ปริมาณ HbE และ HbF

ในผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalassemia มีความหลากหลาย

HbE and HbF levels in HbE/β^{o}-thalassemia are heterogeneous

ธนูศักดิ์ ตาตุ[1], **พิมลรัตน์ ศักดาศิริสถาพร**[2],
Thanusak Tatu[1], Pimolrat Sakdasirisathaporn[2]
เพ็ญวิสา วงค์ชมภู[2] **วีระศักดิ์ นาวารวงค์**[3]
Penwisa Wongchompoo[2] Weerasak Nawarawong[3]

1 แขนงวิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2 นักศึกษาชั้นปีที่ 4 ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3 หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract

HbE/β^{o}-thalassemia is the syndrome resulted from compound heterozygosity of HbE and β^{o}-thalassemia alleles. The diagnosis of this condition relies on the detection of types and amounts of hemoglobin together with the evaluation of red blood cell morphology. The objective of the present study was to determine types and quantities of hemolglobins in the patients of HbE/β^{o}-thalassmia. The study was conducted in 60 HbE/β^{o}-thalassemic patients attending the Thalassemia Clinic, Hematology Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicne, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. Blood samples were collected before blood transfusion after consent formed has been singed. Hb identification was performed using weak-cation exchange HPLC. HbE allele was characterized by ARMS-PCR, α-thalassemia 1 (SEA type) by Gap-PCR and Hb Bart's by immunochromatographic strip test (IC Strip™). Based on Hb identification profile, 3 groups of samples were revealed. These included Group 1 in which 31 samples having not significantly different quantities of HbE (50.1±8.0%) and HbF (36.2±7.2%), Group 2 in which 13 samples having significant differences of HbE (75.5±7.5%) and HbF (11.5±7.0) and Group 3 whose Hb typing showing minute amount of fast-eluted peak in addition to HbE and HbF, the amounts of which resembling those of Group 2 (HbE = 59.8±11.2%, HbF = 23.0±8.8%). Hematologic parameters were not different among all 3 groups, except MCH. HbE allele was in heterozygous state. α-thalassemia 1 (SEA type) and Hb Bart's were absent in all samples. The finding in this study demonstrates the heterogeneities of the quantities of HbE and HbF in HbE/β^{o}-thalassemia. This result has encouraged the performers to have very great care in making diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies relying on Hb identification.

Key words : HbE/β^{o}-thalassemia, Hb identification, HPLC , HbE, HbF

บทคัดย่อ

HbE/β^{o}-thalassemia เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจาก compound heterozygote ของ HbE allale และ β^{o}-thalassemia allele การวินิจฉัยภาวะดังกล่าวอาศัยการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินร่วมกับการตรวจคุณลักษณะของเม็ดเลือดแดง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่างๆในผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalassemia โดยทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยผู้ใหญ่จำนวน 60 คน ที่เข้ารับการรักษาที่คลินิกธาลัสซีเมีย หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ทำการเจาะเก็บเลือดก่อน เติมเลือดภายหลังการลงนามในใบยินยอม นำตัวอย่างเลือดไปตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยวิธี weak-cation exchange HPLC ตรวจสถานะของ HbE allele ด้วยวิธี ARMS-PCR ตรวจสถานะของ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยวิธี Gap-PCR และตรวจหา Hb Bart's ด้วยวิธี immunochromatographic strip test (IC Strip™) ผลการศึกษาพบผู้ป่วยมี 3 กลุ่มตามชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินคือกลุ่มแรกจำนวน 31 รายมีชนิดฮีโมโกลบินเป็น EF และมีปริมาณ HbE และ HbF ไม่ต่างกันมากนักคือ HbE = 50.1±8.0% และ HbF = 36.2±7.2% ตามลำดับ กลุ่มที่สองจำนวน 13 ราย มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น EF แต่มีปริมาณ HbF ต่ำกว่า HbE อย่างชัดเจนคือ HbF 11.5±7.0 และ HbE 75.5±7.5% ส่วนกลุ่มที่สามจำนวน 16 ราย มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น EF with fast-eluted peak และมีปริมาณ HbE สูงที่สุดคือ 59.8±11.2%, HbF 23.0±8.8% และ fast-eluted peak เพียงเล็กน้อย ทั้งสามกลุ่มมีค่าทางโลหิตวิทยาไม่ต่างกันยกเว้น MCH ผลการตรวจ HbE allele พบว่าทุกรายมี HbE allele ในสถานะ heterozygote, ไม่พบ α-thalassemia 1 (SEA type) และ ไม่พบ Hb Bart's ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของปริมาณฮีโมโกลบินอี (HbE) และฮีโมโกลบินเอฟ (HbF) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น HbE/β^{o}-thalassemia นอกจากนั้นผลการศึกษาครั้งนี้ยังกระตุ้นเตือนให้ผู้ปฏิบัติงาน ต้องใช้ความรอบคอบในการวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียโดยอาศัยการแปลผลจากการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน

