นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจพบฮีโมโกลบินเอสในคนไทย

ยศสมบัติ จังตระกูล[1]
วิษิษย์ศักดิ์ สุขสะอาด[2]
กุลนภา ฟู่เจริญ[3]
กนกวรรณ แสนไชยสุริยา[4]
สุพรรณ ฟู่เจริญ[5]

Abstract:

Identification of Hb S in Thai patients

Changtrakun Y, Suksa-ard V, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S

Department of Clinical Chemistry,

Department of Clinical Microscopy,

Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

Bumrungrad Hospital, Bangkok

Songkla Med J 2002; 20(3): 201-209

Two cases of Thai subjects with abnormal hemoglobin (Hb) detected on a cellulose acetate electrophoresis are reported. Both abnormal Hb S migrated between Hb A_2 and Hb A at pH 8.6. In the first case, a 23-yr-old Thai male, hematologic analysis gave the following data: Hb 15.0 g/dl, Hct 43 %, MCV 83 fl, MCH 29 pg, MCHC 35 g/dl and RDW 14.2%. The second case, a 26-yr-old Thai male, had Hb 16.3 g/dl, Hct 48 %, MCV 88 fl, MCH 30 pg, MCHC 34 g/dl and RDW 12.5%. Analysis using an automated HPLC Hb Analyzer identified abnormal Hb peaks with 39.2% at the S-window in the

[2]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), นักเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลบำรุงราษฎร์ กรุงเทพฯ
[1]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), นักศึกษาปริญญาโท คณะเทคนิคการแพทย์ [3]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี), รองศาสตราจารย์
[4]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน), รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก
[5]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี), D.Sc. (Mol Biol), รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
รับต้นฉบับวันที่ 28 มีนาคม 2545 รับลงตีพิมพ์วันที่ 17 กันยายน 2545

former and a 33.1% at the D-window in the latter. Since the mobility of these two abnormal Hbs are similar to that of the Hb Tak, another common abnormal Hb found in Thailand, identification of the β^{Tak} mutation using an allele specific PCR was carried out. With this analysis, the β^{Tak} mutation was detected in the latter, indicating that he was a Hb Tak heterozygote, but not in the former case. Further DNA sequence analysis of the β-globin gene of the first case identified a GAG (Glu) to GTG(Val) mutation at codon 6 which is characteristic of the Hb S. Screening for Hb S using the Sickling test was also positive in this case. β-globin gene haplotype analysis demonstrated the heterozygosity of the two different haplotypes in this subject. Though the β^{S} associated haplotype could not be clearly defined in this Thai subject with Hb S carrier, it was presumed that the Thai β^{S} gene had the same origin as that of Indians due to similarities at some polymorphic sites. A simple DNA assay based on allele specific PCR for rapid diagnosis of the Hb S is also described.

Key words: *Hemoglobin S, ASPCR, β-globin gene haplotype*

บทคัดย่อ:

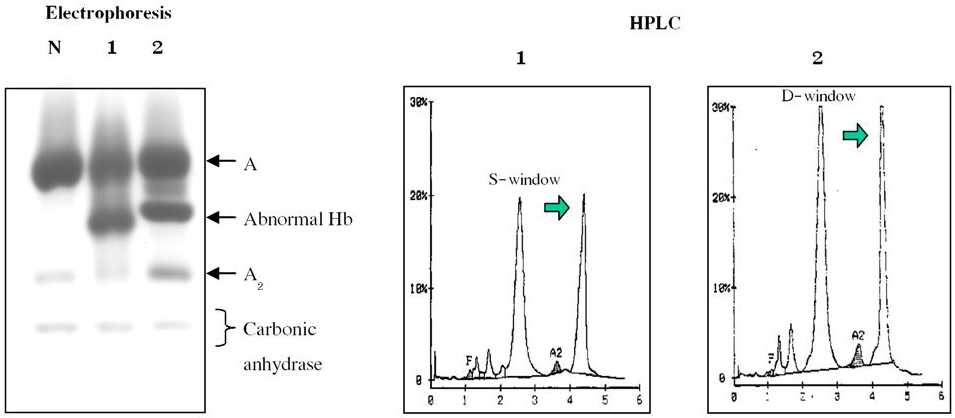
ได้ตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติในคนไทย 2 ราย โดยวิธี cellulose acetate electrophoresis ที่ pH 8.6 พบแถบฮีโมโกลบินเคลื่อนที่อยู่ระหว่างแถบของ Hb A_2 และ Hb A รายแรกเป็นชายอายุ 23 ปี มีข้อมูลทางโลหิตวิทยาดังนี้ Hb 15.0 g/dl, Hct ร้อยละ 43 , MCV 83 fl, MCH 29 pg, MCHC 35 g/dl และ RDW ร้อยละ 14.2 รายที่สองเป็นชายอายุ 26 ปี มีข้อมูลทางโลหิตวิทยาดังนี้ Hb 16.3 g/dl, Hct ร้อยละ 48 , MCV 88 fl, MCH 30 pg, MCHC 34 g/dl และ RDW ร้อยละ 12.5 เมื่อตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง HPLC automated Hb analyzer พบว่าฮีโมโกลบินผิดปกติในรายแรกถูกแยกออกมาที่ตำแหน่ง S-window ปริมาณร้อยละ 39.2 ส่วนรายที่สอง ฮีโมโกลบินผิดปกติถูกแยกออกมาที่ D-window ปริมาณร้อยละ 33.1 ใกล้เคียงกับตำแหน่งของ Hb Tak ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้บ่อยในคนไทย แต่เมื่อตรวจยืนยัน Hb Tak ด้วยวิธี PCR พบว่าให้ผลบวกเฉพาะในรายที่สอง จึงได้ศึกษารายแรกต่อโดยวิธี DNA sequencing ตรวจพบการกลายพันธุ์ GAG(Glu)-GTG(Val) ที่ตำแหน่งโคดอน 6 ของยีนบีตาโกลบิน ทำให้เกิด Hb S สอดคล้องกับผลการตรวจกรองด้วยวิธี Sickling test ผลการศึกษาแฮพโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินพบเป็น เฮเทอโรไซโกท จึงไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่า Hb S ที่พบในคนไทยนี้มีแหล่งกำเนิดจากที่ใด แต่คล้ายกับที่พบในอินเดีย จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจจะเป็นคนไทยเชื้อสายอินเดียและเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีความถูกต้อง จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจยืนยัน Hb S ด้วยวิธี allele specific PCR ขึ้น

