

ระดับคอมพลีเมนต์ C3 และการแสดงออกของ CD55 และ CD59 บนเม็ดเลือดแดง ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงแตกต่างกัน

ชัยวุฒิ พิศพงษ์^{1,2} สุมลมาลย์ คล้าชื่น³ สุรศักดิ์ สวัสดิ์นะที⁴ กาญจนา แสงจิตต์²
วัลวิสาข์ สุวรรณเลิศ² ไพเราะ แสนหวัง² และ รสริน การเพียร^{2*}

Received: November 15, 2018

Revised: January 10, 2019

Accepted: January 21, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับการตรวจวัดระดับคอมพลีเมนต์ C3 และการแสดงออกของ CD55 และ CD59 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงแตกต่างกัน ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เข้ามา รับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 44 ราย เจาะเลือดหลังจากได้รับเลือดครั้งสุดท้ายอย่างน้อย 30 วันหรือก่อนรับเลือด ตรวจระดับคอมพลีเมนต์ C3 โดยใช้หลักการ turbidimetric test ตรวจวิเคราะห์ การแสดงออกของ CD55 และ CD59 บนเม็ดเลือดแดงโดยใช้วิธี flow cytometry จำแนกความรุนแรงของผู้ป่วยโรค ฮีโมโกลบินเอชเป็น 3 ระดับ ได้แก่ รุนแรงน้อย จำนวน 14 ราย ปานกลาง 6 ราย และรุนแรงมาก 24 ราย ผลการศึกษา พบระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงน้อย ปานกลาง และมาก เท่ากับ 1.08 ± 0.16 , 1.15 ± 0.29 และ 1.05 ± 0.17 g/L ตามลำดับ โดยระดับคอมพลีเมนต์ C3 ทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแสดงออกของ CD55 บนผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยที่มีความรุนแรงน้อย ปานกลาง และมาก เท่ากับ 87.4 ± 12.22 , 77.8 ± 14.94 และ $95.8 \pm 3.42\%$ ตามลำดับ ส่วนการแสดงออกของ CD59 ในกลุ่มดังกล่าวเท่ากับ 98.3 ± 1.89 , 97.6 ± 2.23 และ $99.0 \pm 1.48\%$ ตามลำดับ การแสดงออกของ CD55 และ CD59 บนผิวเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย โรคฮีโมโกลบินเอชที่มีความรุนแรงต่างกันเปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีแนวโน้มพบการแสดงออกของ CD55 ในระดับน้อยกว่าในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงขึ้น หากทำการศึกษาต่อไปน่าจะได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการแสดงออกของ CD55 และ CD59 ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ที่มีความรุนแรงต่างกันที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินเอช, ความรุนแรง, คอมพลีเมนต์ C3, CD55, CD59

¹ หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี

² วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี

³ คลินิกโรคเลือดและมะเร็งในเด็ก โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี

⁴ คลินิกอายุรกรรมโรคเลือด โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Complement C3 level and expression of CD55 and CD59 on red blood cells of variable clinical severity Hb H disease

Chaiwoot Pispong^{1,2}, Sumonmaln Klamchuen³, Surasak Sawatnatee⁴, Kanjana Pangjit²,
Wanwisa Suwannalert², Phairo Saenwang² and Rossarin Karnpean^{2*}

Abstract

This is the first study which aimed to determine the complement C3 level and the expression of CD55 and CD59 on red blood cells of variable clinical severity Hb H patients. This study conducted on 44 patients from Sunpasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani, Thailand. Blood sample were collected 30 days after being transfused or just before receiving a transfusion. Measurement of complement C3 level was done using turbidimetric test. Investigation of CD55 and CD59 expressions on red blood cells was performed using flow cytometry method. Among these patients, 14 patients were categorized as mild phenotype, 6 patients were moderate and 24 patients were severe phenotype. The results showed that complement C3 level in mild, moderate and severe Hb H disease were 1.08 ± 0.16 , 1.15 ± 0.29 and 1.05 ± 0.17 g/L, respectively. The expression of CD55 in mild, moderate and severe type were 87.4 ± 12.22 , 77.8 ± 14.94 and $95.8 \pm 3.42\%$, respectively. The expressions of CD59 in those groups were 98.3 ± 1.89 , 97.6 ± 2.23 and $99.0 \pm 1.48\%$, respectively. Statistical analysis showed no significant difference in the level of CD55 and CD59 expressions in patients with variable severity and control group. However, this study revealed the trend of low level of CD55 in more severe phenotype of Hb H disease. The further study of these molecules might give the insight understanding about CD55 and CD59 expression on variable clinical severity Hb H disease.

Keywords: Hb H disease, Severity, Complement C3, CD55, CD59

¹ Biomedical Sciences Program, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani

² College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani

³ Pediatric Hematology and Oncology Unit, Sunpasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani

⁴ Hematology Unit, Sunpasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani

* Corresponding author (e-mail: rossarin.k@ubu.ac.th, rossarink4@gmail.com)

