

นิพนธ์ต้นฉบับ

ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินของผู้ป่วย Hb H disease หลังการแยกด้วย weak cation-exchange high performance liquid chromatography (HPLC)

ธนศักดิ์ ตาตุ*, พัชรภรณ์ เลิศคำ*

บทคัดย่อ

Hb H disease เป็น α -thalassemia ซึ่งเกิดจาก compound heterozygote ของ α -thalassemia 1 และ α -thalassemia 2 โดยทั่วไปการวินิจฉัยผู้ป่วย Hb H disease อาศัยข้อมูลทางคลินิกร่วมกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb identification) ปัจจุบันการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธี weak cation-exchange HPLC เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายและมีเครื่อง HPLC ออกมาจำหน่ายหลายยี่ห้อ การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษานิตละปริมาณฮีโมโกลบินของผู้ป่วย Hb H disease ซึ่งวิเคราะห์โดยระบบ The Primus Variant System 99 ของเครื่องยี่ห้อ Primus (Primus Corporation, Kansas City) ซึ่งอาศัยหลักการ weak cation-exchange HPLC ทำการรวบรวมข้อมูลจากผู้ป่วย HbH disease จำนวน 8 รายซึ่งได้ทำการตรวจ Hb H inclusion bodies ยืนยันแล้วว่าเป็น Hb H disease จริง (Hb H inclusion bodies > 50%) ผลจากการวิเคราะห์พบว่าผู้ป่วยทุกรายมีรูปแบบฮีโมโกลบินเป็น A_2AH โดย Hb H ถูกชะออกจาก column ก่อนตามด้วย HbA₀ และ HbA₂ ตามลำดับ พบว่าปริมาณ HbA₂ มีระดับต่ำ (พิสัย 1.0-1.4%) บางรายอ่านไม่ได้ และปริมาณ Hb H มีความแตกต่างกันมาก (พิสัย 4.6-20.6%) การศึกษาครั้งนี้ได้นำเสนอข้อมูลเพื่อย้ำเตือนผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการโลหิตวิทยาในการอ่านผลการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็น Hb H disease ซึ่งมีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 2-7.

คำสำคัญ – High performance liquid chromatography, Hb H disease, weak cation-exchange HPLC, α -thalassemia

*แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Type and Quantity of Hemoglobins in HbH Disease after Separation by Weak-cation Exchange High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Thanusak Tatu*, Patcharaporn Lertkham*

Hb H disease is an α -thalassemia caused by compound heterozygosity of α -thalassemia 1 and α -thalassemia 2. The diagnosis of Hb H disease generally relies on clinical and laboratory informations, particularly hemoglobin identification. At present, several brands of HPLC machine are used to identify types of human hemoglobin under weak-cation exchange principle HPLC. In this report, we have identified hemoglobin types in Hb H disease by using the Primus Variant System 99 (Primus Corporation, Kansas City) under the weak cation-exchange principle. Hemoglobin patterns from 8 Hb H diseases, previously confirmed by presence of >50% Hb H inclusion bodies, were analysed. Hb type of A_2AH was observed in all blood samples. HbH was eluted first, followed by HbA_0 and HbA_2 , respectively. Hb A_2 levels were markedly low (1.0%-1.4%) and, in some cases, negligible. Broad range of Hb H levels was observed (4.6%-20.6%). This report has provided information that could remind the medical technologists in interpreting the hemoglobin pattern for making diagnosis of Hb H disease which is common in Thailand. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 2-7.

Keywords – High performance liquid chromatography, Hb H disease, weak cation-exchange HPLC, α -thalassemia

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

บทนำ

โรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H disease) เป็นกลุ่มอาการเกิดจากการรวมกัน (compound heterozygote) ของ α -thalassemia 1 และ α -thalassemia 2 deletion ทำให้ α -globin genes ขาดหายไป 3 loci เหลืออยู่เพียง 1 locus ทำให้ β -globin chain มีเหลืออยู่ภายในเม็ดเลือดแดงและรวมตัวกันเองเป็น homotetramer β_4 เรียกว่า Hb H⁽¹⁾ ผู้ป่วยมีอาการโลหิตจางปานกลางจนถึงรุนแรงโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีภาวะติดเชื้ การตรวจวินิจฉัยโรคฮีโมโกลบินเอช นอกจากจะตรวจร่างกาย

