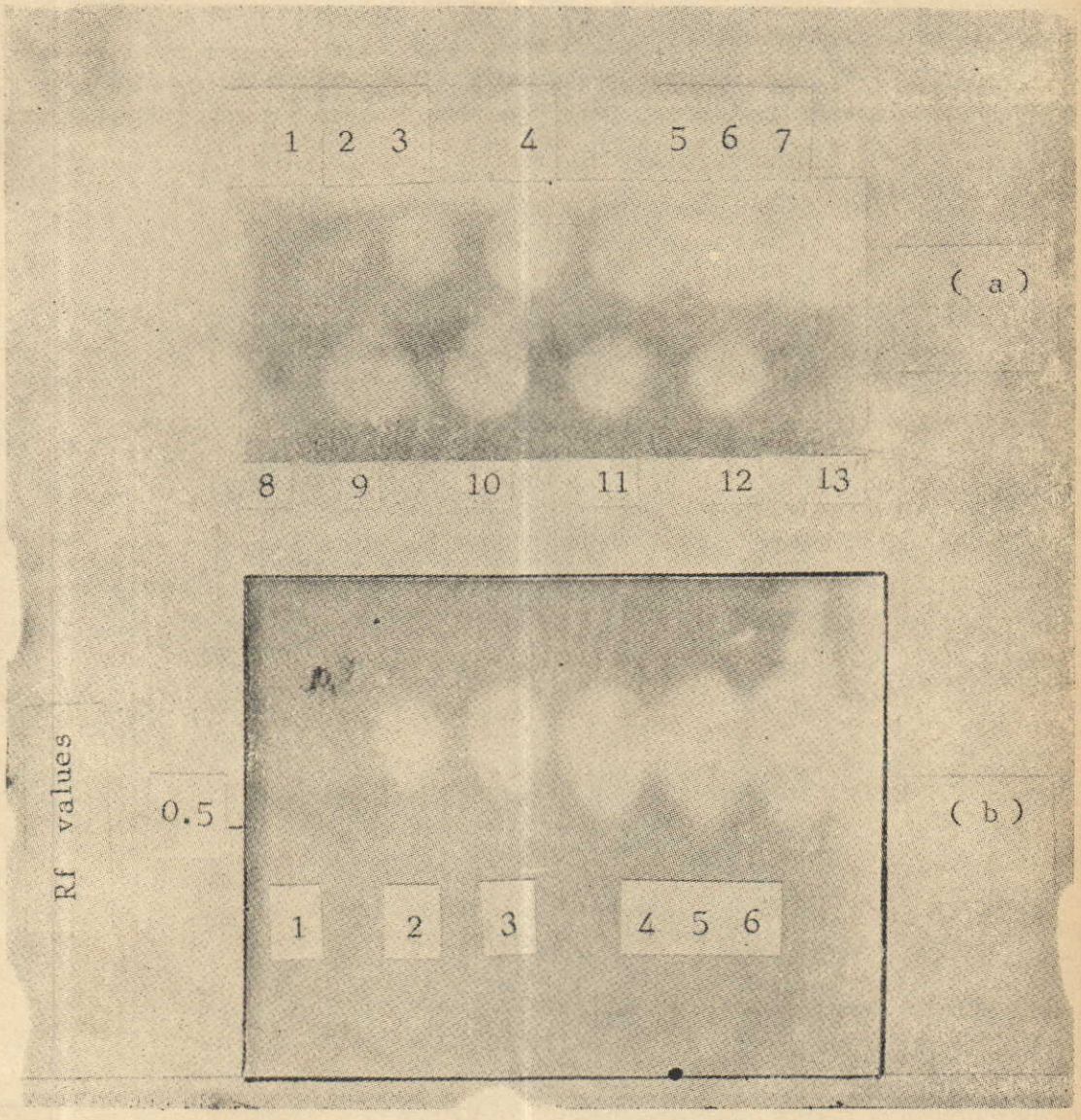


PLATE II: The inhibition zones of methotrexate on the bioautography with L. casei. Plate Ia was developed by using diffusion effect and the methotrexate concentrations (ng/ml) were 0, 5, 50, 100, 200, 300, 500 for spots 1 to 7, respectively and spots 8 to 13 were unknown from sera of a patient after 10 mg of methotrexate orally. Plate I b was developed by running a vertical chromatography of standards in 3% aqeous ammonium chloride solvent and the concentrations (ng/ml) were 5, 50, 100, 200, 300, 500 sespectively.