บทนำ

โรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) เกิดจากการได้รับยีน α^0 -thalassemia ร่วมกับ α^+ -thalassemia ($--/\alpha$) หรือเกิดจาก α^0 -thalassemia ร่วมกับ non-deletional mutation ($--/\alpha^T\alpha$) เช่น Hb Constant Spring (CS) หรือ Hb Pakse⁽¹⁾ โรคฮีโมโกลบินเอชเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงปานกลาง (thalassemia intermedia) ที่พบได้มากที่สุดและจำเป็นต้องได้รับการดูแลรักษาที่เหมาะสม จากการศึกษาของ Prayalaw P และคณะ⁽²⁾ พบว่าโรคธาลัสซีเมียชนิดไม่พึ่งพาเลือด (non-transfusion dependent thalassemia; NTDT) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นโรคฮีโมโกลบินเอชในรูปแบบต่างๆ ถึงร้อยละ 43 ของผู้ป่วยทั้งหมด⁽²⁾ โดยทั่วไปผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชมักจะมีอาการไม่รุนแรง ไม่ต้องการการรับเลือดเป็นประจำ ไม่ต้องตัดม้ามและไม่ต้องได้รับยาขับเหล็ก ในภาวะปกติผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชจะมีระดับฮีโมโกลบินประมาณ 9-10 g/dL แต่เมื่ออยู่ในภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (hemolytic crisis) ซึ่งมักเกิดจากการติดเชื้อหรือมีไข้ ระดับฮีโมโกลบินจะลดลงอย่างมากจนเกิดภาวะช็อคหรือไตวายได้⁽³⁾ อย่างไรก็ตามมีการรายงานพบอุบัติการณ์ของโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีความรุนแรงมากขึ้น แม้กระทั่งการพบฮีโมโกลบินเอชที่รุนแรงมากจนทารกในครรภ์เป็นไฮดรอป (Hb H hydrops fetalis) โดยเฉพาะพบได้ในกลุ่มโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด non-deletion⁽⁴⁾ จากการศึกษาของ Fuchareon S และคณะ⁽³⁾ ในปี 2009 ในผู้ป่วยเด็กที่เป็น Hb H-CS พบว่ามีอาการทางคลินิกแตกต่างกันอย่างมาก ประมาณร้อยละ 25 ของผู้ป่วยจัดอยู่ในกลุ่มที่มีอาการรุนแรง ระดับฮีโมโกลบินเริ่มต้นต่ำ ต้องการรับเลือดเป็นประจำ และได้รับการตัดม้ามตั้งแต่อายุ 6 ขวบ อย่างไรก็ตามพบผู้ป่วยอีกจำนวนมากที่ไม่ต้องตัดม้าม หรือไม่เคยมัต้องได้รับเลือดเลย การเจริญเติบโตของร่างกายและการเจริญพันธุ์ปกติ ดังนั้นจึงเป็นเรื่องยากที่จะพิจารณาหรือคาดการณ์ว่าผู้ป่วยรายใดจะมีอาการรุนแรงน้อยหรือรุนแรงมาก จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าน่าจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีบทบาทในการแสดงออกของโรคที่รุนแรงแตกต่างกันในผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอชเป็นที่น่าเสียดายว่าถึงแม้โรคฮีโมโกลบินเอชจะเป็นโรค

ที่พบได้บ่อยแต่การศึกษาเกี่ยวกับความรุนแรงทางคลินิกที่แตกต่างกันยังมีน้อยมาก มีรายงานการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอชเกี่ยวกับบทบาทของ UGT1 variant⁽⁵⁾ และ KLF1 polymorphism⁽⁶⁾ ซึ่งยังไม่พบข้อมูลที่ชัดเจนเพียงพอเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอช

จากการทบทวนวรรณกรรม พบปัจจัยที่ทำให้พัฒนาความรุนแรงของโรค ได้แก่ การที่เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย โดยในกลุ่มผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช สามารถเกิด Hb H inclusion bodies ทำลายผนังเซลล์ของเม็ดแดงแดงได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยมีอุณหภูมิในร่างกายสูงกว่าปกติ ซึ่งเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดง การทำลายเม็ดเลือดแดงจากสาเหตุอื่น เช่น เม็ดเลือดแดงถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันผ่านระบบคอมพลีเมนต์ โดยปกติเม็ดเลือดแดงจะมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ที่ยังการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ เช่น CD55 และ CD59 ซึ่งเป็น GPI โปรตีนอยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง CD55 ทำหน้าที่ที่ยัง C3 convertase ส่วน CD59 ทำหน้าที่ที่ยังการเกิด C5-C9 complex⁽⁷⁾ หากมีการแสดงออกของโมเลกุลเหล่านี้จะทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงได้ มีรายงานพบการแสดงออกของ CD55 และ CD59 ที่ผิดปกติในภาวะอื่นนอกจากที่พบในผู้ป่วย Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)⁽⁸⁾ รวมทั้งมีรายงานในผู้ป่วย β -thalassemia⁽⁹⁻¹⁰⁾ กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของ CD55 และ CD59 ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมระบบคอมพลีเมนต์ (complement regulatory protein) ที่ไม่ได้จำเพาะกับ PNH เท่านั้น โดยเป็นที่ทราบกันว่าการทำลายเม็ดเลือดแดงผ่านระบบคอมพลีเมนต์ ทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกทั้งแบบภายในหลอดเลือดและภายนอกหลอดเลือด จึงน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของโรคฮีโมโกลบินเอช ผลที่ได้จากการศึกษาค้นคว้านี้จะน่าจะเป็นองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการแสดงออกของ CD55 และ CD59 ในผู้ป่วย Hb H disease ในกลุ่มอาการต่างกันได้นอกจากนี้ ในปี 2014 มีการศึกษาโปรตีนในพลาสมาของผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอชโดยการทำ 2D electrophoresis เปรียบเทียบระหว่าง Hb H และ Hb H-CS โดยพบว่าในกลุ่ม Hb H-CS มีการแสดงออกของ

โปรตีนคอมพลีเมนต์ C3 ลดลง⁽¹¹⁾ กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในงานตรวจประจำวันซึ่งสามารถตรวจได้ในโรงพยาบาลระดับจังหวัด หากผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการทางคลินิกแตกต่างกันมีระดับคอมพลีเมนต์ C3 จากงานตรวจประจำวันที่แตกต่างกันจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนดูแลรักษาผู้ป่วยให้เหมาะสมยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาแบบตัดขวาง (Cross-sectional descriptive study) ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่ได้รับการวินิจฉัยและเข้ามารับการรักษาที่คลินิกโรคเลือดและมะเร็งในเด็ก และคลินิกอายุรกรรมโรคเลือด โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ในช่วงเดือนมกราคม-พฤศจิกายน 2561 จำนวน 44 ราย ผู้ป่วยมีอายุระหว่าง 2-60 ปี การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากงานตรวจทางห้องปฏิบัติการประจำวันปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร โดยเป็นตัวอย่างเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง K2-EDTA และ Sodium heparin การเจาะเก็บตัวอย่างเลือดดำเนินการโดยนักเทคนิคการแพทย์หรือพยาบาลทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดก่อนการรับเลือดหรือหลังจากรับเลือดครั้งสุดท้ายเป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน และได้รับการลงนามยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยก่อนทำการเจาะเก็บเลือดทุกราย ตัวอย่างควบคุมผลลบคือตัวอย่างคนสุขภาพดี ไม่ได้เป็นธาลัสซีเมียและยินยอมให้เจาะเลือดเพื่อทำการวิจัย