คำสำคัญ : ฮีโมโกลบินอี/เบต้า-ศูนย์ ธาลัสซีเมีย, การตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน, เอชพีแอลซี, ฮีโมโกลบินอี, ฮีโมโกลบินเอฟ

บทนำ

β^{o}-thalassemia เป็น β-thalassemia ชนิดรุนแรงที่สุด เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสร้าง β-globin chain ได้ และ HbE เป็น β-structural variant ความผิดปกติของการสังเคราะห์ β-globin chain ทั้งสองชนิดนี้พบบ่อยในประเทศไทย และเมื่อความผิดปกติทั้งสองมาอยู่รวมกัน (compound heterozygote) จะเกิดโรค HbE/β^{o}-thalassemia หรือ β^{o}-thalassemia/HbE disease ซึ่งเป็นกลุ่มอาการธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงอันเกิดจากการมีภาวะโลหิตจางเรื้อรังเนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตกและการมีภาวะแทรกซ้อนมากมายที่เป็นผลจากการเติมเลือดและจากภาวะโลหิตจาง[1-5] ภาวะหรือความผิดปกติดังกล่าวนี้มีลักษณะพิเศษคือมีความหลากหลายของอาการทางคลินิก กล่าวคือผู้ป่วยอาจจะมีอาการรุนแรงมากเรียกว่า thalassemia major หรือบางครั้งอาจจะมีอาการไม่รุนแรงเรียกว่า thalassemia intermedia ในรายที่มีอาการรุนแรงมาก ผู้ป่วยมีลักษณะอาการทางคลินิกแบบโรคธาลัสซีเมียทั่วไป กล่าวคือมีภาวะโลหิตจาง มีตับโต ม้ามโต มีภาวะดีซ่าน มีการเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยเฉพาะบริเวณใบหน้า ทำให้ใบหน้าเปลี่ยนไปเป็น thalassemia face หรือ mongoloid face [6-8]

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของโรคดังกล่าว นอกจากพิจารณาจากผลการตรวจเบื้องต้นเช่น One-tube osmotic fragility test (OFT), dichlorophenol indolphenol precipitation (DCIP) test, Hb, Hct, RBC indices และ RBC morphology แล้ว การตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ถือว่าเป็นการตรวจหลักที่สามารถให้การวินิจฉัยโรคนี้ได้อย่างถูกต้อง [5, 9, 10]

เป็นที่ทราบกันดีว่าผู้ที่เป็น HbE/β^{o}-thalassemia มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น EF การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalassemia โดยวิธี cation-exchange HPLC พบว่าชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีความหลากหลายและอาจเป็นหลุมพราง (pitfall) ในการวินิจฉัยหากการวินิจฉัยอาศัยการพิจารณา ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb identification) เพียงอย่างเดียว

วิธีการศึกษา

ทำการศึกษาในผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalassemia ผู้ใหญ่จำนวน 60 คน ที่เข้ารับการตรวจรักษาที่คลินิกธาลัสซีเมีย หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาล

มหาราชนครเชียงใหม่ ทำการเจาะเลือดคนละ 3-5 มล ก่อนการเติมเลือด โดยก่อนการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด ผู้ป่วยทุกคนต้องลงนามในใบยินยอมก่อนเพื่อแสดงความสมัครใจ นำตัวอย่างเลือดไปตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธี weak cation exchange high performance liquid chromatography (HPLC) (Primus™ Hemoglobin Testing System) [11] ร่วมกับตรวจสอบสถานะของ HbE allele โดยวิธี Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR [12] และตรวจสอบสถานะของ α-thalasssemia 1 ชนิด Southest Asian (SEA type) ด้วยวิธี Gap-PCR [13] และตรวจหา Hb Bart's ด้วยวิธี immunochromatigrapic strip test (IC Strip™, iMED Thailand)[14] วิเคราะห์สถิติเพื่อหาความแตกต่างของ ปริมาณ HbE และ HbF ในแต่ละกลุ่มด้วย Mann-Whitney U test สำหรับ 2-independent samples และ Wilcoxon signed ranks test สำหรับ 2-related samples โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์ [15]