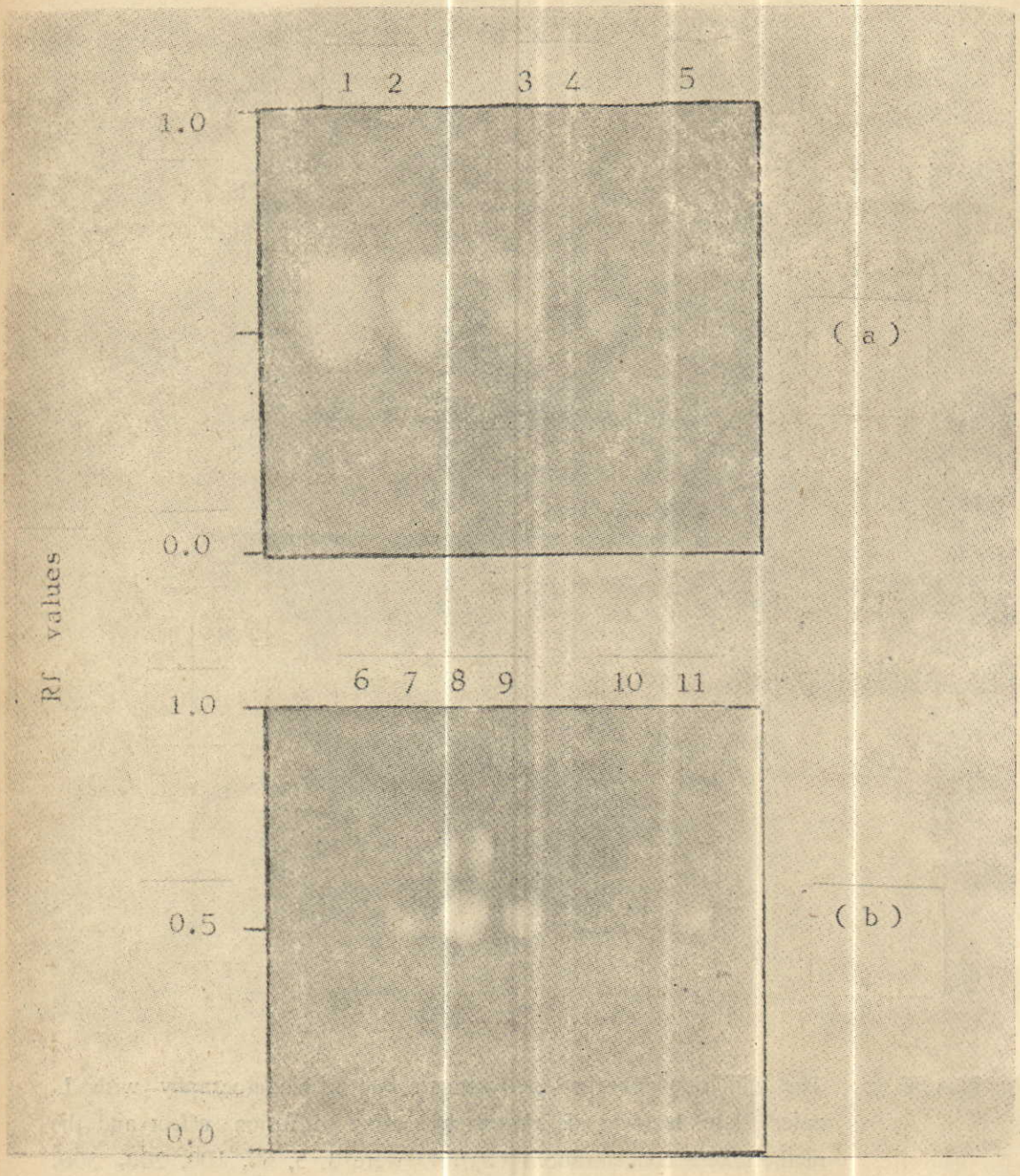


PLATE II : Bioautography of samples from subjects after 10 mg of methotrexate orally. Plate II a, at time 1, 2, 3, 4, 48 hours after doses and Plate I Ib at time 48, 24, 4, 24, 48, 24 hours respectively.

DISCUSSION.

The inhibition effects of methotrexate on the growing of L. casei, S. faecalis and P. cerevisiae are different. With S. faccalis and P. cerevisiae only partial inhibition were seen (Tables III & IV) and thus these two microorganisms are not of much use in the tetrazolium bioautography of antifolates. The very high sensitivity of inhibition of methotrexate to L. casei (Table II) made the organism a very useful for the application with bioautographic technique. The 2 techniques of plates preparation are of some usefulness, the first one is useful for the determination and characterization of the unknown and the second one is useful for the quantitative analysis of the unknown. Eventhough some enzymatic techniques are available for the determination of dihydrofolate reductase inhibitors (Werkheiser et al 1961; Bertino and Fischer, 1964) it is useful for only the quantitative determination. The technique presented here have advantages over the enzymatic techniques in the way that it could be used for both qualiative and quantitative analyses and required no complicated instrumentation. The plates used in this technique can also be prepared by using paper chromatography and thin layer chromotography as described here.

Studies on serum methotrexate levels in psoriasis patients after 10 mg of orally administered methotrexate (Table V) indicated that it is quickly absorbed and presented in the serum unmetabolized as shown in plates I and II. Since determination of serum methotrexate is possible it is reasonable to assume that the determination of urine methotrexate could be equally achieved. Eventhough methotrexate is quickly absorbed it is also quickly excreted into the urine (Henderson et al 1965; Goodman and Gilman, and Gilman, 1970; Huffman et al 1973). Small amount of methotrexate was left circulating in the blood 24 hours after doses (Plate II b). It is not clear whether the absorbed methotrexate is totally excreted or partially excreted into urine after doses. Evidences from many sources (Henderson et al 1965; Goodman and Gilman, 1970: Huffman et al 1973) and the pharmacokinetics analysis of the data presented here indicated that the absorbed methotrexate is partially retained by the body tissues. This is supported by the fact that without rescuring agent the treatment of patients with methotrexate led to a lethal effect (Sullivan et al 1959: Goldin et al 1953; Duff et al 1961;) Blair and Searle, 1970).

ACKNOWLEDGEMENT:

I would like to thank Prof. J.A. Blair for his supervision and encouragement. Dr. V. Melikian for his permission and cooperation with patients in his care.

ย่อความ

ผู้ทำการวิจัยได้ศึกษาถึง ความสามารถการขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลอินทรีย์ ที่ใช้ในการ ตรวจหาปริมาณของ Folic acid โดย Methotrexate การศึกษาพบว่า Methotrexate มีผลไม่มากนักต่อการขัดขวางการเจริญเติบโต ของ S. faecalis และ P. cerevisiae แต่มีผลอย่างมาก ต่อการเจริญเติบโตของ L. casei จากการค้นพบนี้เมื่อใช้ L. casei ใน tetrazolium bioautography จะสามารถใช้ตรวจหาปริมาณของสารพวกที่เป็น antifolate ได้ การศึกษาระดับของ serum methotrexate ในคนไข้ psoriasis พบว่าหลังจากการกิน 10 มก. Methotrexate (tablets) ระดับของ Methotrexate ที่ปรากฏในเลือดสูงขึ้นถึงจุดสูงสุด (200 ng/ml) ภายใน 1 ชม. และ จะค่อย ๆ ลดลงจนหมดไปภายในเวลา 48 ชม. Methotrexafe ที่ปรากฏในเลือดจะเป็นแบบเดียวกับที่ให้กินเข้าไป

REFERENCES.

1. Bertino, J.R., and Fischer, G.A. (1964): Techniques for study of resistance to folic acid antagonists.. Meth. med. Res. 10 297-307.

2. Blair, J.A., and Saunders, K.J. (1970): A convenient method for the preparation of dl-5-methyltetrahydrofolic acid (dl-5-methyl-5,6,7,8-tetrahydropteroyl-L-monoglutamic acid). Anal. Biochem. 34 376-381.

3. Blair, J.A., and Searle, C.E. (1970): Reversal of methotrexate toxicity in mice by 5-methyl-tetrahydrofolic acid. Brit. J. canc. 24 603-906.

4. Blakley, R.L. (1959): The reaction of tetrahydropteroylglutamic acid and related hydropteridines with formaldehyde. Biochem. J. 82 707-715.

5. Condit, P.T. (1960): Studies on the folic acid vitamins. III. The duration of the effects of folic acid antagonists in man. Cancer 13 229-235.

6. Condit, P.T., and Eliel, L.P. (1960): Effects of large infrequent doses of A-methopterin on acute leukemia in children. J. Am. med Assoc. 172 105/451-107/453.

7. Duff, J.K., Sullivan, R.D., Miller, E., Ulm, A.H., Clarkson, B.D., and Clifford, P. (1961) Antimetabolite-metabolite cancer chemotherapy using continuous intraarterial methotrexate with intermittent citrovorum factor. Method of Therapy. Cancer 14 744-752.

8. Farber, S., Diamond, L.K., Mercer, R.D., Sylvester, R.F. Jr., and Wolff, J.A. (1948): Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-amino pteroylglutamic acid (Aminopterin). New. Engl. J. Med. 238 787-793.

9. Futterman, S. (1963): Preparation and properties of dihydro folic acid. In 'Methods in enzymology' 6 801-802.
(S.P. Colowick and N.O.Kaplan, editors), Academic press.

