รายงานผู้ป่วย

ผู้ป่วยไทยรายแรกที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงสูงจาก Hemoglobin Bunbury (Beta codon 94 Asp⟶Asn, GAC⟶AAC)

ณัฏฐิฤทัย จันทร์โพธิ์ ณัฐพัชร์ ทวัชสมลักษณ์ และ นพดล ศิริธนารัตนกุล
สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

Hemoglobin Bunbury เป็น 1 ใน 200 ชนิดของฮีโมโกลบินที่มีการจับออกซิเจนไว้อย่างเหนียวแน่น (High oxygen affinity) อันเป็นสาเหตุของการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น (Compensatory erythrocytosis) โดยเกิดจากการกลายพันธุ์ของ Beta globin chain ที่ codon 94 ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก GAC (Asp)→AAC (Asn) รายงานฉบับนี้เป็นรายงานของผู้ป่วยชายไทยอายุ 27 ปี มีการส่งตรวจ complete blood count (CBC) พบว่ามี Hb 17.8 g/dL และ Hct 52.6% จึงมาปรึกษาเพื่อหาสาเหตุของภาวะเม็ดเลือดแดงสูง ตรวจร่างกายไม่พบตับและม้ามโต ได้รับการตรวจวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin typing) โดยหลักการ Capillary electrophoresis (CE) ผลคือ Hb A = 53.4%, Hb A2 = 2.7% และ Hb F = 43.9% และมีการตรวจเพิ่มด้วยหลักการ High performance liquid chromatography (HPLC) ผลคือ Hb A = 47.9%, Hb A2 = 44.3% และ Hb F 0.8% มีการตรวจยืนยันด้วย Beta globin gene sequencing ได้ผลเป็น Beta 94 (G→A) / N สรุปได้ว่า ผู้ป่วยรายนี้เป็นพาหะ Hemoglobin Bunbury

คำสำคัญ : ● *ฮีโมโกลบินบันเบอรี* ● *การจับออกซิเจนไว้อย่างเหนียวแน่น* ● *การสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2563;30:85-90.

ได้รับต้นฉบับ 14 มิถุนายน 2562 แก้ไขบทความ 28 กันยายน 2562 รับลงตีพิมพ์ 27 มกราคม 2563

ต้องการ สำเนาต้นฉบับ ติดต่อ ผศ. นพ. นพดล ศิริธนารัตนกุล สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700

Case report

First case report of Hemoglobin Bunbury (Beta codon 94 Asp⟶Asn, GAC⟶AAC) a rare variant with high oxygen affinity causing erythrocytosis in Thailand

Nuttiruetai Chanpo, Natthaphat Thawatsomlak and Noppadol Siritanaratkul

Division of Hematology, Department of General Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Abstract:

Hemoglobin Bunbury, the amino acid substitution (GAC⟶AAC) at codon 94 of the beta globin gene, is one of several high oxygen affinity hemoglobin variants which can cause compensatory erythrocytosis. We investigated a 27-year-old Thai male presenting a case of compensatory erythrocytosis. The results from complete blood count test showed Hb 17.8 g/dL and Hct 52.6% while physical examination revealed the absence of hepatosplenomegaly. Then, hemoglobin typing by capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods were examined. The result from capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC) showed Hb A = 53.4%, Hb A2 = 2.7%, Hb F = 43.9% and Hb A = 47.9%, Hb A2 = 44.3% and Hb F 0.8%. Both methods could not be used to diagnosis abnormal hemoglobin. The beta globin gene sequencing was investigated and showed Beta 94 (G⟶A) / N result. Thus, it could be used to diagnosis the Hemoglobin Bunbury heterozygote.

Keywords : ● *Hemoglobin Bunbury* ● *High oxygen affinity* ● *Compensatory erythrocytosis*

J Hematol Transfus Med. 2020;30:85-90.

บทนำ

Hemoglobin Bunbury เกิดจากการกลายพันธุ์ของ Beta globin chain ที่ codon 94 ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Aspartic acid (Asp) เป็น Asparagine (Asn) หรือ GAC⟶AAC[1-4] โดยที่โครงสร้างของ Hemoglobin Bunbury มีความเสถียรต่อความร้อนและ Isopropanol[1,3] ทั้งนี้ Hemoglobin Bunbury มีความสามารถในการจับออกซิเจนไว้อย่างเหนียวแน่น (High oxygen affinity)[1,4] ส่งผลให้เกิดภาวะขาดออกซิเจน (Hypoxia) และมีการกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงออกมาจำนวนมาก (Compensatory erythrocytosis)[5-7] ซึ่งฮีโมโกลบินที่มีความสามารถในการจับออกซิเจนไว้อย่างเหนียวแน่น (High oxygen affinity) ที่มีรายงานตรวจพบในประเทศไทยนั้นมี Hb Tak [Beta codon 147 (+AC)][8-10] และ Hb Kodaira II [Beta codon 146 (HC3) His⟶Gln (CAC⟶CAG)][8,11]