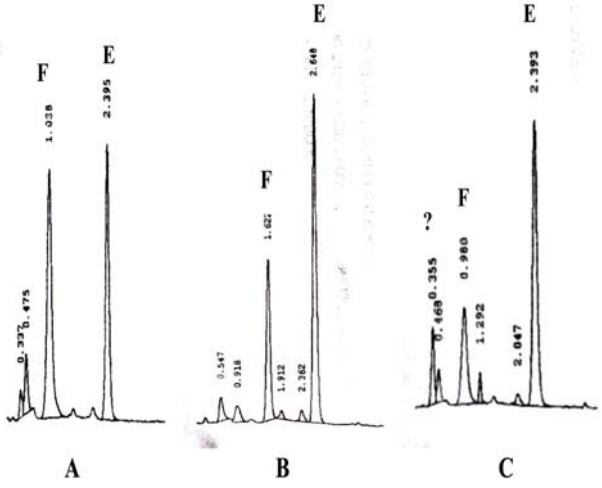
ผลการศึกษา

ผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในผู้ป่วยทั้ง 60 รายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น HbE/β-thalassemia พบว่ามีรูปแบบของชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 มี Hb typing เป็น EF และ มี HbE และ HbF ในปริมาณที่ต่างกันไม่มาก กลุ่มที่ 2 มี Hb typing เป็น EF และ HbE มากกว่า HbF อย่างชัดเจน และ กลุ่มที่ 3 มี Hb typing เป็น EF with fast-eluted peak โดยมี HbE มากที่สุด (รูปที่ 1 และ ตารางที่ 1) การเปรียบเทียบ HbE และ HbF ระหว่างกลุ่มด้วย Mann-Whitney U test พบว่าปริมาณ HbE ในแต่กลุ่ม 1, 2 และ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับ HbF ส่วนการเปรียบเทียบ HbE กับ HbF ในกลุ่มเดียวกัน โดยสถิติ Wilcoxon signed ranks test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นกัน (ตารางที่ 1) การเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยาระหว่างกลุ่ม โดยสถิติ one-way ANOVA ไม่พบความแตกต่าง ยกเว้นระดับ mean corpuscular hemoglobin (MCH) ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 (ตาราง ที่ 2) การกระจายตัวของระดับ HbE และ HbF เหลื่อม (overlap) กันในกลุ่มที่ 1 แต่แยกจากกันชัดเจนในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 (รูปที่ 2) ผลการตรวจสถานะ HbE allele โดย ARMS-PCR พบว่าทุกราย HbE allele อยู่สถานะ heterozygote (รูปที่ 3) และผลการตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) โดยวิธี Gap-PCR ให้ผลลบทุกราย (รูปที่ 4) สอดคล้องกับการตรวจ Hb Bart's โดย IC Strip test ซึ่งให้ผลลบทุกรายเช่นกัน (รูปที่ 5)

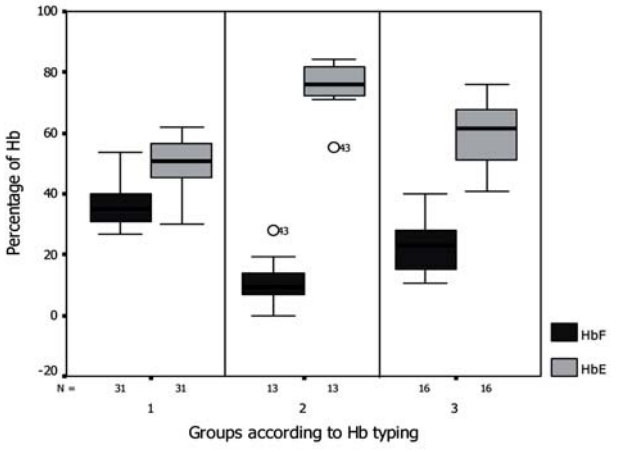
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ HbE และ HbF ในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalassemia ค่า HbE และ HbF แสดงในรูป mean ± SD และ range