การใช้ตัวอย่างในการศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ รหัสเอกสารรับรอง 071/2560

การรวบรวมข้อมูลทางคลินิกและการประเมินความรุนแรงของผู้ป่วย

ดำเนินการรวบรวมข้อมูลทางคลินิกโดยกุมารแพทย์โรคเลือดและมะเร็งในเด็ก และอายุรแพทย์โรคเลือด โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โดยดำเนินการรวบรวม

ข้อมูลดังต่อไปนี้ ได้แก่ 1) อายุที่ได้รับการวินิจฉัยครั้งแรก (ปี) 2) ระดับฮีโมโกลบินเริ่มต้น (g/dL) 3) ความต้องการการรับเลือด (ไม่ได้รับ, บางครั้งบางครั้ง, จำเป็น) 4) การเจริญเติบโตและพัฒนาการ (ปกติ, บกพร่องเล็กน้อย, บกพร่อง) 5) ภาวะม้ามโต (เล็กน้อย, ปานกลาง, มาก)

ดำเนินการประเมินความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอช โดยใช้วิธีการประเมินซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kanavakis E และคณะ⁽¹²⁾ โดยการศึกษาไม่ใช้การเปลี่ยนแปลงของกระดูกเป็นพารามิเตอร์ในการประเมินความรุนแรงเนื่องจากมีความไม่แน่นอนในการประเมินสูง และไม่มีเกณฑ์ในการประเมินที่ชัดเจน โดยแบ่งผู้ระดับความรุนแรงของผู้ป่วย 3 ระดับ ดังนี้

- รุนแรงน้อย (mild) ได้แก่ อายุที่ได้รับการวินิจฉัยครั้งแรกมากกว่า 4 ปี, ฮีโมโกลบินเริ่มต้นมากกว่า 9 g/dL, ไม่ได้รับเลือด, การเจริญเติบโตปกติ, ม้ามโตเล็กน้อย
- รุนแรงปานกลาง (moderate) ได้แก่ อายุที่ได้รับการวินิจฉัยครั้งแรก 2-4 ปี, ฮีโมโกลบินเริ่มต้นมากกว่า 8-9 g/dL, ไม่ได้รับเลือด, การเจริญเติบโตบกพร่องเล็กน้อย, ม้ามโตปานกลาง
- รุนแรงมาก (severe) อายุที่ได้รับการวินิจฉัยครั้งแรก 0-2 ปี, ฮีโมโกลบินเริ่มต้นน้อยกว่า 8 g/dL, จำเป็นต้องรับเลือดหรือบางครั้งบางครั้ง, การเจริญเติบโตบกพร่อง, ม้ามโตมาก

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือจากงานตรวจประจำวัน โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์แล้ว ดำเนินการรวบรวมผลการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC) ซึ่งตรวจโดยใช้เครื่อง XE-2100 Hematology Analyser (Sysmex, Kobe, Japan) และผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยอาศัยหลักการ capillary electrophoresis (Minicap, Sebia, France) จากนั้นดำเนินการขนส่งตัวอย่างเลือดด้วยอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำตัวอย่างเลือดมาทำการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยดำเนินการตรวจ ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ CD55 CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง

นำเลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็ง EDTA มาตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ CD55 CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 ภายใน 24 ชั่วโมงหลังทำการเจาะเลือด โดยนำเลือดมาเจือจางเป็น 1:10 ด้วย phosphate buffer saline (PBS) นำเลือดที่เจือจางแล้วปริมาตร 50 μ L ใส่หลอดทดลอง 4 หลอด ได้แก่ หลอดที่ 1 (unstained RBC) ไม่เติมแอนติบอดี หลอดที่ 2 เติม anti-CD55 phycoerythrin (PE) (clone JS11KSC2.3, mouse IgG1, Immunotech Sas) ปริมาตร 5 μ L หลอดที่ 3 เติม anti-CD59 fluoresce inisothiocyanate (FITC) (clone P282E, mouse IgG2a, Immunotech Sas) ปริมาตร 5 μ L หลอดที่ 4 เติม anti-CD55 PE และ anti-CD59 FITC อย่างละ 5 μ L ทำการบ่มในที่มืด 20-30 นาที ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง เพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกินออก หลังจากนั้นทำให้เป็น suspension ด้วยการเติม sheath fluid ปริมาตร 1 mL ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD55 CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 ด้วยเครื่อง flow cytometer (FC 500 series; Beckman Coulter, USA) โดยใช้ CXP Software (Beckman Coulter, USA)⁽⁹⁾

การตรวจวัดระดับคอมพลีเมนต์ C3

ทำการตรวจวัดระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในงานตรวจประจำวันภายใน 1 สัปดาห์หลังทำการเจาะเลือด โดยใช้ตัวอย่าง haparinized plasma ตรวจวัดระดับคอมพลีเมนต์ C3 ด้วยหลักการ turbidimetric method ใช้น้ำยาสำเร็จรูปและวิธีการตรวจวัดตามข้อแนะนำของ บริษัทผู้ผลิต (C3 Specific Protein, BLOS6X5903, Beckman Coulter, USA) โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Beckman DxC 800 (Beckman Coulter, USA) ในการตรวจวัด