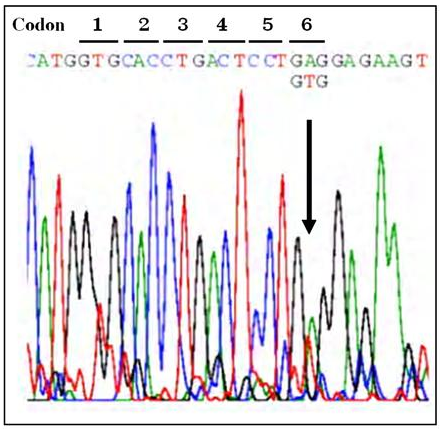
คำสำคัญ: *ฮีโมโกลบินเอส, เอเอสพีซีอาร์, บีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์*

บทนำ

ฮีโมโกลบินผิดปกติเกิดจากความผิดปกติของยีนโกลบินที่มีผลให้เกิดการสร้างสายโกลบินผิดปกติและประกอบเป็นโมเลกุลฮีโมโกลบินที่มีโครงสร้างผิดปกติขึ้น ที่พบได้บ่อยและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศไทยคือ ฮีโมโกลบินอี (Hb E; $\alpha_2\beta_2^{26\ Glu\rightarrow Lys}$) และฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb Constant Spring; $\alpha_2^{141\ Ter\rightarrow Gln}\beta_2$)[1] นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติอีกหลายชนิด เช่น ฮีโมโกลบิน Tak ($\alpha_2\beta_2^{146+11\ aa}$)[2], ฮีโมโกลบิน C ($\alpha_2\beta_2^{6\ Glu\rightarrow Lys}$)[3] และฮีโมโกลบิน Pyrgos ($\alpha_2\beta_2^{83\ Gly\rightarrow Asp}$)[4] เป็นต้น การตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติทำได้หลายวิธี เช่น การแยกด้วยวิธี cellulose acetate หรือ starch gel electrophoresis, การตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติโดยหลักการ high performance liquid chromatography (HPLC) ตลอดจนการตรวจวิเคราะห์โครงสร้างของดีเอ็นเอและโปรตีน[5] เนื่องจากฮีโมโกลบินเหล่านี้หลายชนิดไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ด้วยวิธีทั่วไปที่ใช้ในงานประจำวันโดยเฉพาะชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานตรวจพบในคนไทยมาก่อน ปัจจุบันจึงมักต้องตรวจในระดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยันความผิดปกติในระดับยีนเสียก่อน ฮีโมโกลบินผิดปกติบางชนิดมีผลต่อโครงสร้างและการทำหน้าที่ของฮีโมโกลบินจึงอาจก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ กันได้ขึ้นกับชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกตินั้น ๆ

เช่น Hb E เมื่อพบร่วมกับบีตาธาลัสซีเมียจะทำให้ผู้ป่วยเป็นโรค β-thal/Hb E ที่มีอาการซีด เหลือง และบางรายจำเป็นต้องได้รับการให้เลือด ในขณะที่ฮีโมโกลบิน C ซึ่งมีแถบของฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตำแหน่งเดียวกับ Hb E เมื่อตรวจโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis ที่ pH 8.6 ไม่ทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียเมื่อพบร่วมกับบีตาธาลัสซีเมียแต่อย่างใด ดังนั้นความถูกต้องแม่นยำในการตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติและการรายงานผลจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยและการดูแลรักษาผู้ป่วย ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ยังไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้แน่นอน[6] สำหรับ Hb S นั้น มีรายงานตรวจพบมากในคนอินเดีย คนแอฟริกัน และคนนิโกร แต่ยังไม่เคยมีรายงานในคนไทย การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกของการตรวจพบ Hb S ในคนไทย ที่แสดงถึงแนวทางการตรวจวินิจฉัยแยก Hb S ออกจากฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นที่พบบ่อยกว่าและได้พัฒนาวิธีการตรวจยืนยัน Hb S ขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการตรวจดีเอ็นเอ เพื่อใช้การตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการต่อไป





รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหาชนิดฮีโมโกลบินในคนไทยทั้ง 2 ราย ด้วยวิธี Cellulose acetate electrophoresis และ HPLC N คือ คนปกติ, 1 และ 2 หมายถึง รายที่ 1 และ รายที่ 2 ตามลำดับ และผลการตรวจหาลำดับเบสของยีนบีตาโกลบินโดยตรงในรายที่ 1 ซึ่งตรวจพบการกลายพันธ์แบบเฮเทอโรไซโกทที่ตำแหน่ง โคดอนที่ 6 (GAG-GTG) ซึ่งเป็นผลให้เกิดเป็น Hb S

หน้า บันทึกย่อที่ไม่ได้จัดหมวดหมู่ 1

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด

ศึกษาในคนไทยที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติที่ยังไม่ทราบชนิด จำนวน 2 ราย (รูปที่ 1) รายแรกเป็นชายมีเชื้อชาติไทยและสัญชาติไทย อายุ 31 ปี ซึ่งมารับการตรวจสุขภาพประจำปีที่โรงพยาบาลบำรุงราษฎร์ กรุงเทพ รายที่สองเป็นชายไทย อายุ 26 ปี เป็นสามีของหญิงตั้งครรภ์ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจกรองธาลัสซีเมียที่ถูกตามมารับการตรวจที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยภรรยาให้ผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินเป็น EE มีปริมาณฮีโมโกลบิน E ร้อยละ 83.5 และฮีโมโกลบิน F ร้อยละ 2.6 ทั้งสองรายได้รับการเจาะเก็บเลือดโดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งเพื่อส่งไปรับการตรวจวิเคราะห์ต่อที่คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาข้อมูลทางโลหิตวิทยา

ตัวอย่างเลือดที่ได้นำมาศึกษาค่า Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC และ RDW ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Sysmex K-4500) ตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis ที่ pH 8.6 และเครื่อง HPLC automated Hb analyzer (Variant HPLC, Bio-Rad Laboratories, Inc.) การทดสอบ Sickling test ใช้วิธี sodium dithionite เป็น reducing agent และตรวจดูเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์[7]

2.2 การตรวจวิเคราะห์ยีนโกลบินและการศึกษาบีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์

การตรวจยืนยัน Hb Tak ใช้วิธี allele specific PCR (ASPCR) ตามรายละเอียดที่ได้ตีพิมพ์ไว้แล้ว[4] ส่วนการตรวจหาลำดับเบสของยีนบีตาโกลบินโดยตรงและการศึกษาแฮพโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินจากการตรวจสอบดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสม (DNA polymorphism) จำนวน 7 ตำแหน่งภายในกลุ่มยีนบีตาโกลบินประกอบด้วย Hinc II-ε, HindIII-$^{G}\gamma$, Hind III-$^{A}\gamma$, Hinc II-$\psi\beta$, Hinc II-3'$\psi\beta$, Ava II-β และ Bam H I-3'β เป็นไปตามรายงานการวิจัยที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ไว้แล้วเช่นกัน[8, 9]