Hb typing	HbE (%)	HbF (%)	*p*-value*	Fast-eluted peak
กลุ่มที่ 1 (n = 31)	50.1 ± 8.0 (42.1-58.1)	36.2 ± 7.2 (29.0-43.4)	< 0.05	no
กลุ่มที่ 2 (n = 13)	75.5 ± 7.5 (68.0-83.0)	11.5 ± 7.0 (4.5-18.5)	< 0.05	no
กลุ่มที่ 3 (n = 16)	59.8 ± 11.2 (48.6-71.0)	23.0 ± 8.8 (14.2-31.8)	< 0.05	yes
p-value**	< 0.05	< 0.05		

*HbE vs HbF (Wilcoxon signed ranks test), **(Mann-Whitney U test)



รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) โดยวิธี weak-cation exchange HPLC ในผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalassemia กลุ่มที่ 1 (A), กลุ่มที่ 2 (B) และกลุ่มที่ 3 (C) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มี fast-eluted peak (?)

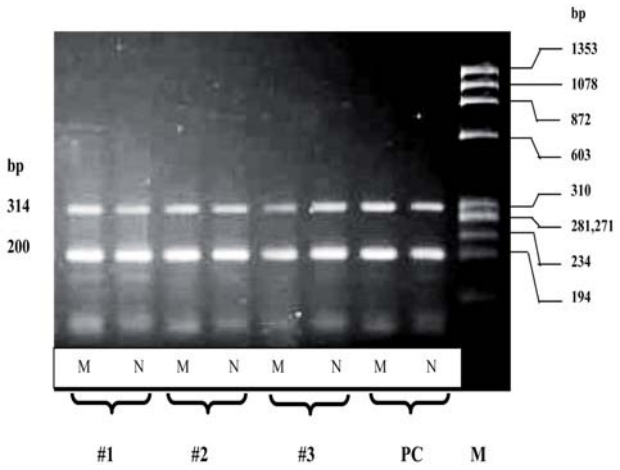


รูปที่ 2 แสดงการกระจายของระดับ HbE และ HbF ใน HbE/β^{o}-thalassemia แต่ละกลุ่ม (1 หมายถึง "กลุ่มที่ 1", 2 หมายถึง "กลุ่มที่ 2" และ 3 หมายถึง "กลุ่มที่ 3")

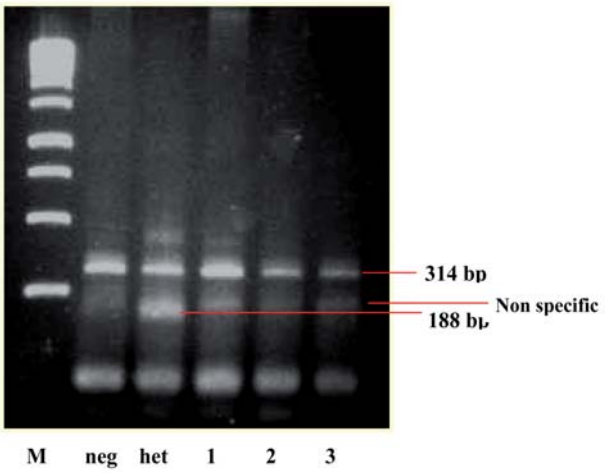
ตารางที่ 2 แสดงค่าทางโลหิตวิทยาในแต่ละกลุ่มของผู้ป่วย HbE/β°-thalassemia (แสดงในรูปแบบ mean ± SD)

	RBC* (M/μl)	Hb* (g/dl)	Hct* (%)	MCV* (fl)	MCH** (pg)	MCHC* (g/dl)	RDW* (%)
กลุ่มที่ 1 (n = 31)	3.70±0.72	7.5±1.2	25.4±3.8	69.7±10.5	20.8±3.2	29.4±1.4	24.1±2.6
กลุ่มที่ 2 (n = 13)	4.21±1.16	7.2±1.4	25.1±3.6	62.2±12.6	17.7±1.7	28.8±1.7	22.7±4.2
กลุ่มที่ 3 (n = 16)	3.47±0.71	6.6±1.2	22.9±3.6	67.4±11.6	19.4±2.8	29.0±1.6	24.6±3.3