การตรวจวิเคราะห์จีโนไทป์

การตรวจวิเคราะห์ α^0 -thalassemia (ชนิด SEA และ THAI deletions) และการตรวจวิเคราะห์ α^+ -thalassemia (ชนิด 3.7 kb deletion และ 4.2 kb deletion) ทำการด้วยวิธี Gap-PCR วิธีการตามการศึกษาก่อนหน้านี้⁽¹³⁻¹⁴⁾ การตรวจวิเคราะห์ยีน Hb Constant Spring

และ Hb Pakse' ทำการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี allele specific PCR⁽¹⁵⁾ ทำ PCR โดยใช้เครื่อง Biometra T Personal Thermal Cycler (Biometra GmbH, Germany) หลังจากได้ PCR product นำไปแยกด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจสอบขนาด PCR product ภายใต้แสง UV

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติพรรณนาแสดงข้อมูลเป็นจำนวน ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ใช้สถิติ Kruskal Wallis Test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$ การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดจะใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 20 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)

ผลการศึกษา

ลักษณะตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชทั้งหมด 44 ราย สามารถจำแนกความรุนแรงเป็น 3 ระดับ ได้แก่ รุนแรงน้อย จำนวน 14 ราย (ร้อยละ 31.8) รุนแรงปานกลางจำนวน 6 ราย (ร้อยละ 13.6) และรุนแรงมากจำนวน 24 ราย (ร้อยละ 54.5) การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอพบอัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ทั้งหมด 3 แบบ โดยพบชนิด $-\text{SEA}/\alpha^{\text{CS}}\alpha$ มากที่สุด 35 ราย คิดเป็นร้อยละ 79.5 รองลงมาคือชนิด $-\text{SEA}/-\alpha^{3.7}$ ร้อยละ 18.2 และยังตรวจพบ THAI deletion ซึ่งเป็นอัลฟามิวเทชันที่พบได้น้อย ในกลุ่มตัวอย่างที่รุนแรงน้อยและปานกลางพบจีโนไทป์ทั้งชนิด deletion และ non-deletion ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างที่รุนแรงมากพบเฉพาะชนิด non-deletion เท่านั้น จำนวนตัวอย่างที่จำแนกตามความรุนแรงและอัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 1

ผลการตรวจพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม พบว่ามีเพียงค่า RBC count เท่านั้นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี $p\text{-value}$ เท่ากับ 0.035 (<0.05) ส่วนค่าพารามิเตอร์อื่น เช่น Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC และ RDW ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มรุนแรงน้อย ปานกลาง และมาก ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการตรวจระดับคอมพลีเมนต์ C3 และการแสดงออกของ CD55 และ CD59 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง

ผลการตรวจระดับคอมพลีเมนต์ C3 ของตัวอย่างกลุ่มรุนแรงน้อย รุนแรงปานกลางและรุนแรงมากเท่ากับ 1.08 ± 0.16 , 1.15 ± 0.29 และ 1.05 ± 0.17 g/L ตามลำดับ โดยระดับคอมพลีเมนต์ C3 ทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงใน

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยของร้อยละเม็ดเลือดแดงที่มีการแสดงออกของ CD55, CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 ในกลุ่มรุนแรงปานกลาง มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มรุนแรงน้อยและรุนแรงมาก แต่ผลการวิเคราะห์ร้อยละของเม็ดเลือดแดงที่มีการแสดงออกของ CD55, CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59

ตารางที่ 1 อัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์และระดับความรุนแรงทางคลินิกของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่ทำการศึกษารวม 44 ราย

จีโนไทป์	ระดับความรุนแรงทางคลินิก (จำนวน/ร้อยละ)			
	น้อย	ปานกลาง	มาก	รวม
Deletion				
-- ^{SEA} /- $\alpha^{3.7}$	6 (13.6)	2 (4.5)	0 (0)	8 (18.2)
Non-deletion				
-- ^{SEA} / α^{CS}	7 (15.9)	4 (9.1)	24 (54.5)	35 (79.5)
-- ^{THAI} / α^{CS}	1 (2.3)	0 (0)	0 (0)	1 (2.3)
รวม	14 (31.8)	6 (13.6)	24 (54.5)	44 (100)

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยา (hematological parameters) ของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่ทำการศึกษารวมทั้งหมด 44 ราย (ค่าที่แสดงในตารางคือ mean $\pm$ SD)

พารามิเตอร์	ระดับความรุนแรงทางคลินิก			p-value
	น้อย (n=14)	ปานกลาง (n=6)	มาก (n=24)	
RBC count ($10^{12}/L$)	5.14 ± 1.00	4.62 ± 0.61	4.34 ± 0.80	0.035*
Hb (g/dL)	8.7 ± 1.11	8.0 ± 0.68	7.7 ± 0.80	0.053
Hct (%)	29.6 ± 2.45	27.7 ± 3.60	27.6 ± 4.15	0.230
MCV (fL)	59.5 ± 12.48	60.4 ± 8.81	64.5 ± 8.62	0.236
MCH (pg)	17.2 ± 2.08	17.5 ± 1.80	17.9 ± 2.07	0.648
MCHC (g/dL)	29.5 ± 2.96	29.2 ± 2.24	27.9 ± 1.82	0.123
RDW-CV (%)	25.5 ± 2.79	26.8 ± 4.33	27.2 ± 4.57	0.412

ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ Kruskal Wallis Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