2.3 การตรวจยืนยัน Hb S โดยวิธี ASPCR

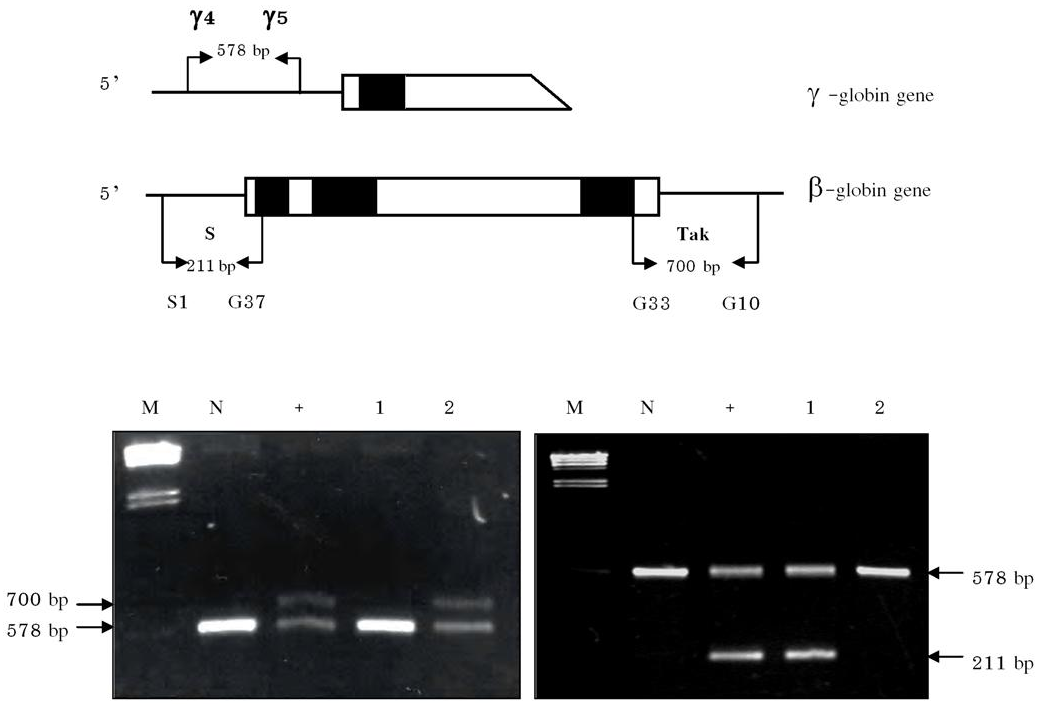
รูปที่ 2 แสดงวิธีการและตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีน β^S โดยอาศัยหลักการคล้ายกับการตรวจยืนยัน Hb Tak ด้วยวิธี ASPCR โดยใช้ไพรเมอร์ G37 (5'-AGTAACGGCAGACTTCTCCA-3') ซึ่งจำเพาะต่อยีน β^S และไพรเมอร์ S1 (5'-TGTCATCACTTAGACCTCAC-3') ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน β^S ขนาด 211 bp โดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 578 bp ที่ได้จากส่วนโปรโมเตอร์ของยีน $^{G}\gamma$-globin[10] ทำหน้าที่เป็น internal control ของการทำ PCR สภาวะในการทำ PCR ประกอบด้วย 94^{O}C 3 นาที 1 รอบ ตามด้วย (94^{O}C 1 นาที - 68^{O}C 1:30 นาที) จำนวน 30 รอบ โดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus co.) จากนั้นตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของคนไทยทั้ง 2 ราย ซึ่งมีค่าทางโลหิตวิทยาต่าง ๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติทั้งหมด แต่เมื่อนำไปตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis ที่ pH 8.6 พบแถบฮีโมโกลบินผิดปกติเคลื่อนที่อยู่ระหว่างแถบของฮีโมโกลบิน A_2 และ ฮีโมโกลบิน A โดยทั้งสองรายตรวจพบแถบฮีโมโกลบินผิดปกตินี้ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันมาก และเมื่อนำไปแยกด้วยวิธี HPLC automated Hb analyzer พบว่าในรายแรก ฮีโมโกลบินผิดปกตินี้ถูกแยกออกมาที่ตำแหน่ง S-window โดยมีปริมาณร้อยละ 33.1 แต่รายที่ 2 ถูก แยกออกมาที่ตำแหน่ง D-window มีปริมาณร้อยละ 39.2 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 ซึ่งแถบฮีโมโกลบินผิดปกติที่ตำแหน่งดังกล่าวนี้ ใกล้เคียงกับตำแหน่งของ Hb Tak ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานตรวจพบบ่อยในคนไทย[4] จึงได้ทำการตรวจต่อไปในระดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยัน Hb Tak โดยวิธี ASPCR ผลการตรวจพบว่ารายที่ 1 ให้ผลลบต่อยีน β^{Tak} แต่รายที่ 2 ให้ผลเป็นบวก และเนื่องจากรายที่ 2 ตรวจพบฮีโมโกลบิน A ด้วย จึงสรุปได้ว่า รายที่ 2 มีจีโนไทป์เป็น heterozygous Hb Tak (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางโลหิตวิทยาและผลการตรวจดีเอ็นเอของคนไทย 2 ราย ที่ศึกษา