10. Goldin, A., Mantel, N., Greenhouse, S.W., Venditti, J.M., and Humphreys, S.R. (1953): Estimation of the antileukemic potency of the antimetabolite aminopterin, administered alone and in combination with citrovorum factor or folic acid. Canc. Res. 13 843-850

11. Goodman, L.S., and Gilman, A. (1970): The pharmacological basis of therapeutics. pp 1360-1395. Macmillan.

12, Hertz, R., Lewis, J. Jr., Lipsett, M B. (1961): Five years experience with the chemotherapy of metastatic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. Am. J. Obstet. Gynec. 82 631-640

13. Henderson, E.S., Adamson, R.H., Denham, C., Oliverio, V,T. (1965): The metabolic fate of tritiated methotrexate. I. Absorption, excretion and distribution in mice, rats, dogs and monkeys. Canc. Res. 25 1008-1017.

14. Herbert, V. (1966): Aseptic addition method for Lactobacillus casei assay of folate activity in human serum. J. clin. Path. 19 12-16.

15, Huffman, D.H., Wan, S.H., Azarnoff, D.L., and Hoogstraten, B. (1973): Pharmacokinetics of methotrexate. Clin. Pharm. Ther. 14 572-579.

16, Hustu, H.O., AurR.J.A., Verzosa, M.S., Simone, J.V., and Pinkel, D. (1973): Prevention of central nervous system leukemia by irradiation. Cancer N.Y. 32 585-597.

17. Leeming, R.J., and Portman-Graham, H. (1973): An automated method for microbiological assays. Med. Lab. Tech. 30 21-25.

18. Sullivan, R.D., Miller, E., and Sikes, M.P. (1959): Antimetabolite - metabolite combination cancer therapy. Effects of intra-arterial methotrexate-intra muscular citrovorum factor therapy in human cancer. Cancer 12 1248-1262.

19. Werkheiser, W.C. (1961): Specific binding of 4-aminofolic acid analogues by folic acid reductase. J. biol. Chem. 236 888-893.

20. Wright, J.C., Gumport, S.L., and Golomb, F.M. (1960): Remissions produced with the use of methotrexate in patients with mycosis fungoides. Canc. Chemother. Pep. 9 11-20.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Science

Vol. 9 No. 2
May 1976

HUMAN COLOSTRUM. I. B-AND T-LYMPHOCYTE POPULATIONS

By

Suree Kunterarak, B.Sc. (Med. Tech.)
Sanong Chaiyarasamee, B.Sc., M.T. (ASCP)*
Panja Kulapongs, M.D.*

ABSTRACT

Cellular components of fresh colostrum obtained from 18 Thai postpartum women were studied. The total cell count was 1,672 ± 515/cu.mm. (1,000-3,000) with macrophages and polymorphonuclear leukocytes constitute the major component of the cell population while lymphocyte population are only 8.17 ± 3.49% or 133.6 ± 56.3 (50-240)/cu.mm. Of these lymphocyte population 37.50 ± 5.66% were identified as B-cells, 45.33 ± 5.09% were T-cells and approximately 17% were null cells. The presence of polymorphonuclear leukocyte does not indicate the presence of mastitis or infection. The significance of the passage of immunocompetent maternal lymphocytes in colostrum into the breast- fed newborn required further study.

INTRODUCTION.

Various mechanisms by which immunological competence may be transmitted from mother to infant represent an important area of concern to those interested in the development of effective immunity during early life. Initial work related to the secretory immune system as studied in external secretions focussed largely on the manner in which the secretory immunoglobulins. particularly IgA [1-4] and various other components such as lactoferrin [5], may confer immunity or

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

defense against infection to the nursing infant [6].

Since Beigel's description in 1868[7] of the celluiar nature of the corpuscle of Donne'[8], it has been accepted that cells are normal constituents of colostrum. It is now agreed, on the basis primarily of studies in animals [9-12], that lymphocytes, monocytes, macrophages, epithelial cells and colostral corpuscles are normal constituents of mammary gland secretion. The types of cells in human colostrum are essentially the same as those of other species [9-12]. With the exception of the colostral corpuscles, the identity of other cells in mammalian colostrum has been well understood. Recent study [13] indicate that human colostral corpuscles are macrophages engorged with fat. In fresh colostrum, these cells were motile, phagocytosis and contained abundant lysosomes. In culture these cells again displayed phagocytosis and glass adhesive and ameboid activity typical of macrophages.

Significance of the cells in colostrum is controversial. They have been considered as phagocytes, returning milk substances to the connective tissue of the mammary gland, as degenerating cells sloughed during the process of milk secretion [14] or as inflammatory cells appearing in response to infection in the mammary gland [15,16]. Earlier investigations of cells in colostrum have concentrated largely on the neutrophils, since its presence has been considered to indicate infection of the mammary glands. Neutrophils were abundant in colostrum from nursing mothers, indicating that they probably appear in response to engorgement of the breast [13] and their presence is no longer considered as the evidence of mastitis. Smith and Goldman [13] has found that human colostrum contained small lymphocytes capable of blastoid transformation on exposure to phytohemagglutinin. Subsequent study of Diaz-Jouanen and Williams [16] indicated that colostral lymphocytes appear to be of 3 types: B-cells bearing surface immunoglobulin, T-cell as identified by anti-T-cell antiserum and E-binding, and a population of null cells. We have earlier published the observation of these 3 types of lymphocytes in malnourished children[17]. The present study not only revealed

the pattern of normal distribution of B and T-cells in human colostrum but also confirmed the existence of null cells in human subject.

MATERIALS AND METHODS.

Two milliliters aliquot of colostral samples were collected with breast pumps from 18 postpartum Thai women including primigravidas and multigravidas during the first 3 days following delivery. All of them nursing their infants, and no hormones were given to suppress milk production during the collection period. Women with clinical evidence of mastitis or infection were excluded from this study. Total colostral cell count was carried out by the blood leukocyte count method. The colostral sample was centrifuged at 800 x g. for 10 minutes. The fat layer and most of the supernatant fluid were discarded and the cell sediment was resuspended in the remaining fluid. Cell sediment smears were prepared on clean glass slides and individual cells were then identified in differential count using Wright's stain. Aliquot of cell sediment suspension was then washed 2–3 times with Gel–Hank's solution. The final cell suspension was examined for the distribution of B and T-lymphocytes using the sheep red cell rosette technique[18]

RESULTS.

The total colostral cell counts ranged from 1,000 to 3,000/cu. mm. with an average value of 1,672 ± 515/cu. mm. Of these cells, macrophages and polymorphonuclear leukocytes constitute the major components of cell population while lymphocytes constitute only 8.17 ± 3.49 % or between 50 to 240 (133.6 ± 56.3) cells/cu. mm. The average B lymphocyte population was 37.50 ± 5.66% and T lymphocytes was 45.33 ± 5.09%. The null cells (lymphocytes) which can not as yet be assigned to either B or T catagory was found

COMMENTS.