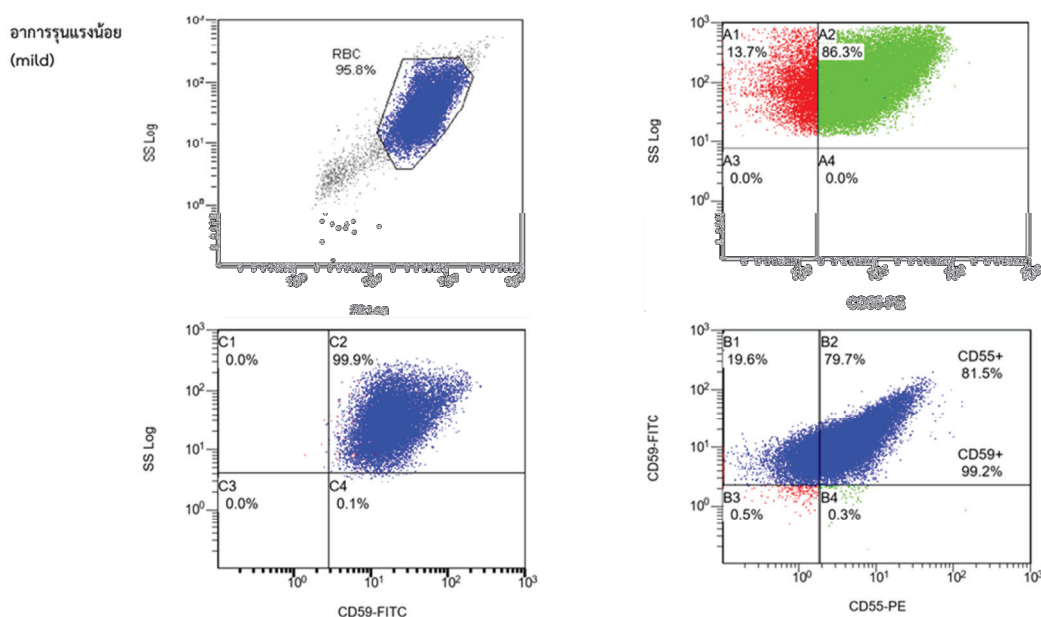
ตารางที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในพลาสมาและการแสดงออกของ CD55, CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่ทำการศึกษารวมทั้งหมด 44 ราย (ค่าที่แสดงในตารางคือ mean $\pm$ SD)

	ตัวอย่างควบคุม ผลลบ (n=5)	ระดับความรุนแรงทางคลินิก			p-value
		น้อย (n=14)	ปานกลาง (n=6)	มาก (n=24)	
Complement C3 (g/L)	-	1.08 $\pm$ 0.16	1.15 $\pm$ 0.29	1.05 $\pm$ 0.17	0.611
CD55 (%)	93.2 $\pm$ 1.40	87.4 $\pm$ 12.22	77.8 $\pm$ 14.94	95.8 $\pm$ 3.42	0.246
CD59 (%)	96.8 $\pm$ 3.62	98.3 $\pm$ 1.89	97.6 $\pm$ 2.23	99.0 $\pm$ 1.48	0.786
CD55+CD59 (%)	96.3 $\pm$ 3.29	64.0 $\pm$ 35.68	58.5 $\pm$ 47.16	80.0 $\pm$ 34.16	0.250

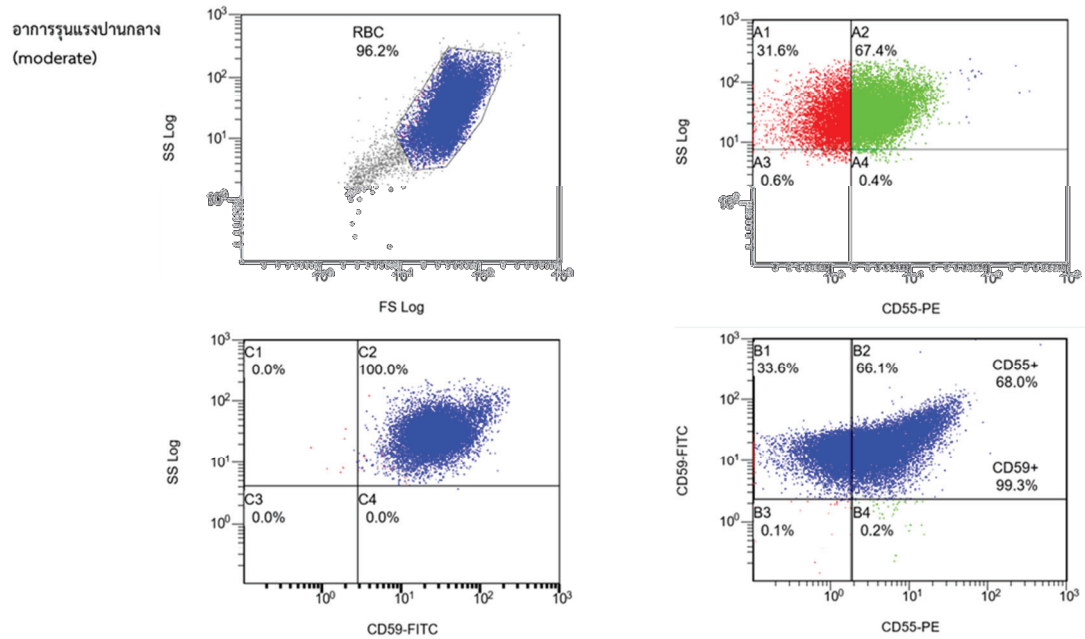
ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ Kruskal Wallis Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

ทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (**ตารางที่ 3**) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD55, CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 ในตัวอย่างกลุ่มรุนแรงน้อยแสดงใน**รูปที่ 1** ผลการวิเคราะห์การแสดงออก