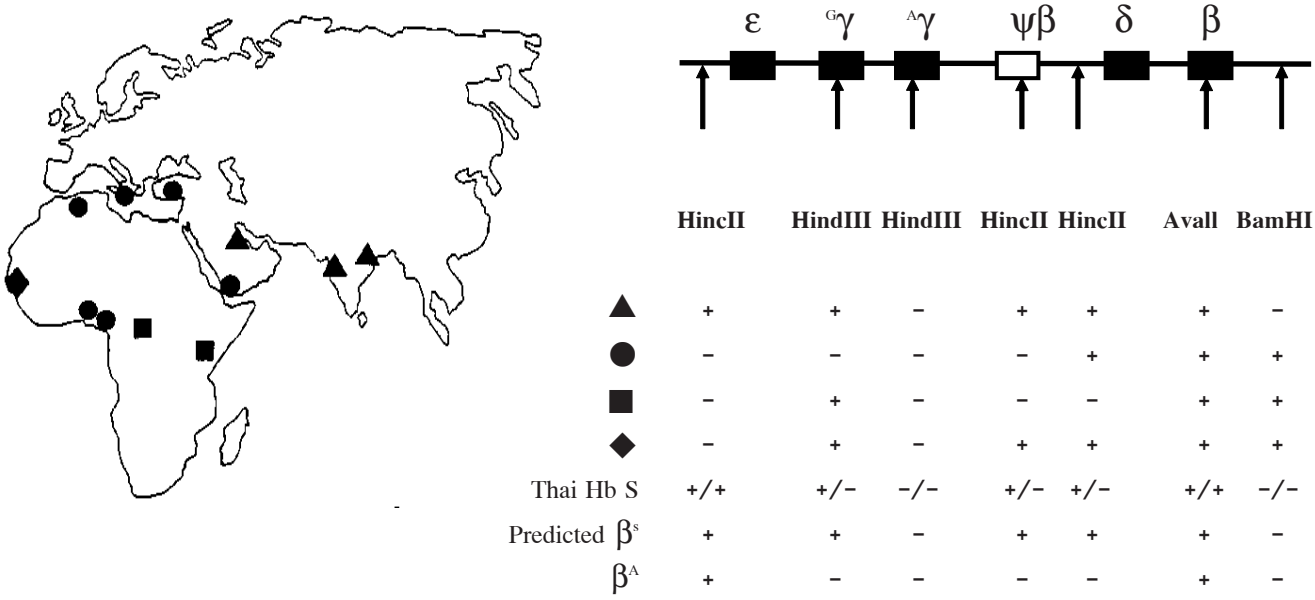
	รายที่ 1	รายที่ 2
Sex/Age	M / 31	M / 26
Hb (g/dl)	15.0	16.3
Hct (ร้อยละ)	43	48
MCV (fl)	83	88
MCH (pg)	29	30
MCHC (g/dl)	35	34
RDW (ร้อยละ)	14.2	12.5
Hb Typing	A_2SA	A_2TakA
Hb A2 (ร้อยละ)	3.2	3.7
Abnormal Hb (ร้อยละ)	39.2	33.1
α-globin genotype	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$
β-globin genotype	β^A / β^S	β^A / β^{Tak}



รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธ์ของ Hb S และ Hb Tak ด้วยวิธี ASPCR ของทั้งสองราย (1 และ 2) M คือ λ/Hind III size marker, N คือ คนปกติ, + คือ positive control ของการกลายพันธ์แต่ละชนิด จากการตรวจพบว่า รายที่ 1 ให้ผลบวกต่อยีน β^S ส่วนรายที่ 2 ให้ผลบวกต่อยีน β^{Tak} ตามลำดับ

เนื่องจากตำแหน่งของฮีโมโกลบินผิดปกติในรายแรกนั้นมีตำแหน่งตรงกับ Hb S จึงได้ทำการทดสอบ Sickling test ซึ่งเป็นวิธีทั่วไปที่ใช้สำหรับการตรวจคัดกรอง Hb S พบว่าให้ผลบวก อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก Hb S เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่ไม่ค่อยพบในคนไทย จึงได้ทำการศึกษาเพื่อยืนยันในระดับดีเอ็นเอโดยวิธี direct DNA sequencing พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 6 ของยีน β-globin โดยเปลี่ยนจากรหัส GAG เป็น GTG ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งเป็นผลให้ glutamic acid ที่ตำแหน่งโคดอน 6 นี้ถูกแทนที่ด้วย valine และทำให้เกิด Hb S จึงสรุปได้ว่า รายแรกเป็น heterozygous Hb S ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจกรองและการตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยเครื่องอัตโนมัติ และเพื่อเป็นการแก้ปัญหาในการตรวจวินิจฉัย Hb S ในห้องปฏิบัติการ จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจยืนยันยีน β^S ขึ้นโดยอาศัยหลักการ allele specific PCR ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยผู้ที่มี Hb S จะตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 211 bp เพิ่มจากคนปกติที่ให้เฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 578 bp วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงสามารถใช้ตรวจยืนยัน Hb S ได้แน่นอน ผลการศึกษา β-globin gene haplotypes ในรายนี้พบ polymorphism ทั้ง 7 ตำแหน่งที่ระบุไว้ในวิธีการศึกษาเรียงตามลำดับเป็นแบบ +/+ , +/- , -/- , +/- , +/- , +/+ และ -/- ตามลำดับ (รูปที่ 3)

หน้า บันทึกย่อที่ไม่ได้จัดหมวดหมู่ 1



รูปที่ 3 ลักษณะแฮพโพลไทป์ที่สัมพันธ์กับยีน Hb S ที่พบในผู้ป่วยไทยเปรียบเทียบกับที่พบในกลุ่มคนแอฟริกาและอินเดีย[21]