The results of this study agrees well with those of Diaz-Jouanen and Williams [16] who observed that 50.2 ± 9.16% of colostral lymphocytes were T–cells and 34.6 ± 6.1% were B-cells. Of particular interest was their finding that the colostral B-lymphocytes appear to be greatly enriched

with cells bearing surface IgA (approximately 50%), when compared to normal peripheral blood lymphocytes where population of IgA-bearing B-cells usually approximate only 11.5% (19,20) of all B-cells. This is also in consistent with the findings of Murillo and Goldman [21] who observed that human colostral cells synthesized IgA but very little IgG or IgM.

Breast fed newborn infant normally receives colostral cells. It is possible that these maternal cells may influence the immunologic status of the recipient neonate. The functional capacity of colostral lymphocytes was sought using mitogen stimulation with variable results. While Smith and Goldman reported that the response of colostral lymphocytes to PHA and specific antigen appears both qualitatively and quantitatively similar to that of peripheral blood lymphocytes [13]. Diaz-Jouanen and Williams obtained a relatively weaker response from colostral lymphocytes [16]. In addition they have demonstrated the colostral inhibitor with distinct inhibitory capacity for mitogen stimulation of lymphocytes[16]. The true nature of this colostral inhibitor must await further study but this activity present in low molecular weight materials of 10,000 or less and does not seem to be directly related to colostral IgA. It is conceivable that the weak mitogen response colostral lymphocytes observed by Diaz-Jouanen and Williams may be due to local immunosuppressive factors present in colostrum.

The importance of colostral lymphocytes to the newborn baby is still not clear. Breast fed newborn infant normally receives colostral cells. It is possible that these maternal cells may influence the immunologic status of the recipient neonate. On study confirms the lymphoid content of colostrum and indicate that almost half of these lymphocytes are indeed T-cells, reinforcing the idea that immunocompetence and some features of CMI may be transferred in colostrum by maternal lymphocytes or their products. This concept may conceivably be extended to the immune system of the mucous surfaces and deserves considerable further attention. It has been postulated that presumably colostral lymphocytes as well as the immunoglobulins they produced would be digested in a manner which not

allowing absorption of whole cells. It is possible that some important smaller molecules such as transfer factor with a molecular weight of less than 10 000 and an active principle in the range of 2,000-4,000 may be directly transferred to the nursing infant. Such a mechanism might explain why Mohr [22] found PPD positive breast fed babies from PPD positive mothers.

SUMMARY.

Cellular components of fresh colostrum obtained from 18 Thai post-partum women were studied. The total cell count was 1,672 ± 515/cu. mm. (1,000-3,000) with macrophages and polymorphonuclear leukocytes constitute the major component of the cell population while lymphocyte population are only 8.17 ± 3.49% or 133.6 ± 56.3 (50-240)/cu. mm. Of these lymphocyte population 37.50 ± 5.66% were identified as B-cells, 45.33 ± 5.09% were T-cells and approximately 17% were null cells. The presence of polymorphonuclear leukocytes does not indicate the presence of mastitis or infection. The significance of the passage of immunocompetent maternal lymphocytes in colostrum into the breast fed newborn required further study.

ย่อเรื่อง

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ Cellular components ใน fresh colostrum ที่ได้จากหญิงไทยหลังคลอดจำนวน 18 คน จากการศึกษาพบว่า Total cell count ที่ตรวจได้คือ 1,672 ± 515 cells ต่อ cu. mm. (ค่าอยู่ระหว่าง 1,000–3,000) ซึ่งส่วนใหญ่เป็น Macrophages และ polymorphonuclear leukocytes จำนวน lymphocytes ที่ตรวจพบมีเพียง 8.17 ± 3.49% หรือ 133.6 ± 56.3 (50-240) cells ต่อ cu mm. ซึ่ง lymphocyte population ที่ตรวจพบนี้สามารถตรวจแยกได้ว่าเป็น B-cells 37.50 ± 5.66 % และเป็น T-cells 45.33 ± 5.09% ส่วนที่เหลือประมาณ 17% เป็น null cells การที่ปรากฏมีพวก polymorphonuclear leukocytes อยู่ด้วยไม่ได้แสดงว่ามี mastitis หรือ infection นอกจากนี้ความสำคัญของการที่มี Immunocompetence maternal lymphocytes ผ่านจากมารดาไปยัง colostrum ไปสู่ทารกที่เลี้ยงด้วยนมมารดานั้นยังจะต้องทำการศึกษาค้นคว้าต่อไป

REFERENCES

1. Tomasi, T.B., Tan, E.M., Solomom, A., and Prendergast, R.A.: Characteristics of IgA immune system common to certain external secretion. J. Exp. Med. 121 : 101, 1965.

2. South, M.A., Cooper, M.D., Wollheim, F.A.., Hong, R, and

Good, R.A.: The IgA system. I. Studies of the transport and immunochemistry of IgA in the saliva. J. Exp. Med. 123:615, 1966.

3. Ammann, A.J., and Stiehm, E.R.: Immune globulin levels in colostrum and breast milk, and serum from formula-and breast fed newborns. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122:1098, 1966.

4. Adinolfi, M., Glynn, A.A., Lindsay M., and Milne, C.M.: Serological properties of Gamma-A antibodies to Escherichia coli Present in human colostrum. Immunology 10:517, 1966.

5. Masson, P.L., Heremans, J.F., and Schonne, E.: Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. J. Exp. Med. 130:643, 1969.

6. Mata, L.J. and Wyatt, R.G.: Host resistance to infection. Amer. J. Clin. Nutr. 24:976. 1971.

7. Mayer, G., and Klein, M.: Histology and Cytology of the Mammary Gland. In "Milk: The Mammary Gland and Its Secretions". Kon, S.K., and Crowie, A.T., eds. Academic Press, New York, 1961, pp. 363.

8. Donne, A.: Cours de microscopie, Vol. 1. et Atlas No. 1. (Bailliere, Paris 1844-1845).

9. Varrier-Jones, P.C.: The cellular content of milk: Variations met with physiological and pathological conditions. Lancet ii: 537, 1924.

10. Emmel, V.E., Weatherford, H.L., and Streicher, M.H.: Leucocytes and lactation. Amer. J. Anat. 38:1, 1926.

11. Zlotnik, I: Types of cells present in cow's milk. J. Comp. Path. 57:196, 1947.

12. Maximov, A.A., and Bloom, W.: A Textbook of Histology, 5th edition. Saunders, Phila., 1948.

13. Smith, C.W. and Goldman, A.S.: The cells of human colostrum. I. In vitro studies of morphology and functions. Pediat. Res. 2:103, 1968.

14. Okada, M.: Histology of the mammary gland. VII. Histological and histochemical studies of cells in the milk of domestic animals. Tohoku J. Agr. Res. 11:31, 1960.

15. Hadwen, S.: Microscopic detection of mastitis. Amer. J. Vet. Res. 1:11, 1940.

16. Diaz-Jouanen, E., and Wiliiams, R.C., Jr.: T and B lymphocytes in

human colostrum. Clin. Immunol. Immunopath. 3:248, 1974.