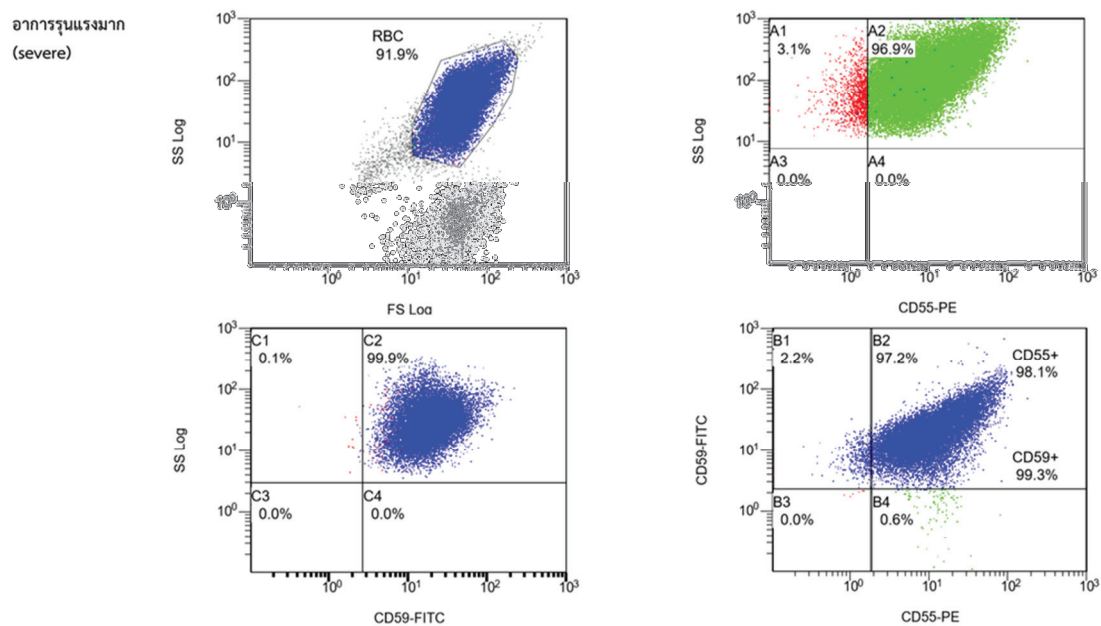
ของ CD55, CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 ในตัวอย่างกลุ่มรุนแรงปานกลางแสดงใน**รูปที่ 2** และผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD55, CD59 และ CD55 ร่วมกับ CD59 ในตัวอย่างที่รุนแรงมากแสดงใน**รูปที่ 3**



รูปที่ 1 Dot plot แสดงผลการตรวจวิเคราะห์โมเลกุลที่แสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงน้อยโดยวิธี flow cytometry รูปบนซ้าย: แสดงเม็ดเลือดแดงที่ถูกเลือก (gate) เข้ามาตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการ forward และ side scatter



รูปที่ 2 Dot plot แสดงผลการตรวจวิเคราะห์โมเลกุลที่แสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ที่มีอาการรุนแรงปานกลางโดยวิธี flow cytometry รูปบนซ้าย: แสดงเม็ดเลือดแดงที่ถูกเลือก (gate) เข้ามาตรวจวิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการ forward และ side scatter



รูปที่ 3 Dot plot แสดงผลการตรวจวิเคราะห์โมเลกุลที่แสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ที่มีอาการรุนแรงมากโดยวิธี flow cytometry รูปบนซ้าย: แสดงเม็ดเลือดแดงที่ถูกเลือก (gate) เข้ามาตรวจวิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการ forward และ side scatter

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ตามปกติเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีโปรตีนควบคุมระบบคอมพลีเมนต์เพื่อป้องกันการแตกของเซลล์⁽⁷⁾ มีหลายการศึกษาที่พบว่าโปรตีนควบคุมระบบคอมพลีเมนต์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันเม็ดเลือดแดงแตกจากการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์⁽¹⁶⁾ มีรายงานภาวะซีดจากเม็ดเลือดแดงแตกหลายชนิดที่เกิดจากมิมิพ่นหรือออโตแอนติบอดีต่อโปรตีนควบคุมระบบคอมพลีเมนต์และมิมิพ่นที่ทำให้เกิดการกระตุ้นคอมพลีเมนต์โดยตรง⁽¹⁷⁾ CD55 และ CD59 เป็นหนึ่งในโปรตีนควบคุมระบบคอมพลีเมนต์ CD55 หรือ Decay-accelerating factor (DAF) เป็น glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored, type I cell surface protein เป็นตัวยับยั้ง C3 convertase โดยผ่านการจับ C3b และ C4b นอกจากนั้นยังจับ alternate pathway convertase C3bBb, classical pathway convertase และ C4b2a โดยปกติ CD55 จะแสดงออกบนเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกายแต่ระดับการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละชนิด การเกิดความบกพร่องใน CD55 gene หรือ GPI-anchor attachment ทำให้เกิดการลดลงหรือหายไปของ CD55 (รวมทั้ง CD59) บนเม็ดเลือดแดง และทำให้เกิดอาการของโรค paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) ซึ่งเป็น acquired hemolytic disorder ที่พบได้น้อย การเป็น PNH จะเกิดการเพิ่มขึ้นของ C3b และ C9 ทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง CD59 หรือ membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL) หรือ protectin เป็น GPI-anchored cell surface protein มีโครงสร้างเหมือนกับ venom neurotoxin ของงู พบบนเซลล์ทั่วไป การแสดงออกบนเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความสำคัญต่อการป้องกันการแตกของเซลล์จากระบบคอมพลีเมนต์ CD59 ป้องกันเซลล์แตกโดยจับกับ C9 ยับยั้ง C5b-9 complex และป้องกันการเกิด terminal polymerization ของ membrane attack complex (MAC) ใน plasma membrane⁽⁷⁻⁸⁾ นอกจากโรค PNH แล้วยังพบการแสดงออกที่ลดลงของ CD55 และ CD59 ในโรคอื่น เช่น autoimmune hemolytic anemia (AIHA)⁽¹⁸⁾ autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP)⁽¹⁹⁾ และ lymphopenia ที่เกิด

จาก systemic lupus erythematosus (SLE)⁽²⁰⁾ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษา CD55 และ CD59 บนเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย β -thalassemia โดย Obiad JM และคณะ ในปี 2012⁽⁹⁾ ซึ่งพบการแสดงออกของ CD55 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วย thalassemia major และลดลงเล็กน้อยในผู้ป่วย thalassemia intermedia เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างปกติ ในปี 2017 การศึกษาของ Kurtogllu AU และคณะ⁽¹⁰⁾ พบผลการศึกษาที่สอดคล้องกันคือพบการลดลงของ CD55 และ CD35