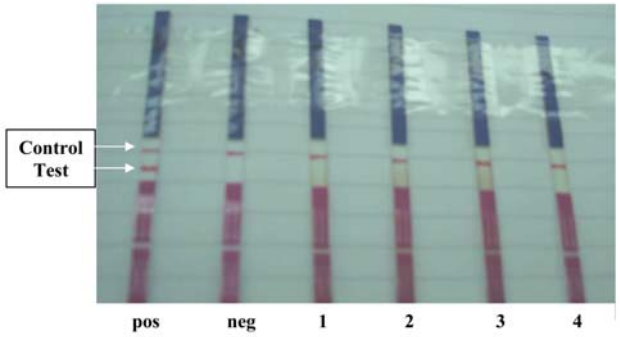
* *p-value* (one-way ANOVA) > 0.05, ** *p-value* (one-way ANOVA) < 0.05



รูปที่ 3 แสดงผล ARMS-PCR เพื่อตรวจหา HbE allele แถบขนาด 200 bp เป็น HbE allele ส่วนแถบขนาด 314 bp เป็น α-globin gene ซึ่งใช้เป็น internal control (M = Mutant, N = Normal, PC = Positive control, M = ϕX174-Hae III DNA fragment as size standard marker)



รูปที่ 4 แสดงผล Gap-PCR เพื่อตรวจหา α-thalassemia 1 (SEA type) เลน 1 (M) เป็น 1-kb DNA size standard, เลน 2 (neg) เป็น negative control พบแต่ PCR products ขนาด 314 bp, เลน 3 (het) เป็น heterozygote control พบ PCR products ขนาด 314 bp และ 188 bp, เลน 4, 5, 6 เป็นส่วนหนึ่งของตัวอย่างตรวจที่ให้ผลลบ (negative)ทุกรายเพราะพบแต่ PCR products ขนาด 314 bp เช่นเดียวกับ negative control (แถบ NS เป็น non-specific products)



รูปที่ 5 แสดงผลการตรวจ Hb Bart's โดยวิธี immunochromatographic strip test (IC Strip) [pos = positive control, neg = negative control] ตัวอย่างที่ 1-4 ให้ผลการตรวจเป็นลบ

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

แม้จะเป็นที่ทราบกันดีว่าในผู้ที่เป็น HbE/β°-thalassemia มีฮีโมโกลบิน 2 ชนิดคือ HbE และ HbF (Hb typing เป็น EF) แต่จะเห็นจากการศึกษานี้ว่าปริมาณของ HbE และ HbF ในผู้ป่วยที่นำมาศึกษามีความหลากหลายและสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีชนิดและปริมาณ ฮีโมโกลบินที่เข้าได้กับ HbE/β°-thalassemia[7,16] ต่างจากผู้ป่วยกลุ่ม 2 และ 3 ซึ่งมีระดับ HbF ต่ำกว่าระดับ HbE มาก ทำให้อาจแปลผลเป็น homozygous E ได้ถ้าหากไม่มีประวัติครอบครัวหรือผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างอื่นพิจารณาประกอบ เนื่องจากผู้ที่เป็น homozygous HbE บางรายอาจจะมีระดับ HbF สูงอย่างชัดเจนได้ [17] อย่างไรก็ตาม หลังจากตรวจวิเคราะห์ HbE allele โดยวิธี