Hemoglobin Bunbury มีรายงานการพบครั้งแรกในหญิงชาวอิตาลี อายุ 43 ปี ที่เมือง Bunbury ประเทศออสเตรเลีย ในปี ค.ศ. 1983[1] ครั้งที่สองพบจากงานวิจัยในประเทศจีนที่ต้องการหาความชุกของฮีโมโกลบินผิดปกติ (Abnormal Hemoglobin) ในเส้นทางสายไหมจำนวน 3 ราย ในปี ค.ศ. 1990[2] ครั้งที่สามพบในชายอายุ 48 ปี และลูกสาว อายุ 22 ปีที่เมือง Philadephia ประเทศอเมริกา ในปี ค.ศ. 1992[3] ครั้งที่สี่พบในครอบครัวชาวแคนาดาที่เมือง Nova Scotia โดยพบในลูกสาว พ่อ และปู่ ในปี ค.ศ. 2007[4] และรายงานผู้ป่วยนี้เป็นการพบ Hemoglobin Bunbury ครั้งแรกในประเทศไทย

รายงานผู้ป่วย

ประวัติผู้ป่วย: ผู้ป่วยชายไทย อายุ 27 ปี ไม่มีประวัติสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์

การตรวจร่างกาย: ตรวจร่างกายไม่พบตับและม้ามโต

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

CBC: Hb 17.8 g/dL, Hct 52.6%, Rbc 6.04 x 10^{12} /L, MCV 87 fL, MCH 30 pg, MCHC 34 g/dL, platelet 277 x 10^9 /L, Wbc 6.1 x 10^9 /L

Clinical Chemistry: BUN 12.2 mg/dL, creatinine 1.13 mg/dL, uric acid 6.4 mg/dL, total protein 7.7 g/dL, albumin 5.1 g/dL, globulin 2.6 g/dL, total bilirubin 0.56 mg/dL, direct bilirubin 0.19 mg/dL, AST(SGOT) 23 U/L, ALT (SGPT) 23 U/L, alkaline phosphatase(ALP) 68 U/L

Ferritin: 385.9 ng/mL (Reference range 30.0-400.0 ng/mL)

Erythropoietin (EPO): 15.7 mIU/mL (normal range 3.7-29.5 mIU/mL)

Hemoglobin typing: มีการตรวจวิเคราะห์ 2 หลักการ ดังที่แสดงผลใน Table 1 และ Figure 1

Table 1 Result of hemoglobin typing by Capillary electrophoresis method and High performance liquid chromatography method

Method	Capillary electrophoresis method	High performance liquid chromatography method
Hb A (%)	53.4	47.9
Hb A2 (%)	2.7	44.3
Hb F (%)	43.9	0.8

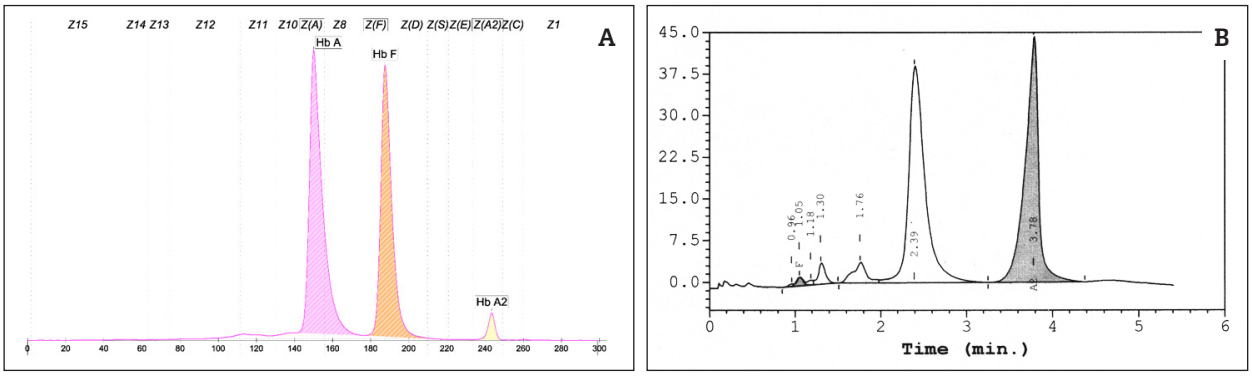

Figure 1 **A** Electropherogram by Capillary electrophoresis method; **B** Chromatogram by High performance liquid chromatography method

Multiplex gap-PCR for common β-globin gene deletion in Thai: Negative for 3.48 kb, Filipino (β)°, SEA HPFH (β)°, Chinese $^{G}\gamma(^{A}\gamma\delta\beta)^{\circ}$, Thai (dβ)° deletion, Hb Lepore, HPFH-6 $^{G}\gamma(^{A}\gamma\delta\beta)^{\circ}$, Siriraj-thalassemia $^{G}\gamma(^{A}\gamma\delta\beta)^{\circ}$.