17. Kulapongs, P., Suskind, R., Vithayasai, V., and Olson, R.E.: In vitro callular immune response in Thai children with protein calorie malnutrition. Kroc Foundation Symposium on Nutritional Status and Immunity. Raven Press, N.Y. 1976.

18, Tositarat, T., Laohachinda, B., Teowsiri, P., and Kulapongs, P.: Rosette Test: A simple method for identification of CRL (B) and RFC (T) lymphocytes. Ass. Med. Tech. Thailand Gaz. 2:1973.

19. Messner, R.P., Lindstrom, F.D., and Williams, R.C., Jr.: Peripheral blood lymphocyte cell surface markers during the course of systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. 52:3046, 1973.

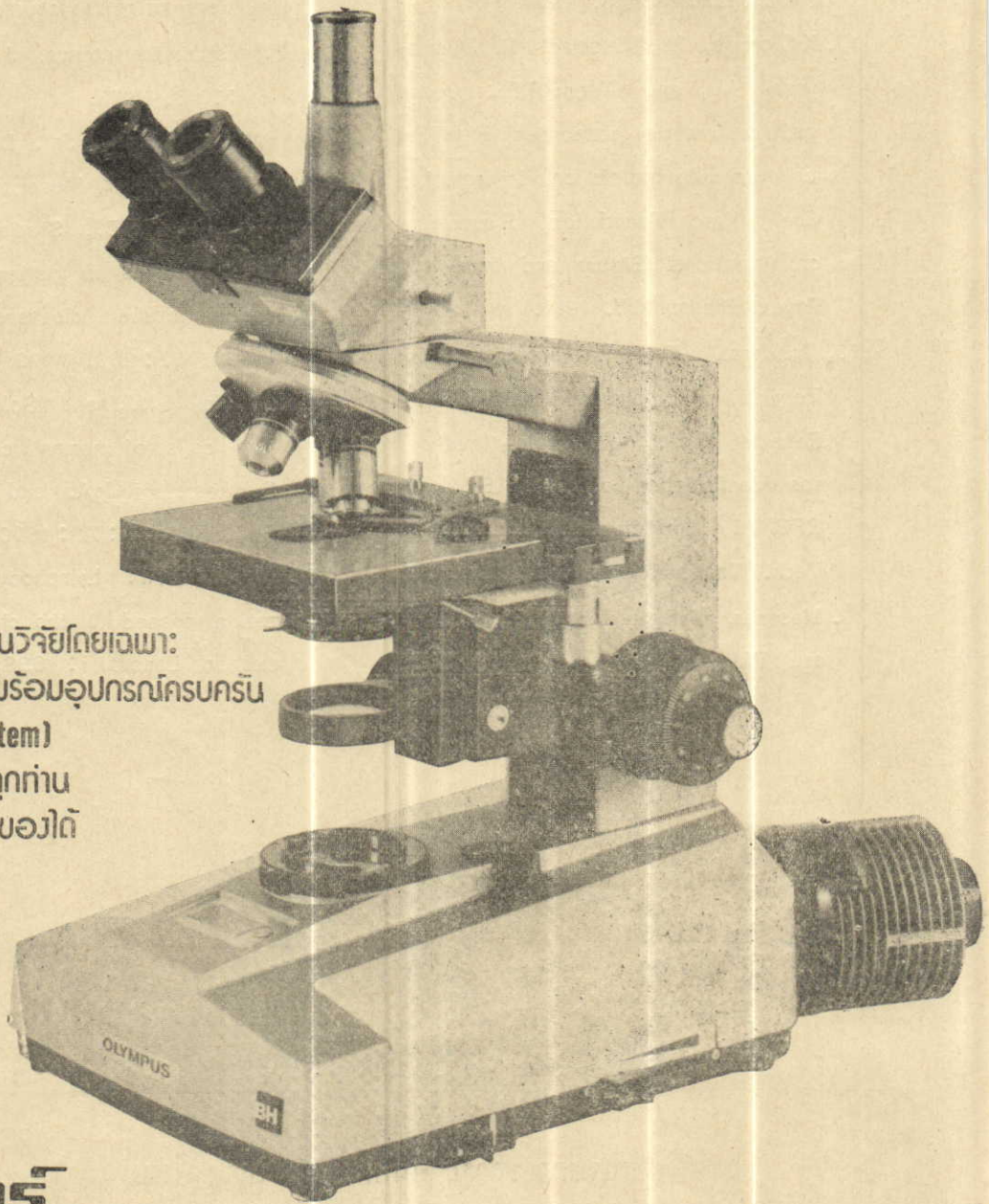
20. Wiiliams, R.C., Jr., DeBord, J.R., Mellbye. O.J., Messner, R.P., and Lindstrom, F.D., Studies of T-and B-lymphocytes in patient with connective tissue diseases. J. Clin. Invest. 52:283, 1973.

21. Murillo, G.J., and Goldman, A.S.: The cells of human colostrum. II. Synthesis of IgA. and beta 1c. Ped. Res. 4:71:1970.

22. Mohr, J.A.: Lymphocyte sensitization passed to the child from the mother. Lancet i: 688,1972

สมาชิกวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่
โปรดต่ออายุสมาชิกภาพด้วย

ล่าสุดจากโอลิมปัส Model BH



สร้างขึ้นเพื่องานวิจัยโดยเฉพาะ
ระบบ Modular พร้อมอุปกรณ์ครบครัน
(Complete System)
ราคาที่นักวิจัยทุกท่าน
สามารถเป็นเจ้าของได้

รัชมอร์

111 ทองหล่อซอย5 สุขุมวิท55 กรุงเทพฯ
โทร. 913143, 924100

ผู้แทนจำหน่ายและบริการ แต่ผู้เดียวในประเทศไทย

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences.

Vol. 9 No. 2
May 1976

ย่อ – รีวิวเอกสาร

Current concepts of "Normal Values", "Reference Values" and "Discrimination Values" in clinical chemistry.

F.W Sunderman, Jr. (1975): Clin. Chem. 21 No.13, pp. 1873-1877.