ARMS-PCR พบว่าผู้ป่วยเหล่านี้มี HbE allele อยู่ในภาวะ heterozygous state แสดงว่าผู้ป่วยเหล่านี้เป็น HbE/β^{o}-thalassemia จริงไม่ใช่ homozygous E การที่ HbF ต่ำกว่า HbE มากในผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 คาดว่าอาจเป็นผลจากการมี α-thalassemia ร่วมอยู่ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยกลุ่มที่ 3 ซึ่งพบ fast-eluted peak ซึ่งในเบื้องต้นคาดว่าเป็น Hb Bart's และผู้ป่วย กลุ่มนี้น่าจะเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น EFBart's disease ที่เกิดจากการอยู่ร่วมกันของ HbH disease กับ HbE/β^{o}-thalassemia (--/-α+β^{E}/β^{o}) [18, 19] อย่างไรก็ตาม จากการตรวจ α-thalassemia 1 (SEA type) ด้วยวิธี Gap-PCR และตรวจระดับ Hb Bart's ด้วย IC Strip test ปรากฏว่าได้ผลลบ แสดงว่าไม่มี α-thalas semia เข้ามาเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ดังกล่าวและ fast-eluted peak ที่พบในกลุ่มที่ 3 อาจเป็น hemoglobin derivatives เช่น acetaldehyde adducts [20, 21] หรือ unbound denatured hemoglobins ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียม hemoglobin solution หรือ hemolysate ที่ใช้ตรวจเป็นการเตรียมอย่างง่าย คือผสม whole EDTA blood กับ hemolysis reagent ซึ่งเป็น aqueous solution ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิตเครื่อง [11] ไม่มีกระบวนการสกัดด้วย CCl_4 หรือ tolueneเหมือนวิธีมาตรฐานการเตรียม hemolysate อย่างง่ายอาจมี plasma proteins หรือ membrane proteins ปะปนอยู่ใน hemolysate ได้ และเนื่องจากโดยหลักการของการแยกฮีโมโกลบินเป็น cation exchange HPLC นั้น Hb Bart's จะถูกชะ (eluted) ออกจาก column เป็นอันดับแรกตรงกับบริเวณของ fast-eluting peak พอดี [11] ดังนั้นผลจากการศึกษานี้จึงช่วยย้ำเตือนอีกว่าการพบ peak ดังกล่าวอาจเป็นหลุมพลาง (pitfall) ทำให้แปลผลผิดเป็น Hb Bart's ซึ่งการพบผลตรวจเช่นนี้ผู้ปฏิบัติต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการเช่นวิธีการเตรียม hemolysate, อายุของตัวอย่างเลือดอายุของ hemolysate รวมทั้งอายุการใช้งานของ HPLC column อนึ่งระดับ HbF ที่ต่ำกว่า HbE มากใน 2 กลุ่มหลังนี้น่าจะเกิดจากสาเหตุอื่น เช่น ความแตกต่างของระดับฮอร์โมน erythropoietin (EPO) ในผู้ป่วยแต่ละรายจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับ HbF ที่แตกต่างกันในผู้ป่วย HbE/β-thalassemia เป็นผลจากความแตกต่างของ ระดับ EPO ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงในภาวะ ineffective erythropoiesis ที่พบเสมอในผู้ป่วย HbE/β-thalassemia ที่มีอัตราการเติมเลือดที่ต่างกัน [22] อนึ่งแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้นำข้อมูลความถี่ของการได้รับเลือดและระยะเวลาหลังการได้รับเลือดครั้งสุดท้ายมาร่วมวิเคราะห์ด้วย แต่ผลการศึกษาที่พบสามารถยืนยันว่าผู้ป่วยที่ศึกษามีอัตราการได้รับเลือดที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีปริมาณ HbF ที่แตกต่างกัน สถานการณ์เช่นนี้เป็นสิ่งที่ห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียในงานตรวจประจำวัน (routine laboratory thalassemia diagnosis) ต้องประสบเสมอเพราะตัวอย่างที่ส่งตรวจส่วนใหญ่ไม่มีประวัติการได้รับเลือดส่งแนบด้วย ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะช่วยย้ำเตือนให้ผู้ปฏิบัติงานได้ตระหนักถึงความหลากหลายปริมาณ HbF และ HbE ในตัวอย่างที่ส่งตรวจดังกล่าว

นอกจากภาวะ erythropoietic stress และระดับ EPO ที่เพิ่มขึ้นตามอัตราการได้รับเลือดที่เป็นกลไกนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ HbF ในผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalassemia ดังที่ได้กล่าวแล้ว ปัจจุบันทราบว่าการสร้าง HbF มีปัจจัยเกี่ยวข้องอีกหลายอย่าง ทั้งปัจจัยที่ไม่เกี่ยวข้องกับยีน (non-genetic factors) เช่น butyrate และ thyroid hormone ซึ่งถ้ามีระดับสูงขึ้นมักทำให้ระดับ HbF สูงขึ้น [23, 24], ผู้หญิงมักมีระดับ HbF สูงกว่าผู้ชาย [25], ภาวะ myelodysplastic syndrome ที่มีพยากรณ์โรคดีมักมีระดับ HbF สูงร่วมด้วย [26] และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับยีน (genetic factors) ทั้งที่เกี่ยวข้องกับ β-globin gene cluster (in-cis factors) เช่น XmnI-$^{G}\gamma$ polymorphism [27-29] และที่ไม่เกี่ยวข้องกับ β-globin gene cluster (in-trans factors) เช่น HBS1L-Myb intergenic polymorphism (HMIP)[30] บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 (6q23), BCL11A gene บนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 2 (2p15) [31, 32] และ EKLF gene บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม 19 (19p13) [33, 34] ความผิดปกติของ genetic factors เหล่านี้อาจทำให้ระดับของ transcription factors ที่จำเป็นต่อการแสดงออกของ β-globin gene เปลี่ยนไปหรือทำหน้าที่ผิดปกติไป ส่งผลให้ระดับ Hb F เพิ่มขึ้นความหลากหลายของระดับ HbF ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาในครั้งนี้ ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากปัจจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นซึ่งต้องศึกษาต่อไป