Beta globin gene sequencing: Beta 94 (G⟶A)/N [Beta 94 (G⟶A) = Hb Bunbury]

การวินิจฉัย

จากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบว่า ผู้ป่วยมีปริมาณเม็ดเลือดแดง (Rbc) ค่าฮีโมโกลบิน (Hb) และฮีมาโทรคริต (Hct) สูงกว่าค่าปกติ จึงได้รับการตรวจวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin typing) โดยหลักการ Capillary electrophoresis (CE) ผลคือ Hb A = 53.4%, Hb A2 = 2.7% และ Hb F = 43.9% (Table 1) และนำมาทดสอบเพิ่มเติมด้วยหลักการ High performance liquid chromatography (HPLC) ผลคือ Hb A = 47.9%, Hb A2 = 44.3% และ Hb F 0.8% (Table 1) แสดงว่า ปริมาณ Hb F ที่พบว่าสูงในหลักการ CE นั้นไม่ใช่ Hb F เมื่อยืนยันด้วยหลักการ HPLC อีกทั้งการตรวจหา β-globin gene deletion ที่เป็นสาเหตุของ Hb F ที่สูงและพบบ่อยในประเทศไทยก็ไม่พบความผิดปกติ ดังนั้นผู้ป่วยจึงควรมีฮีโมโกลบินผิดปกติ (Abnormal Hemoglobin) ที่เคลื่อนที่อยู่ที่ตำแหน่ง F (Zone F) ในหลักการ CE และที่ตำแหน่ง A2 (A2 window) ในหลักการ HPLC และมี retention time (RT) ที่ 3.78 นาที โดยจากผลการตรวจวิเคราะห์หาชนิดและความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin typing) ของทั้งสองหลักการไม่สามารถบอกได้ว่า ผู้ป่วยมีฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดใด เมื่อได้ส่งตรวจยืนยันด้วย Beta globin gene sequencing พบว่าตำแหน่ง codon 94 ของ Beta globin chain มีการกลายพันธุ์ทำให้เปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Aspartic acid (Asp) เป็น Asparagine (Asn) หรือ GAC⟶AAC ซึ่งเหมือนโครงสร้างของ Hemoglobin Bunbury จึงสรุปได้ว่าผู้ป่วยเป็นพาหะ Hemoglobin Bunbury จากนั้นได้ซักประวัติครอบครัวพบว่า บิดาได้เสียชีวิตแล้วจึงตามมารดามาเจาะเลือดเพื่อตรวจ CBC และ Hemoglobin typing พบว่ามารดามีค่า CBC ที่อยู่ในเกณฑ์ปกติ และผลของ Hemoglobin typing ได้เป็น A_2A ซึ่งปกติ ส่วนพี่ชายและน้องสาวยังไม่สามารถตามมาตรวจเลือดได้ ซึ่งมีพงศาวลีตามใน Figure 2

วิจารณ์

จากข้อมูลใน Table 2 พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่ (Case 2-6 และ Patient) ที่เป็นพาหะ Hemoglobin Bunbury จะมีการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น (Compensatory erythrocytosis) ยกเว้น Case 1 ซึ่งเป็นรายงานการค้นพบในประเทศออสเตรเลีย ที่ไม่พบอาการทางคลินิกและการสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น(Compensatory erythrocytosis) และใน Table 2 แสดงค่า P_{50} (ค่า Po_2 ที่ 50% Hb Saturation) ในผู้ป่วยแต่ละรายมีค่าน้อย โดยค่า P_{50} ถ้ายิ่งลดลงแสดงว่าความสามารถในการจับ O_2 ของฮีโมโกลบินมีมากขึ้น[12]