วิจารณ์

จากการตรวจหาชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติของคนไทยสองรายที่ตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติโดยวิธี cellulose acetate electrophoresis ที่ pH 8.6 โดยพบแถบฮีโมโกลบินผิดปกติเคลื่อนที่อยู่ระหว่างแถบของ Hb A_2 และ Hb A แต่ไม่พบความผิดปกติของข้อมูลทางโลหิตวิทยาอื่นๆ เนื่องจากในแต่ละรายพบแถบฮีโมโกลบินเพียงแถบเดียวในปริมาณค่อนข้างสูงคือร้อยละ 39.2 และร้อยละ 33.1 ตามลำดับ และมีปริมาณ Hb A_2 อยู่ในเกณฑ์ปกติ ซึ่งเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ว่าฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทั้งสองราย น่าจะเกิดจากความผิดปกติของยีนบีตาโกลบินมากกว่ายีนอัลฟาโกลบิน ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของทั้งสองรายก็สามารถสรุปได้ว่ารายแรกเป็นพาหะของ Hb S ($\alpha_2\beta_2^{6\ Glu\rightarrow Val}$) ส่วนรายที่สองเป็นพาหะของ Hb Tak ($\alpha_2\beta_2^{146+11\ aa}$) (ตารางที่ 1)

การตรวจพบ Hb Tak ในรายที่สองนั้นไม่น่าแปลกใจ เนื่องจากเคยมีรายงานตรวจพบมาก่อนแล้วในคนไทยที่มีลักษณะฟีโนไทป์คล้ายกันและพบได้บ่อย ๆในทุกภูมิภาคของประเทศ[4] Hb Tak เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 146 ของยีนบีตาโกลบิน โดยมี AC insertion เป็นผลให้เกิดการสร้างสายโกลบินที่มีกรดอะมิโนยาวออกไปจากปกติอีก 10 ตัว และมีคุณสมบัติของ high oxygen affinity เมื่อพบร่วมกับบีตาธาลัสซีเมีย อาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการ polycythemia ที่รุนแรงได้[11] ส่วนผู้ที่เป็นพาหะของ Hb Tak จะไม่แสดงอาการใดๆ ให้เห็นสอดคล้องกับข้อมูลทางโลหิตวิทยาในรายที่สอง และจากผลการตรวจชนิดฮีโมโกลบินของภรรยาในรายดังกล่าวพบว่าเป็น homozygous Hb E ดังนั้นลูกจึงมีโอกาสเป็น compound heterozygous Hb Tak/Hb E ซึ่งจะไม่มีอาการของธาลัสซีเมีย แต่อาจพบภาวะ mild polycythemia ได้[12] การตรวจยืนยัน Hb Tak ทำได้ง่ายด้วยวิธี allele specific PCR ที่รายงานไว้ก่อนแล้ว[4] และได้แสดงไว้ในรูปที่ 2 ด้วย

สิ่งที่น่าสนใจคือ การตรวจพบว่ารายแรกเป็นพาหะของ Hb S ซึ่งเป็นสาเหตุของ Sickle cell anemia ที่พบบ่อยในกลุ่มคนผิวดำในแอฟริกาซึ่งพบผู้ที่เป็นพาหะเฉลี่ยประมาณร้อยละ 20 พบได้ประมาณร้อยละ 8 ในกลุ่มชาวอเมริกันนิโกร นอกจากนี้มีรายงานตรวจพบได้ในประเทศอินเดียและกลุ่มประเทศตะวันออกกลางด้วย[13,14] แต่มีรายงานการตรวจพบน้อยมากในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับในประเทศไทยเคยมีรายงานเบื้องต้นถึงการตรวจพบ Hb S ร่วมกับบีตาธาลัสซีเมียเพียง 1 รายงานเท่านั้น ในที่ประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติในปี พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดเชียงใหม่ โดยรายงานคนไทยที่ไม่ทราบเชื้อสายแน่ชัดครอบครัวหนึ่ง แต่น่าเสียดายที่ขาดการศึกษาข้อมูลรายละเอียดลึกถึงในระดับโครโมโซม ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่า Hb S ที่พบนั้นมีต้นกำเนิดมาจากที่ใดและเป็นคนไทยหรือไม่[15] แต่

อย่างน้อยก็เป็นข้อมูลที่เริ่มแสดงให้เห็นว่าอาจพบ Hb S ในประเทศไทยได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญ การพัฒนาวิธีการตรวจยืนยัน Hb S ในระดับดีเอ็นเอขึ้น โดยอาศัยหลักการ ASPCR ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งสามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว จะสามารถเสริมการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นให้สามารถวินิจฉัยฮีโมโกลบินผิดปกติได้อย่างถูกต้องยิ่งขึ้น เนื่องจากในประเทศไทยนอกจาก Hb S และ Hb Tak ที่เคลื่อนที่อยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันแล้ว ยังมีฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดอื่นที่เคลื่อนที่อยู่ในบริเวณเดียวกันนี้ที่ตรวจพบในคนไทยด้วยเช่นกัน เช่น Hb D-Punjab ($\alpha_2\beta_2^{121\ Glu\rightarrow Gln}$)[16, 17], Hb G-Coushatta ($\alpha_2\beta_2^{22\ Glu\rightarrow Ala}$)[18], Hb Korle-Bu ($\alpha_2\beta_2^{73\ Asp\rightarrow Asn}$)[19] และฮีโมโกลบินผิดปกติอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่เคลื่อนที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกันนี้ในคนไทย นอกจากนี้ยังตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติซึ่งยังไม่ทราบชนิดแน่นอนที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปอีกจำนวนหลายราย ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าในการแยกชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติในห้องปฏิบัติการทั่วไปนั้น นอกจากจะต้องมีการควบคุมคุณภาพที่ดีแล้วเพื่อความถูกต้องของการวินิจฉัยอาจจำเป็นต้องอาศัยการตรวจยืนยันในระดับดีเอ็นเอก่อนการรายงานผล จึงเชื่อว่าวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นในรายงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ต่อการตรวจวินิจฉัยฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการต่อไป