การศึกษาครั้งนี้สรุปว่าผู้ป่วย HbE/β^{o}-thalas semia มีระดับ HbE และ HbF ต่างกัน การวินิจฉัยผู้ที่สงสัยว่าเป็น HbE/β-thalassemia โดยอาศัยผลการแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing) เป็นหลักจะต้องใช้ความละเอียดและความระมัดระวัง และหากเกิดความไม่แน่ใจเช่น กรณี HbF ต่ำมาก จะต้องอาศัยผลจากการตรวจอย่างอื่นเช่น complete blood count ร่วมกับการตรวจ RBC morphology และ DNA analysis เข้าร่วมในการพิจารณาด้วย [35] อีกทั้งการพิจารณาระดับ EPO และประวัติการเติมเลือดนอกจากจะช่วยในการให้การวินิจฉัยที่ถูกต้องยิ่งขึ้นแล้ว ยังช่วยแพทย์ในการปรับปรุงวิธีการรักษาโดยการเติมเลือด (blood transfusion) ด้วย

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องตรวจโรคและห้องเจาะเลือด คลินิกโรคธาลัสซีเมีย หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดและข้อมูลเบื้องต้นของผู้ป่วย ขอขอบคุณผู้ป่วยทุกท่านที่กรุณาอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการนี้ และขอขอบคุณคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่กรุณาอนุญาตให้ดำเนินการวิจัยนี้ ตามเอกสารรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์เลขที่ 130/2548 อนึ่ง การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2548 และ 2549

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairuam V. Beta-thalassemia associated with alpha-thalassemia in Thailand. Hemoglobin. 1988; 12(5-6): 581-92.
2. Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in SouthEast Asia: problems and strategy for prevention and control. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1992; 23(4): 647-55.
3. Fucharoen S, Winichagoon P, Siritanaratkul N, Chowthaworn J, Pootrakul P. Alpha- and beta-thalassemia in Thailand. Ann N Y Acad Sci. 1998; 850: 412-4.
4. Wasi P, Na-Nakorn S, Pootrakul S, et al. Alpha- and beta-thalassemia in Thailand. Ann N Y Acad Sci. 1969; 165(1): 60-82.
5. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes (Fourth edition). Oxford: Blackwell Scientific; 2001.
6. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and clinical medicine. Hemoglobin. 1997; 21(4): 299-319.
7. Fucharoen S, Ketvichit P, Pootrakul P, Siritanaratkul N, Piankijagum A, Wasi P. Clinical manifestation of beta-thalassemia/hemoglobin E disease. J Pediatr Hematol Oncol. 2000; 22(6): 552-7.
8. Winichagoon P, Thonglairoam V, Fucharoen S, Wilairat P, Fukumaki Y, Wasi P. Severity difference in β-thalassaemia/haemoglobin E syndromes: implication of genetic factors. Br J Haematol. 1993; 83: 633-9.
9. ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี. วิธีตรวจรักษาและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรร้ายแรงในเด็ก. เชียงใหม่: วัฒนชัย; 2537.
10. ธนูศักดิ์ ตาตุ. เทคนิคการแปลผลกาตรวจทางห้องปฏิบัติการโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: หจก. ธนบรรณการพิมพ์; 2550.
11. Primus C. The Primus Variant System 99. The Kansas City; 1999.
12. Old J, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of β-thalassemia: studies in Indian and Cypriot population in the UK. Lancet. 1990; 336: 834-7.
13. Sanguansermsri T, Phumyu N, Chomchven S, Steger HF. Screening for α-thalassemia-1 heterozygotes in expecting couples by combination of a simple erytrocyte osmotic fragility test and a PCR-based method. Community Genetics. 1999; 2: 26-39.
14. Tayapiwatana C, Kuntaruk S, Tatu T, et al. Simple method for screening of α-thalassemia 1 carriers. Int J Hematol 2009; 89: 559-67.
15. นิภา ศรีไพโรจน์. สถิตินอนพาราเมตริก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์; 2533.
16. Fucharoen S, Winichagoon P. Clinical and hematologic aspects of hemoglobin E beta-thalassemia. Curr Opin Hematol. 2000; 7(2): 106-12.
17. Tachavanich K, Viprakasit V, Chinchang W, Glomglao W, Pung-Amritt P, Tanphaichitr VS. Clinical and hematological phenotype of homozygous hemoglobin E: revisit of a benign condition with hidden reproductive risk. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2009; 40(2): 306-16.