จาก Table 2 ผลการตรวจ Hemoglobin typing ของ ผู้ป่วยนั้นไม่สามารถบอกชนิดและความเข้มข้นของ Hemoglobin Bunbury เหมือนผู้ป่วยรายอื่นที่ได้มีรายงานมาก่อน เนื่องจากวิธีการตรวจวิเคราะห์ต่างกัน โดย Case 1 ใช้วิธี Electrophoresis[1], Case 2-3 ใช้วิธี Cellulose acetate Electrophoresis และ Isoelectrofocusing (IEF)[3], Case 4-6 ไม่ระบุวิธีการตรวจหา Hemoglobin typing[4] ซึ่งวิธีการตรวจ Hemoglobin typing ของ Case 1-3 นั้นเป็นวิธีการดั้งเดิมและมีหลายขั้นตอน ซึ่งทางหน่วยงานมีการนำเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและความเข้มข้นของฮีโมโกลบินอัตโนมัติทั้งหลักการ HPLC และ CE มาใช้ทดแทนวิธีการดั้งเดิม จากทั้งสองหลักการนี้จะเห็นได้ว่า ค่า Hb A นั้นได้ใกล้เคียงกับรายงานใน Case 1-6, ค่า Hb A_2 ในหลักการ CE นั้นให้ผลที่ใกล้เคียงกับรายงานใน Case 1-6 แต่หลักการ HPLC นั้นมีค่าที่สูงใกล้เคียงกับค่า Hemoglobin Bunbury ใน Case 1-6 แสดงว่า Hemoglobin Bunbury นั้นมีการเคลื่อนที่อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับ Hb A_2 และค่า Hb F ในหลักการ HPLC นั้นได้ผลที่ใกล้เคียงกับรายงานใน Case 1-6 แต่หลักการ CE นั้นมีค่าที่สูงใกล้เคียงกับค่า Hemoglobin Bunbury ในรายงาน Case 1-6 แต่หลักการ CE นั้นมีค่าที่สูงใกล้เคียงกับค่า Hemoglobin Bunbury ในรายงาน Case 1-6 แสดงว่า Hemoglobin Bunbury นั้นมีการเคลื่อนที่อยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับ Hb F

ในการตรวจ Hemoglobin typing โดยหลักการ HPLC ตามใน Figure 1(B) นั้น อาจจะทำให้แปลผลผิดเป็น Hemoglobin

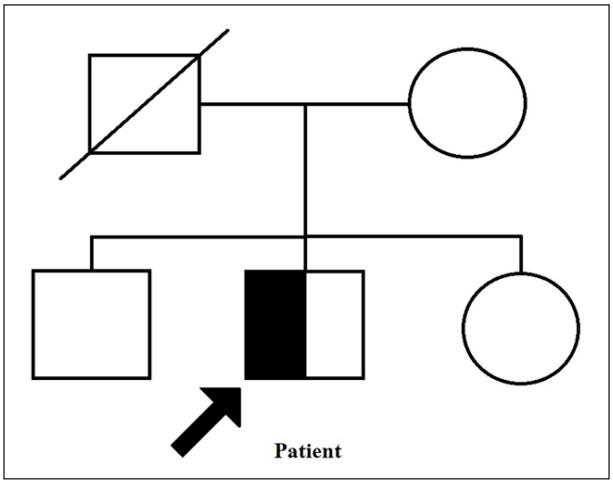

Figure 2 Patient's Pedigree

Table 2 Result from review literature and patient in this case report

Case	1	2	3	4	5	6	Patient
Sex-Age	F-43	M-48	F-20	F-21	M-49	M-?	M-27
RBC (10^{12}/L)	4.88	6.83	5.63	5.54	6.72	5.43	6.04
Hb (g/dL)	12.8	20	16.8	17.1	19.1	16.8	17.8
Hct (%)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	52.6
MCV (fL)	84	93.8	92.5	91.5	84.7	91.2	87
MCH (pg)	27.9	N/A	N/A	30.9	28.4	30.9	30
MCHC (g/dL)	N/A	31.3	32.3	33.7	33.6	33.9	34
Hb A (%)	60[a]	57.3[b]	56.0[b]	57.1	56.3	58.3	53.4*, 47.9**
Hb A2 (%)	2.0[a]	2.8[b]	3.1[b]	3.3	3.3	3.2	2.7*, 44.3**
Hb F (%)	0.1[a]	1.0[b]	0.6[b]	N/A	N/A	N/A	43.9*, 0.8**
Hb Bunbury (%)	38[a]	38.9[b]	40.2[b]	39.6	40.3	38.5	-
α Genotype	N/A	αα/αα	αα/αα	N/A	N/A	N/A	αα/αα
P_{50} (mm Hg)	21.0[c]	19.5	17.0	19.5[d]	20.5[d]	19.5[d]	-

Case 1 Italian women from Bunbury, Western Australia[1]

Case 2-3 Caucasian man and his daughter from Philadelphia, USA[3]