งานวิจัยนี้ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงแตกต่างกัน โดยแบ่งความรุนแรงของโรคเป็นรุนแรงน้อย ปานกลาง และมาก ผลการศึกษาอัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ในกลุ่มตัวอย่างที่รุนแรงแตกต่างกัน ซึ่งพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่รุนแรงมากเป็นชนิด non-deletion ทั้งหมดสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด non-deletion มีอาการรุนแรงมากกว่า⁽²¹⁾ และการพบอัลฟาธาลัสซีเมียจีโนไทป์ชนิด non-deletion ทั้งในกลุ่มที่รุนแรงน้อย ปานกลางและมาก ช่วยยืนยันข้อมูลที่ผ่านมาก็พบว่าโรคฮีโมโกลบินเอชชนิด non-deletion ถึงแม้จะเป็นจีโนไทป์ชนิดเดียวกันแต่มีอาการที่หลากหลาย⁽³⁾

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับการแสดงออกของ CD55 และ CD59 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงแตกต่างกัน โดยการทำลายเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชเกิดจาก β -globin chain ส่วนเกินที่เหลือจะตกตะกอนและรวมตัวกันเป็น β -globin tetramer (β_4) เรียกว่า Hb H ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายเกิดการตกตะกอนภายในเซลล์ หากเกิดในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (erythroblast) จะทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนและมีการสร้างเม็ดเลือดแดงที่ไขกระดูกผิดปกติ (ineffective erythropoiesis) แต่ส่วนใหญ่การตกตะกอนนี้มักจะเกิดในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวแก่และเกาะที่เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดความเสียหายของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป และเม็ดเลือดแดงจะถูกทำลายก่อนเวลาอันควร เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชจะแข็ง (rigid) ซึ่งลักษณะของ

เยื่อหุ้มเซลล์แบบนี้ทำให้ไหลเวียนไปในหลอดเลือดฝอยไม่ดีและง่ายต่อการถูกทำลายจับกินโดยแมคโครฟาจจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าการเป็นไข้หรือติดเชื้อสามารถกระตุ้นให้เกิด Hb H inclusion bodies ซึ่งจะนำมาสู่การเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกมากขึ้น (hemolytic crisis) และฮีโมโกลบินลดลงอย่างรวดเร็วได้ การสูญเสียสมดุลของ phospholipid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดง phosphatidylserine ออกมาที่ผิวด้านนอกของเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย น่าจะกระตุ้นให้เกิด intramedullary erythroblast apoptosis และเกิดการจับกินเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติโดยแมคโครฟาจ นอกจากนี้ Ig G ที่แสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงและคอมพลีเมนต์น่าจะมีส่วนทำให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย^(4, 22) ผลการศึกษา CD55 และ CD59 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชในกลุ่มที่รุนแรงน้อย ปานกลาง และมาก เปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างคนปกติในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าทั้ง CD55 และ CD59 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มพบการแสดงออกที่ลดลงของ CD55 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงปานกลาง ($77.8 \pm 14.94\%$) มากกว่ากลุ่มอาการรุนแรงน้อย ($87.4 \pm 12.22\%$) (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษาที่ผ่านมาในกลุ่มผู้ป่วย β -thalassemia ที่พบว่าตัวอย่างที่รุนแรงมากกว่าจะมีการแสดงออกของ CD55 ที่ลดลง⁽⁹⁻¹⁰⁾ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังพบผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกัน กล่าวคือ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงมากมีการแสดงออกของ CD55 ($95.8 \pm 3.42\%$) มากกว่ากลุ่มที่รุนแรงปานกลาง ($77.8 \pm 14.94\%$) ในประเด็นนี้มีความเป็นไปได้ว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่รุนแรงมาก เม็ดเลือดแดงที่มีการแสดงออกของ CD55 ปริมาณน้อยบนผิวเซลล์อาจเกิดการแตกทำลายไปแล้ว ทำให้เม็ดเลือดแดงที่ถูกเลือกมาตรวจวิเคราะห์เป็นกลุ่มเม็ดเลือดแดงที่ยังมีการแสดงออกของ CD55 ปริมาณมาก ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการรุนแรงมากนี้ มีผู้ป่วยถึง 2 รายที่มาพบแพทย์ด้วยภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลัน (hemolytic crisis) โดยผู้ป่วย 2 รายนี้พบว่าค่า Hb ที่ต่ำ คือ 7.4 และ

7.7 g/dL (ข้อมูลไม่ได้แสดง) จึงมีความเป็นไปได้ที่การตรวจวิเคราะห์ CD55 จะมีผลกระทบจากภาวะที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์และปริมาณ Hb ของผู้ป่วย ส่วนผลการศึกษา CD59 พบว่าแสดงออกไม่แตกต่างกันและพบการแสดงออกในเม็ดเลือดแดงจำนวนมากทั้งในกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติ (ตารางที่ 3) การศึกษานี้ที่พบกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งมีการแสดงออกของ CD55 ที่ลดลง แต่ CD59 ปกติแสดงให้เห็นว่ามี GPI-anchored type 1 surface protein ที่ปกติและไม่ใช่ PNH clone