18. วิชัย เหล่าสมบัติ. ธาลัสซีเมีย (Thalassemia). กรุงเทพ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์; 2541.
19. สุทัศน์ ฟู่เจริญ, ปราณี วินิจจะกูล ฟู่เจริญ. กลุ่มโรค thalassemia และ hemoglobinopathies. In: ถนอมศรี ศรีวิชัยกุล วิชัย อติชาตการ, แสงสูรีย์ จูฑา, editor. ตำราโลหิตวิทยา. กรุงเทพ; 2529. pp. 130-76.
20. Nguyen LB, Peterson CM. The effect of acetaldehyde concentrations on the relative rates of formation of acetaldehyde-modified hemoglobins. Proc Soc Exp Biol Med. 1984; 177(2): 226-33.
21. Nguyen LB, Peterson CM. Modification of hemoglobin by acetaldehyde: a time course study by high pressure liquid chromatography. Alcohol Clin Exp Res. 1984; 8(6): 516-21.
22. Rees DC, Porter JB, Clegg JB, Weatherall DJ. Why are hemoglobin F levels increased in HbE/β thalassemia? Blood. 1999; 94(9): 3199-204.
23. Faller DV, Perrine SP. Butyrate in the treatment of sickle cell disease and beta-thalassemia. Curr Opin Hematol. 1995; 2(2): 109-17.
24. Kuhn JM, Rieu M, Rochette J, et al. Influence of thyroid status on hemoglobin A2 expression. J Clin Endocrinol Metab. 1983; 57(2): 344-8.
25. Miyoshi K, Kaneto Y, Kawai H, et al. X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by gene(s) on X chromosome. Blood. 1988; 72(6): 1854-60.
26. Reinhardt D, Haase D, Schoch C, et al. Hemoglobin F in myelodysplastic syndrome. Ann Hematol. 1998; 76(3-4): 135-8.
27. Peri KG, Gagnon J, Gagnon C, Bard H. Association of -158(C-T)(XmnI) DNA polymorphism in $^{G}\gamma$ globin promoter with delayed switchover from fetal to adult hemoglobin synthesis. Pediatr Res. 1997; 41(2): 214-7.
28. Shimizu K, Park KS, Enoki Y. The XmnI site 5' to the $^{G}\gamma$-globin gene polymophism and its relationship to %HbF and %$^{G}\gamma$ in normal Japanese and Korean adults. Hum Hered. 1992; 42: 253-8.
29. Thein SL, Sampietro M, Rohde K, et al. Detection of a major gene for heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin after accounting for genetic modifiers. Am J Hum Genet. 1994; 54: 214-28.
30. Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, et al. The HBS1L-MYB intergenic interval associated with elevated HbF levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. Blood. 2009; 114(6): 1254-62.
31. Sedgewick AE, Timofeev N, Sebastiani P, et al. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with beta-hemoglobinopathies. Blood Cells Mol Dis. 2008; 41(3): 255-8.
32. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. Hum Mol Genet. 2009; 18(R2): R216-23.
33. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. Nat Genet. 2010; 42(9): 742-4.
34. Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. Nat Genet. 2010; 42(9): 801-5.
35. Wong SC, Aw TC, Suri R, Wong CK, Plaseska D, Efremov GD. Differential Diagnosis of Hb EE and Hb E-beta(0)-Thalassemia by Protein and DNA Analyses. Acta Haematol. 2000; 103(2): 84-9.