การใช้คำว่า "Normal values" มีปัญหาหลายประการ โดยเฉพาะที่เกี่ยวกับทางด้านหลักการทางวิทยาศาสตร์ ดังนั้นจึงมีนักวิทยาศาสตร์มากมายที่พยายามคิดหาคำมาแทน คำว่า Normal Values ปัจจุบัน คำว่า Reference Values เป็นที่นิยมแพร่หลายทั้งในยุโรป และอเมริกา คำว่า Discrimination Values ก็มีการนำมาใช้ ในการแบ่งแยกระหว่างคนที่เป็นโรค (diseased) และคนที่ไม่เป็นโรค (healthy)

ปัญหาสำหรับ Normal Values ก็คือว่าไม่มีวิธีการใด ๆ ที่สามารถใช้อธิบายเกี่ยวกับ Normal Values หรือ Normal ranges สำหรับผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการได้ โดยไม่มีข้อโต้แย้งเลย

Reference Values ถูกนำมาใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับ Normal Values เพื่อเป็นการวางรากฐานทางวิทยาศาสตร์ สำหรับการแปลผลจากห้องทดลอง โดยอาศัยผลจากห้องทดลองของ Reference population และเมื่อใช้วิธีการทางสถิติเข้ามาช่วยทำให้สามารถจัด Reference Interval ได้ สำหรับหลักการในการพิจารณาหาค่าของ Reference Values นั้นก็โดยการพิจารณาถึงส่วนประกอบดังต่อไปนี้

1. กลุ่มตัวอย่างอ้างอิง (Reference Population) และวิธีการเลือก เช่น อายุ, เพศ, อาชีพ เป็นต้น

2. สภาพแวดล้อม และสภาพทางสรีรวิทยา ในขณะเมื่อมีการเก็บตัวอย่าง เช่น อุณหภูมิ, กำลังตั้งครรภ์, เวลาเช้า หรือเวลาบ่าย เป็นต้น

3. วิธีการเก็บตัวอย่าง เช่น เจาะโลหิตจากปลายนิ้วมือ, เจาะจากเส้นเลือด และเก็บใส่ในหลอดแก้วธรรมดา หรือเก็บใส่ในหลอดพลาสติก มีสารประกอบป้องกันการแข็งตัวหรือช่วยให้แข็งตัวเร็วหรือไม่ เป็นต้น

4. กรรมวิธีที่ใช้ในการตรวจ ว่ามีความแม่นยำถูกต้องขนาดใด

5. ข้อมูลจากผลการตรวจหา Reference Intervals รวมทั้งวิธีการทางสถิติ Individual Reference Values เป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์ผลจากห้องทดลอง เมื่อค่า Individual Reference Values เปลี่ยนแปลงไปแม้ว่าจะอยู่ใน Reference Intervals ก็อาจบ่งถึงความผิดปกติได้

Discrimination Values โดยอาศัยหลัก 6 ประการในการพิจารณา คือ

1. ช่วงชัดเจนของความผิดปกติของโรคที่ตรวจหา

2. ขอบเขตของขั้นแห่งความผิดปกติ

3. ขอบเขตของวิธีที่ใช้ตรวจ

4. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีที่ใช้ตรวจ

5. โอกาสที่จะเกิดความผิดปกติว่ามีมากน้อยอย่างไร

6. คุณค่าทางคลินิค เช่นมีโอกาสผิดมากก็ยังพอจะใช้ได้หาก กรรมวิธีใน การรักษาดีและมีอันตรายน้อย แต่จะใช้ไม่ได้หากกรรมวิธีในการรักษายังไม่ดีพอ และ เป็นอันตราย

คำว่า Discrimination Value บางทีก็เรียกว่า Cutoff point, Operating Position or Point of Operation ความหมายของ Discrimination Value นั้นเหมือน ๆ กันกับ Screening Level หรือ Borderline.

ขวัญชัย รัตนเสถียร,
Ph. D., (Chemistry)

Comparison of Methodologies for Thalassemia Screening by Hemoglobin A_2 Quantitation.

Robert M. Schmidt, Donald L. Ruckragel and Thomas F. Necheles.

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 85 (5): 873-882, 1976.

โดยทั่วไปแล้ว ใน การ หา ปริมาณ ที่เป็นเปอร์เซ็นต์ของ Hb. A_2 ในคนที่เป็น carrier ของ beta-thalassemia trait นิยมแยก Hb. A_2 โดยใช้ Cellulose acetate Electrophoresis แล้ว scan ด้วย densitometer Schmidt และพวก ได้ทดลองเปรียบเทียบการหาเปอร์เซ็นต์ของ Hb. A_2 โดย densitometer นี้กับวิธี elution และ Column chromatography ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน จากการทดลองพบว่า โดยวิธี densitometry ไม่ค่อยจะให้ผลดีในการตรวจหา beta-thalassemia trait carrier และได้มีการแนะนำให้หาร่วมไปกับการที่มีภาวะโลหิตจางร่วมไปด้วย แทนที่จะใช้การ screen หา thalassemia อย่างเดียว

F-Cells in the Adult: Normal Values and Levels in Individual with Hereditary and Acquired Elevations of Hemoglobin F

W.G. Wood, G-Starnatoyannopouls, G-Lim and P.E. Nute

Blood-46 (5): 671-682:1975

ได้มีการเตรียม Specific antibody ต่อ Hemoglobin F (Fetal Hb.) ของคน และหลัง

จากที่ conjugate กับสี fluorescent แล้วได้เอามาตรวจหา distribution ของ Hb. F ใน cell จาก blood smears ของผู้ใหญ่ปกติและในคนที่มีความ ผิด ปกติทาง ระดับ ของ Hb. F ทั้งที่เป็นมาแต่กำเนิดและมาเป็นทีหลัง พบว่าอัตราส่วนของ F-cell โดยเฉลี่ยในคนปกติคือ 2.7 +_ 1.4% โดยมีระดับระหว่าง 0.5 -7.0% อัตราส่วนของ F-cexll จะเพิ่มในคนที่มีความผิดปกติทั้งที่เป็นมาแต่ กำเนิด และ ที่เป็นภายหลัง ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของ Hb.F ใน hemolysates และพบว่าจำนวน Hb.F และอัตราส่วนของ F-cell จะสัมพันธ์กันอย่างดี วิธีนี้พบว่าจะมีประโยชน์ ในการ ศึกษา เกี่ยวกับความผิดปกติหลาย ๆ อย่าง ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของ Hb.F และรวมทั้งการตรวจหากลไกการควบคุมการเปลี่ยนจาก hemoglobin ของ fetal มาเป็น adult hemoglobin ขณะที่มี human development

Origin and Composition of Cabot Rings in Pernicious Anemia.

Lawrence Vass, M.D,
Am. J. Clin. Path. 64 : 53-57, 1975

ได้มีการศึกษาทาง Cytochemicals ในเม็ดเลือดแดงที่มี Cabot rings จาก Peripheral blood ของคนไข้ 2 คน ซึ่งเป็น Pernicious Anemia อย่างรุนแรงและยังไม่ได้รับการบำบัด จากการศึกษาพบว่า Cabot rings มีส่วนประกอบของ arginine- rich histone และ non-heme-iron โครงสร้างซึ่งอาจเป็นตัวเริ่มต้นของ Cabot rings จะพบใน Stippled late intermediate marrow megaloblasts. Cabot rings อาจเป็นผลจากส่วนหนึ่งของความผิดปกติใน metabolism ของทั้งเหล็กและ arginine-rich histone ซึ่งพบได้ใน Pernicious Anemia

ยุพา สุภาเลิศ
วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิค)

Detection of Fibrin Degradation Products: A Simplified Technic.

Joseph, Eipe, M.D., Vincet Yakulis, Am. J. Clin. Path. 64 : 509-511, 1975.