ผลการศึกษาในระดับคอมพลีเมนต์ C3 พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงน้อย ปานกลางและมาก มีระดับคอมพลีเมนต์ C3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value; 0.611) แต่ระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในกลุ่มผู้ป่วยที่รุนแรงมากมีแนวโน้มลดลง (1.05 ± 0.17 g/L) เมื่อเทียบกับกลุ่มรุนแรงปานกลาง (1.15 ± 0.29 g/L) ซึ่งในกลุ่มที่รุนแรงมากนี้พบว่าเป็นผู้ป่วย Hb H-CS ทั้งหมด (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาดังกล่าวเป็นไปในทำนองเดียวกับการศึกษาของ Leecharoenkiat K และคณะในปี 2014⁽¹¹⁾ ที่ได้ศึกษาโปรตีนในผู้ป่วยฮีโมโกลบินเอช โดยการทำให้ 2D electrophoresis และพบว่า Hb H-CS ซึ่งมีอาการรุนแรงกว่า มีการแสดงออกของคอมพลีเมนต์ C3 ลดลงเมื่อเทียบกับ Hb H อย่างไรก็ตามผลการตรวจระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในงานตรวจประจำวันด้วยหลักการ turbidimetric test ที่ไม่แตกต่างกันนี้ชี้ให้เห็นว่าระดับคอมพลีเมนต์ C3 ไม่ได้สะท้อนความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอชหรือการตรวจคอมพลีเมนต์ C3 ในงานตรวจประจำวันอาจเป็นวิธีตรวจที่ไม่มีความไว (sensitivity) เพียงพอในการประเมินความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอช

การศึกษานี้สรุปได้ว่าระดับคอมพลีเมนต์ C3 ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงน้อย ปานกลาง และมาก ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาการแสดงออกของ CD55 และ CD59 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีอาการรุนแรงน้อย ปานกลาง มาก และกลุ่มตัวอย่างคนปกติ แต่การแสดงออกของ CD55 มีแนวโน้มที่จะลดลงในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากกว่า หากทำการศึกษาต่อไปในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นโดยเฉพาะการ

เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดภาวะดังกล่าว น่าจะต้องค้นคว้าความรู้ใหม่เกี่ยวกับการแสดงออกของ CD55 และ CD59 ในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชที่มีความรุนแรงต่างกันได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2561 และทุนการศึกษาวิจัยสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภายใต้โครงการยกระดับสมรรถนะนักวิจัยไทยเพื่อสร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน ประจำปีงบประมาณ 2561

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือเป็นอย่างดี และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

1. Liu TC, Chiou SS, Lin SF, Chen TP, Tseng WP, Chen PH, et al. Molecular basis and hematological characterization of Hb H disease in southeast Asia. *Am J Hematol* 1994; 45: 293-7.
2. Prayalaw P, Teawtrakul N, Jetsrisuparb A, Pongudom S, Fucharoen G, Fucharoen S. Phenotype and Genotype in a Cohort of 312 Adult Patients with Nontransfusion-Dependent Thalassemia in Northeast Thailand. *Acta Haematol* 2016; 135: 15-20.
3. Fucharoen S, Viprakasit V. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009: 26-34.
4. Chui DH, Fucharoen S, Chan V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood* 2003; 101: 791-800.
5. Au WY, Cheung WC, Hu WH, Chan GC, Ha SY, Khong PL, et al. Hyperbilirubinemia and cholelithiasis in Chinese patients with hemoglobin H disease. *Ann Hematol* 2005; 84: 671-4.
6. Yu LH, Liu D, Cai R, Shang X, Zhang XH, Ma XX, et al. Change in hematological parameters in inherited with erythroid Kruppel-like factor mutations. *Clin Genet* 2015; 88: 56-61.
7. Ruiz-Argüelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev* 2007; 6: 155-61.
8. Ruiz-Delgado GJ, Vázquez-Garza E, Méndez-Ramírez N, Gómez-Almaguer D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2009; 14: 33-7.
9. Obaid JM, Abo El-Nazar SY, Ghanem AM, El-Hadidi AS, Mersal BH. Expression of CD55 on Red Blood Cells of β -Thalassemia Patients. *Hemoglobin* 2014; 38: 339-44.
10. Kurtogllu AU, Koçtekin B, Kurtoglu E, Yildiz M, Bozkurt S. Expression of CD55, CD59, and CD35 on red blood cells of β -thalassaemia patients. *Cent Eur J Immunol*. 2017; 42: 78-84.

11. Leecharoenkiat K, Sornjai W, Khungwanmay-thawee K, Paemanee A, Chaichana C, Roytrakul S, et al. Comparative plasma protein profiling of hemoglobin H disease. *Dis Markers* 2014; 2014: 340214.
12. Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, Vrettou C, Metaxotou-Mavrommati A, Stamoulakatou A, et al. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. *Br J Haematol* 2000; 111: 915-23.
13. Sae-ung N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Alpha(0)-thalassemia and related disorders in northeast Thailand: a molecular and hematological characterization. *Acta Haematol* 2007; 117: 78-82.
14. Fucharoen S, Fucharoen G, Fukumaki Y. Simple non-radioactive method for detecting haemoglobin Constant Spring gene. *Lancet* 1990; 335: 1527.
15. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Hb Pakse [(alpha2) codon 142 (TAA-->TAT or Term-->Tyr) in Thai patients with EAbart's disease and Hb H Disease. *Hemoglobin* 2002; 26: 227-35.
16. Gwamaka M, Fried M, Domingo G, Duffy PE. Early and extensive CD55 loss from red blood cells supports a causal role in malarial anaemia. *Malar J.* 2011; 10: 386.
17. Brodsky RA. Complement in hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015; 2015: 385-91.
18. Richaud-Patin Y, Pérez-Romano B, Carrillo-Maravilla E, Rodríguez AB, Simón AJ, Cabiedes J, et al. Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2003; 88: 95-9.
19. Douglas B, Cines MD, Victor S, Blanchette MB, Chir B. Immune thrombocytopenic purpura. *New Engl J Med* 2002; 346: 995-1008.
20. García-Valladares I, Atisha-Fregoso Y, Richaud-Patin Y, Jakez- Ocampo J, Soto-Vega E, Elías-López D, et al. Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Lupus* 2006; 15: 600-5.
21. Fucharoen S, Winichagoon P, Pootrakul P, Piankijagum A, Wasi, P. Difference between two types of Hb H disease, alpha-thalassaemia 1/alpha-thalassaemia 2 and alpha-thalassaemia 1/Hb Constant Spring. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1987; 23: 309-15.
22. Liebhaber SA, Schrier SL. Pathophysiology of α thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. *Disorders of Hemoglobin; Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management.* Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2001: 391-404.