โดยทั่วไปในภาวะปกติ ผู้ที่เป็นพาหะ Hb S จะไม่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงเห็นได้จากค่าทางโลหิตวิทยาของรายแรกเป็นปกติทั้งหมด แต่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจน หรือมี pH ต่ำ จะเกิดการเรียงตัวเป็นพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นแท่งยาวซ้อนกันภายในเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงยืดตัวเกิดเป็น Sickle cell ขึ้น ความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงดังกล่าวมีผลให้เม็ดเลือดแดงขาดความยืดหยุ่น แตกง่าย เกิดการอุดตันของหลอดเลือด และมีอายุสั้นลง ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะต่าง ๆ ได้ โดยเฉพาะในผู้ที่เป็น homozygous Hb S จะมีอาการซีดรุนแรง มีค่า Hb อยู่ในช่วง 5-11 g/dl และหากพบร่วมกับบีตาธาลัสซีเมียจะมีอาการรุนแรงต่าง ๆ กัน ขึ้นกับชนิดของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่พบด้วย[14]

จากการศึกษาถึงต้นกำเนิดของ Hb S ในประชากรโลกโดยศึกษาจากลักษณะและรูปแบบของโครโมโซมที่แสดงด้วยชนิดของแฮพโพลไทป์ของกลุ่มยีนบีตาโกลบินพบว่าในทวีปแอฟริกา Hb S จะมีต้นกำเนิดที่สัมพันธ์กับบีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์แตกต่างกันถึง 3 ชนิด คือ Benin type (- - - - + + +), Bantu type (- + - - - + +) และ Senegal type (- + - + + + +) ส่วนในประเทศอินเดีย Hb S จะสัมพันธ์กับบีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์ชนิด (+ + - + + + -) เพียงชนิดเดียวและมีต้นกำเนิดต่างจากที่ตรวจพบในทวีปแอฟริกา[20, 21] ดังแสดงในรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าจากการศึกษาบีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์เพื่อศึกษาต้นกำเนิดของ Hb S ที่พบในคนไทยรายแรกนั้นให้ผลเป็น +/+ , +/- , -/- , +/- , +/- , +/+ และ -/- ตามลำดับ เนื่องจากขาดข้อมูลของญาติ และครอบครัว จึงไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่ายีน Hb S ที่พบในคนไทยรายนี้สัมพันธ์กับบีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์แบบใดและมีแหล่งกำเนิดจากที่ใดแน่นอน แต่หากพิจารณาถึงความเป็นไปได้จะเห็นว่า โพลีมอร์ฟิสมตำแหน่งแรก คือ Hinc II-5' ของ ε-globin gene ให้ผลเป็น +/+ แสดงว่า บีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์ที่ตำแหน่งดังกล่าวของยีน β^S ในคนไทยรายนี้จะต้องเป็น + เท่านั้น ยีน β^S ของชาวไทยรายนี้จึงน่าจะอยู่บนแฮพโพลไทป์ชนิดเดียวกับที่พบในคนอินเดียคือ ชนิด (+ + - + + + -) ทำให้อีกข้างหนึ่งของโครโมโซมมีบีตาโกลบินยีนแฮพโพลไทป์เป็นชนิด (+ - - - - + -) ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้อยู่แล้วสำหรับยีน β^A ในคนไทยทั่วไป[22, 23] จากข้อสันนิษฐานและการวิเคราะห์แบบนี้เชื่อว่า Hb S ที่พบในคนไทยรายนี้ไม่น่าจะเป็นชนิดที่เกิดขึ้นเองในประเทศไทย แต่เป็น Hb S ที่อาจจะมีต้นกำเนิดจากคนอินเดียซึ่งต่างจากที่พบในแอฟริกาดังได้กล่าวแล้วข้างต้น การศึกษา Hb S ต่อไปในคนไทยให้มากขึ้นจะช่วยพิสูจน์ข้อสันนิษฐานนี้ และทำให้ได้ข้อมูลทางด้านประชากรพันธุศาสตร์ที่ชัดเจนขึ้น แนวทางและวิธีการที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในเรื่องนี้ต่อไป

สรุป

จากการศึกษาฮีโมโกลบินผิดปกติในคนไทย 2 ราย ด้วยการตรวจเลือดและดีเอ็นเอพบว่าเป็นพาหะ Hb Tak 1 ราย และพาหะ Hb S 1 ราย เนื่องจาก Hb S ยังไม่เคยมีรายงานในคนไทยมาก่อน จึงได้ทำการศึกษาแฮพโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน ผลการศึกษาไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่า Hb S ที่พบในคนไทยนี้มีแหล่งกำเนิดจากที่ใด แต่คล้ายกับที่พบในอินเดียจึงเป็นไปได้ว่า อาจจะเป็นคนไทยเชื้อสายอินเดีย นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการตรวจยืนยัน Hb S ด้วยวิธี allele specific PCR ขึ้นด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช)