Case 4-6 Canadian family form Nova Scotia[4]

[a]Electrophoresis on Cellogel method at pH 9.2; [b]Cellulose acetate and isoelectrofocusing (IEF) method;

[c]Control 26.5 mmHg; [d]Normal range : 24.0-27.0 mmHg, N/A = Not Available,

*Result for Capillary electrophoresis method; **Result for High performance liquid chromatography method

E heterozygote ได้ เนื่องจาก Hemoglobin Bunbury นั้นมีการชะออกจากคอลัมน์ด้วย RT (Retention time) ที่ใกล้เคียงกับ Hemoglobin E จึงพบที่บริเวณ Hb A_2 เช่นเดียวกัน

สรุป

ผู้ป่วยที่เป็นพาหะ Hemoglobin Bunbury จะมีภาวะ Compensatory erythrocytosis เนื่องจาก Hemoglobin Bunbury เป็นกลุ่มฮีโมโกลบิน high oxygen affinity ซึ่งผู้ป่วยจะไม่มีอาการ เมื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการจะพบค่า RBC และ Hb สูงกว่าปกติ ส่วนในการตรวจ Hemoglobin typing หากตรวจด้วยหลักการ Cellulose acetate Electrophoresis และ IEF จะพบตำแหน่งของ Hemoglobin Bunbury อยู่ระหว่างตำแหน่ง Hb A กับ Hb S[1,3] ซึ่งทั้งสองหลักการนั้นเป็นวิธีดั้งเดิม ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ตรวจหา Hemoglobin typing ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยใช้หลักการ HPLC และ/หรือ CE หากตรวจด้วยหลักการ HPLC จะพบว่า Hemoglobin Bunbury นั้นจะถูกชะออกมาในตำแหน่งเดียวกับ Hb A_2 ส่วนหลักการ CE นั้นจะพบที่ตำแหน่งเดียวกันกับ Hb F ซึ่งการตรวจเพียง Hemoglobin typing เพียงอย่างเดียวไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดใด จึงควรมีการส่งตรวจยืนยันด้วย Beta globin gene sequencing

เอกสารอ้างอิง

1. *Como P, Kennett D, Wilkinson T, Lronenberg H. A New Hemoglobin with High Oxygen Affinity Hemoglobin Bunbury. Hemoglobin. 1983;7:413-21.*
2. *Li H-j, Zhao X-N, Qin F, Li H-W, Li L, et al. Abnormal hemoglobins in the Silk Road region of China. Hum Genet. 1990;86:231-5.*
3. *Ballas SK, Park D, Fernandez L, Hine TK, Jue DL, Johnson MH, et al. Erythrocytosis Secondary to Hb Bunbury [α2β2 94 (FG1) Asp→Asn]. Hemoglobin. 1992; 16: 281-6.*
4. *Walker L, Eng B, McFarlane A, Waye JS. High oxygen affinity hemoglobin variant in a Canadian family: Hb Bunbury [beta94 (FG1) Asp→Asn, GAC→AAC]. Hemoglobin. 2007; 31: 101-3.*

5. *Mangin O. High oxygen affinity hemoglobins. Rev Med Interne. 2017;38:106-12.*
6. *González Fernández FA, Villegas A, Ropero P, Carreno MD, Anguita E, Polo M, et al. Haemoglobinopathies with high oxygen affinity. Experience of Erythropathology Cooperative Spanish Group. Ann Hematol. 2009;88:235-8.*
7. *Bungorn Chomdej. Physiology of circulatory system. Bangkok: Chulalongkorn University Press; 2001.*
8. *Commitee of hemoglobin analysis manual prepare. Hemoglobin analysis manual. Nonthaburi: Department of medical sciences; 2010.*
9. *Hoyer J, Wick M, Thibodeau S, Viler K, Conner R, Fairbanks V. HB Tak Confirmed by DNA Analysis Not Expressed as Thalassemia in a HB TAK HB E Compound Heterozygote. Hemoglobin. 1998;22:45-52.*
10. *Charoenkwan P, Thanarattanakorn P, Chaovaluksakul S, Sittipreechacharn S, Sae-Tang R, Sanguansermsri T. Hematological and molecular characterization of beta-thalassemia/hb tak compound heterozygote. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003;32:415-9.*
11. *Ngiwsara L, Srisomsap C, Winichagoon P, Fucharoen S, Svasti J. Hb Kodaira II [β146 (HC3) His→Gln] Detected in Thailand. Hemoglobin. 2003;27:37-9.*
12. *Department of Physiology Faculty of Science Mahidol University. Physiology 1. Bangkok: text and journal publishers; 1999.*