Fibrin degradation products (FDP) คือสารที่ได้จากปฏิกิริยาของ plasmin ที่มีต่อ fibrin หรือ fibrinogen ค่า FDP จะสูงในผู้ป่วยที่เป็นโรค DIC หรือสภาวะอื่น ๆ ที่ fibrinolytic system ถูกกระตุ้นขึ้น

การหา FDP ใน serum หรือ urine ทำได้หลายวิธี ได้แก่ Immunodiffusion, Immunoelectrophoresis, Tanned red cell Hemagglutination Inhibition Immunoassay (TRCHII), Staphylococcal Clumping และ Radioimmunoassay

Joseph ได้ปรับปรุงวิธี TRCHII ให้ง่ายขึ้นโดยใช้ Chromic chloride เป็นตัว treat cell แทนที่จะใช้ tannic acid

หลักการของการทำคือ FDP ใน serum ผู้ป่วยซึ่งมี antigenicity เหมือน fibrinogen จะจับกับ anti-fibrinogen ที่เติมลงไปเกินพอ ดังนั้นเมื่อเติม red cell ที่ treat ด้วย chromic chloride และ fibrinogen ลงไปก็จะไม่เกิด hemagglutination และเนื่องจากใน serum จะมี fibrin ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ จึงต้องทำลายให้หมดก่อนโดย thrombin และใส่ soy bean trypsin inhibitor เป็นตัว inhibit ไม่ให้เกิด fibrinolysis ในเลือดหลังจากเจาะ

ค่าที่ได้ในคนปกติ จะมี FDP น้อยกว่า 5 ug/ml

ในคนไข้โรค thromboembolic hepatic, renal disorders และ DIC จะมีค่า FDP 10-80 ug/ml.

Alpha Fetoprotein (AFP)

Alpha-Fetoprotein เป็น globulin ตัวหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 70,000 มี electrophoretic mobility อยู่ที่ตำแหน่ง alpha โปรตีนตัวนี้สร้างขึ้นที่ parenchymal cells ของตับ, yolk sac และ gastrointestinal tract ของทารกในครรภ์ เด็กทารกที่มีอายุ 12 สัปดาห์จะมี AFP สูงกว่าโปรตีนตัวอื่น ๆ คือจะมี AFP ประมาณ 3mg/ml และจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งเด็กคลอด เด็กอายุ 1 ปี จะมี AFP ลดเหลือเพียง 30ng/ml ในผู้ใหญ่ปกติพบว่ามี AFP อยู่ 1–16 ng/ml เมื่อหาโดยวิธี Radioimmunoassay แต่ถ้าใช้วิธี agar gel diffusion หรือ counter current electrophoresis จะ detect ไม่ได้เลย เพราะทั้งสองวิธีนี้ไม่ sensitive พอ

ประโยชน์ของการหา AFP คือมีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคตับ คนที่เป็น Liver cancer จะมีค่า AFP สูง, ใช้แยกโรค neonatal hepatitis ออกจากโรค biliary atresia โดย AFP จะ positive ในโรค Neonatal atresia เท่านั้น แต่ biliary atresia จะให้ผล negative เมื่อใช้วิธี counter current และการวินิจฉัยเด็กทารกในครรภ์ที่มีอาการของ anencephaly หรือ spina bifida ซึ่งมักจะมี AFP สูงทำให้พบได้ใน serum ของแม่สูงเช่นเดียวกัน

การหา AFP ทำได้ 3 วิธีคือ Agar gel diffusion วิธีนี้ปฏิกิริยาเกิดได้ช้า และไม่ sensitive พอ วิธี Counter current electrophoresis เป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้กันทั่วไป และวิธี Radioimmunoassay เป็นวิธีที่ sensitive ที่สุด แต่ค่อนข้างจะยุ่งยาก ไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป

หลักการของ Counter current electrophoresis โดยใช้ serum คนไข้หยอดทางขั้วบวก และ Anti – AFP หยอดทางขั้วลบใน

agarose เมื่อปล่อยให้กระแสไฟฟ้าผ่าน ถ้าใน serum คนไข้มี AFP อยู่ จะเกิด precipitin line ขึ้นตรงกลาง

นันทนา ตั้งใจตรง
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

Diagnostic Value of Serum Bile Acid Estimation in Liver Disease.

Barnes. S., Gallo, G.A., Trash, D.B. and Morris, J.S.

J. Clin. Path. 28: 506-509, 1975.

จากการหาปริมาณ Bile acid ของคนปกติ 18 คน และผู้ป่วยด้วย hepatobiliary disease ที่พิสูจน์โดยวิธี histologic method จำนวน 30 คนใน fast serum และหลังอาหาร 2 ชั่วโมง พบว่าคนปกติมีระดับของ bile acid ใน fast serum ไม่เกิน 15 umol/L และไม่เพิ่มขึ้นใน post pandrial serum ส่วนในผู้ป่วยพบว่า 27 คน มีระดับ bile acid ใน fast serum สูง และใน post pandrial serum จะสูงเกินระดับปกติทั้ง 30 คน ซึ่งการทำ Liver function test อื่น ๆ ไม่ค่อยพบความผิดปกติ จะเห็นได้ว่า bile acid โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน post pandrial serum จะเป็นวิธีที่ sensitive สำหรับโรคนี้ และมีประโยชน์ในการวินิจฉัยคนไข้ที่สงสัยว่าจะเป็น liver disease และการติดตามผลการรักษาด้วย

นันทยา วัยวัฒนะ,
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์),
วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิค)

Fluorometric Enzymatic Determination of Total Cholesterol in Serum.

By H. Huang, J.W. Kuan, and G.G. Guilbault.

Clin. Chem. 21/11: 1605-1608, 1975.

การหาค่า Serum cholesterol โดย Nonenzymatic colorimetry มีผู้นิยมใช้กันแพร่หลายทั่วไปแต่มีปัญหาคือ วิธีนี้มี poor specificity color reagent ไม่ stable. สีที่เกิดขึ้น variable มาก ผู้เขียนได้รายงานการใช้ Enzymatic method เพื่อเพิ่ม specificity ร่วมกับการใช้ Fluorometric method เพื่อเพิ่ม sensitivity ของการหา serum cholesterol โดยการ Hydrolyse cholesterol esters ให้เป็น free cholesterol โดย cholesterol ester hydrolase ส่วนของ free cholesterol ที่เกิดขึ้นรวมทั้ง initial cholesterol ถูก oxidized โดย cholesterol oxidase ให้ cholest-4-en-3-one พร้อมทั้งให้ hydrogen

peroxide และ Hydrogen peroxide ที่เกิดขึ้นจะไป oxidize Homovanillic acid in the presence of peroxidase ให้ highly fluorescent compound คือ 2,2'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-biphenyl-5,5'-diacetic acid. วัด fluorescence ที่เกิดเทียบกับผลที่ได้จาก standard.