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987; 11: 65-88.
2. Flatz G, Kinderlerer JL, Kilmartin JV, Lehmann H. Haemoglobin Tak: a variant with additional residues at the end of the beta-chains. Lancet 1971; 1: 732-733.
3. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Siriratmanawong N, Surapot S, Fucharoen S. Molecular characterization of hemoglobin C in Thailand. Am J Hematol 2001; 67: 189-193.
4. Fucharoen S, Fucharoen G, Sae-ung N, Sanchaisuriya K, Fukumaki Y. Molecular and hematological characterization of Hb Tak and Hb Pyrgos in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 28(supp.3): 110-114.
5. Svasti J, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S. Detection and structural analysis of abnormal hemoglobin found in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1999; 30: 88-93.
6. Huisman THJ. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. Bailliere's Clin Haematol 1993; 6: 1-30.
7. Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. Seventh edition, New York: Churchill-Livingstone, 1991; 31-37.
8. Fucharoen S, Fucharoen G, Sriroongrueng W, Laosombat V, Jetsrisuparb A, Prasatkaew S, et al. Molecular basis of β-thalassemia in Thailand: analysis of β-globin gene mutations using the polymerase chain reaction. Hum Genet 1989; 84: 41-46.
9. Fukumaki Y, Fucharoen S. Generation and spread of globin mutations in populations: β-thalassemiain Asian countries. In: Kimura M, Takahata N, eds. New Aspects of the Genetics of Molecular Evolution. Springer-Verlag, Berlin 1991; 153-176.
10. Fucharoen Sp, Shimizu K, Fukumaki Y. A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the $^{G}\gamma$ globin gene in the Japanese HPFH: implication of factor binding in elevated fetal globin expression. Nucleic Acids Res 1990; 18: 5245-5253.
11. Lehmann H, Casey R, Lang A, Stathopoulou R, Imai K, Tuchida S, et al. Haemoglobin Tak: β-chain elongation. Br J Haematol 1975; 31: 119-130.
12. Hoyer JD, Wick MJ, Thibodeau SN, Viker KA, Conner R, Fairbanks VF. Hb Tak confirmed by DNA analysis: not expressed as thalassemia in a Hb Tak/Hb E compound heterozygote. Hemoglobin 1998; 22: 45-52.
13. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. Bailliere's Clin Haematol 1998; 11: 1-51.
14. Bunn HF. Human hemoglobins: Sickle hemoglobin and other mutants. In : Stamatoyanopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. The molecular basis of blood diseases. 3rd edition: W.B. Saunders company, Philadelphia 2001: 227-274.
15. Jainog C, Steger HF, Sanguansermsri T. Sickle cell hemoglobin and β^{O}-thalassemia in a Thai family: a preliminary report. บทคัดย่อเสนอในการประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 4, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2-4 กันยายน 2541.
16. Wasi P, Pootrakul S, Na-Nakorn S, Beale D, Lehman H. Haemoglobin D-β Los Angeles (D Punjab, $\alpha_2\beta_2^{121}$ Glu NH2) in a Thai family. Acta Haematol 1968; 39: 151-158.
17. Fucharoen S, Changtrakun Y, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Molecular characterization of Hb D-Punjab [β121(Glu→Gln)] in Thailand. Hemoglobin 2002; 26: 271-279.
18. Itchayanan D, Svasti J, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S. Hb G-Coushatta [beta22(B4)Glu-Ala] in Thailand. Hemoglobin 1999; 23: 69-72.
19. Changtrakun Y, Fucharoen S, Ayukarn K, Siriratmanawong N, Gucharoen G, Sanchaisuriya K. Compound heterozygosity for Hb Korle-Bu (β^{73}; Asp-Asn) and Hb E (β^{26}; Glu-Lys) with a 3.7 kb deletional α-thalassemia in Thai patients. Ann Hematol 2002; 81: 389-393.
20. Nagel RL, Ranney HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the β globin gene. Semin Hematol 1990; 27: 342-359.

21. Kurozik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJF, et al. Geographical survey of β^S-globin gene haplotypes; evidence for an independent Asian origin of the sickle cell mutation. Am J Hum Genet 1986; 39: 239-244.

22. Fucharoen G, Fucharoen S, Wilai Y, Chinorak P, Khunsuk S, Sanchaisuriya K, et al. Beta globin gene haplotypes in some minor ethnic groups in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 28(supp.3): 115-119.

23. Fucharoen G, Fucharoen S, Sanchaisuriya K, Sae-ung N, Suyasunanond U, Sriwilai P, et al. Frequency distribution and haplotypic heterogeneity of β^E-globin gene among eight minority groups of northeast Thailand. Hum Hered 2002; 53: 18-22.