พัตราภรณ์ ชมเชิงแพทย์
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
C. (ASCP)

Sodium Iodoacetate as an Antiglycolytic Agent in Blood Samples.

By Edward P. Marbach, Monty Mclean, Marilyn Scharn and Tom Johns.
Scientific Notes. Clin. Chem. 21/12,1810-1812 (1975).

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ก็คือ ต้องการที่จะหา antiglycolytic agents ชนิดใหม่มาใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยที่ antiglycolysis นั้นจะไม่ interfere กับการ test หาปริมาณสารอื่น ๆ ใน serum อันเดียวกันนี้

specimens ที่ใช้คือ clotted serum และ serum ที่ได้จากการเติม sodium fluoride 2.5 gm/l, Sodium iodoacetate 2 gm/l และ Sodium iodoacetate 0.5 gm/l ทดลองหา glucose และ BUN หลังจาก collect serum 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง โดยที่เก็บ serum นั้น ไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเป็นการเปรียบเทียบด้วย

สรุปผลการทดลองคือ Sodium iodoacetate ในปริมาณ 0.5 gm/l ใช้ preserve serum ได้ดีที่สุด โดยที่ไม่ทำให้เกิด glycolysis เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง นอกจากนั้นไม่ทำให้เกิด hemolysis และไม่ interfere ต่อการหาปริมาณ BUN และสารอื่นๆ ใน serum อีกด้วย.

รุจาภา นิ่มสังข์
วท.บ. (วิทยาศาสตร์การอาหาร),
วท.ม. (ชีวเคมี)

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 9 No. 2
May 1966

ข่าว

แต่งตั้งข้าราชการ

คำสั่งของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ 74/2519 ลงวันที่ 28 มกราคม 2519 แต่งตั้งให้ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ชัยโรจน์ แสงอุดม ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นพิเศษ ตำแหน่งรองศาสตราจารย์ ดำรงตำแหน่งคณบดีคณะเทคนิคการแพทย์

คำสั่งของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ 170/2519 ลงวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2519 แต่งตั้งให้ข้าราชการดำรงตำแหน่งรักษาการหัวหน้าภาควิชา ของคณะเทคนิคการแพทย์ ดังนี้.-

1. นายปัญจะ กุลพงษ์ ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นเอก ตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ และคณะแพทยศาสตร์ ให้รักษาการในตำแหน่งหัวหน้าภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปีอีกตำแหน่งหนึ่ง

2. นายสวัสดิ์ ลังการ์สิทธิ์ ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นโท ตำแหน่งอาจารย์โทคณะเทคนิคการแพทย์ ให้รักษาการในตำแหน่งหัวหน้าภาควิชาเคมีคลินิค อีกตำแหน่งหนึ่ง

3. นายกัมพล พนัศอำพล ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นพิเศษ ตำแหน่งศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ให้รักษาการในตำแหน่งหัวหน้า ภาค วิชา จุลชีววิทยาคลินิค อีกตำแหน่งหนึ่ง

4. นายสนิท มกรแก้วเกยูร ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นเอก ตำแหน่งอาจารย์เอก คณะเทคนิคการแพทย์ ให้รักษาการในตำแหน่งหัวหน้าภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค อีกตำแหน่งหนึ่ง

คำสั่งของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ 171/2519 ลงวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2519 แต่งตั้งหัวหน้าโครงการจัดตั้งสาขาวิชา ในคณะเทคนิคการแพทย์ ดังนี้:-

1. นายสนาน สิมารักษ์ ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นพิเศษ ตำแหน่งศาสตราจารย์ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ให้ดำรงตำแหน่งหัวหน้าโครงการจัดตั้งสาขาวิชารังสีเทคนิคคณะเทคนิคการแพทย์ อีกตำแหน่งหนึ่ง

2. นายเทอดชัย ชีวะเกตุ ข้าราชการ

พลเรือนสามัญชั้นเอก ตำแหน่งอาจารย์เอกภาควิชา ศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิคส์ และกายภาพบำบัด คณะแพทยศาสตร์ ให้ดำรงตำแหน่งหัวหน้าโครงการจัดตั้งสาขาวิชาอาชีวบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ อีกตำแหน่งหนึ่ง

คำสั่งของ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ 237/2519 ลงวันที่ 16 มีนาคม 2519 แต่งตั้งให้นายสนอง ไชยารัศมี ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นโท ตำแหน่งอาจารย์โท ภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี ให้รักษาการในตำแหน่งเลขานุการคณะเทคนิคการแพทย์ อีกตำแหน่งหนึ่ง

คำสั่ง ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่251/2519 ลงวันที่ 22 มีนาคม 2519 แต่งตั้งให้นายไพโรจน์ สภาวจิตร ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นโท ตำแหน่งอาจารย์โท ภาควิชาเคมีคลินิค ให้ดำรงตำแหน่งผู้ช่วยคณบดีฝ่ายกิจการนักศึกษา อีกตำแหน่งหนึ่ง

งานว่าง

โรงพยาบาลจิตเวช จังหวัดขอนแก่น มีอัตราว่าง ขั้น 1,750.-บาท จำนวน 1 ตำแหน่ง สำหรับนักเทคนิคการแพทย์ พร้อมกับจัดสรรบ้านพักให้ด้วย สนใจโปรดติดต่อโดยตรงได้ที่ผู้อำนวยการโรงพยาบาล

ห้างฯ วุฒิอุปกรณ์ มีอัตราว่าง ขั้น 2,500.-บาท จำนวน 2 ตำแหน่ง สำหรับนักเทคนิคการแพทย์ สนใจโปรดติดต่อโดยตรงกับคุณวุฒิเยาวภา ห้าง ฯ วุฒิอุปกรณ์ 166/11 ถนนประชาราษฎร์สาย 2 ตำบลบางซื่อ อำเภอดุสิต กรุงเทพมหานคร โทรศัพท์ 857228, 853177.

ข้าราชการใหม่

คณะเทคนิคการแพทย์ ได้ดำเนินการคัดเลือกบุคคลเพื่อบรรจุเป็นอาจารย์และข้าราชการของคณะ ฯ ซึ่งได้แก่บุคคลต่อไปนี้.–

ตำแหน่งประจำแผนกธุรการ ได้แก่ น.ส. วันทนา เขจรนันทน์

ตำแหน่งช่างตรี ได้แก่ นายนรินทร์ จันทรังศรี

ตำแหน่งอาจารย์ตรีในภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี ได้แก่ น.ส.สุชาดา ตาวารัตน์

ตำแหน่งอาจารย์ตรี ในโครงการจัดตั้งสาขาวิชารังสีเทคนิค ได้แก่ น.ส. อุทุมมา มัฆะเนมี, น.ส. จิตติพร เขียนประสิทธิ์

ตำแหน่งอาจารย์ตรีในโครงการจัดตั้งสาขาวิชาอาชีวบำบัด ได้แก่ น.ส. พรทิพย์ ธีรสวัสดิ์, น.ส. สว้อยสุดา เรืองศรี