และซักประวัติแล้ว จำเป็นจะต้องทำการตรวจชนิดฮีโมโกลบินเพื่อตรวจดูการมีอยู่และปริมาณฮีโมโกลบินเอช⁽²⁾ โดยทั่วไปการตรวจดังกล่าวสามารถทำได้โดยใช้วิธีการ starch gel or cellulose acetate electrophoresis และ cation-exchange or anion-exchange high performane liquid chromatography (HPLC)⁽³⁾ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการแสดงผลการแยกชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชด้วยวิธี weak-cation exchange HPLC ทั้งนี้เพื่อแสดงให้เห็นว่าปริมาณ HbH ในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวมีความหลากหลาย

และถ้าผู้ปฏิบัติงานตรวจธาลัสซีเมียโดยใช้วิธี HPLC เพียงอย่างเดียวเลยโดยไม่ใส่ใจหรือไม่มีการประเมินผลจะเกิดความผิดพลาดแปลผลผิดได้

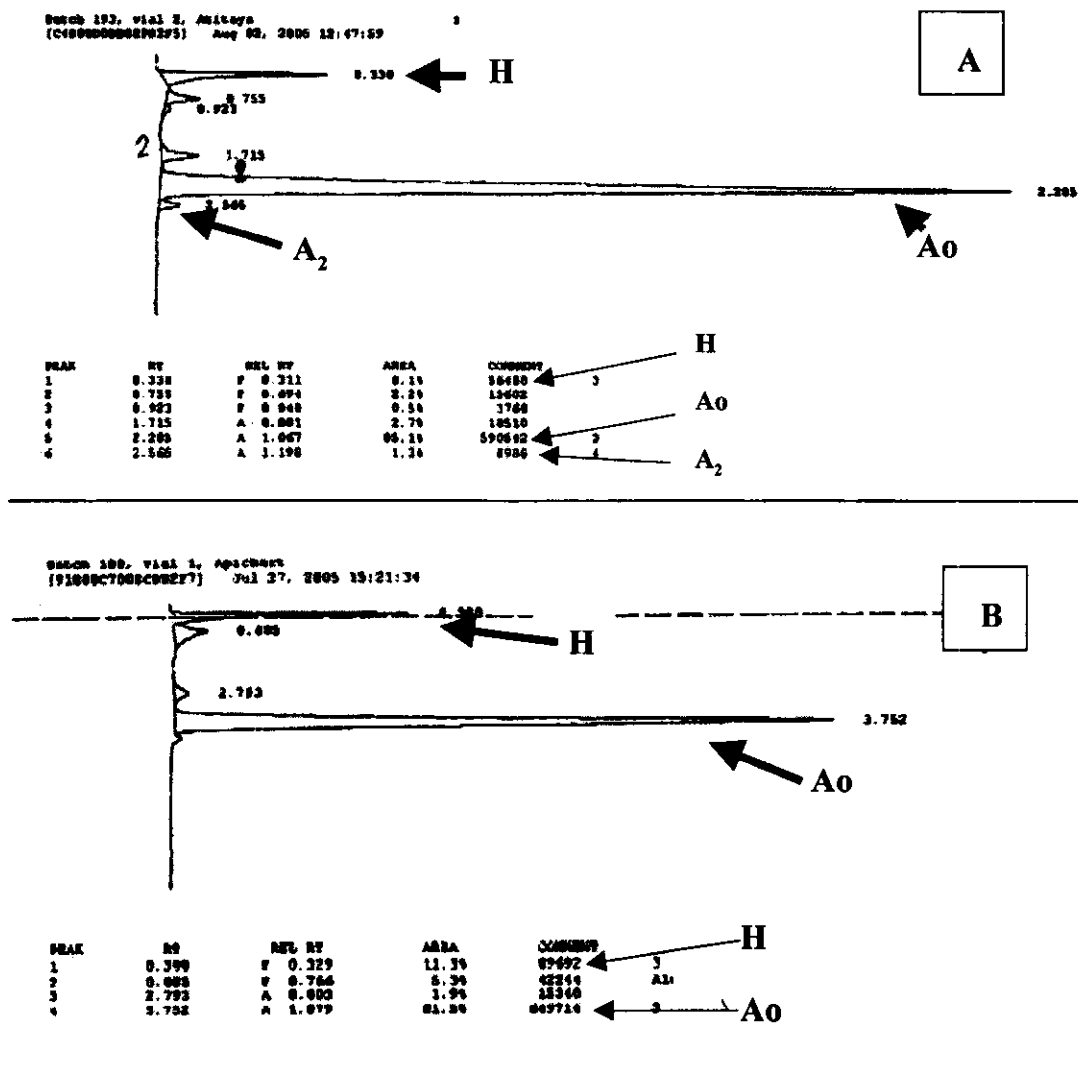
วิธีการศึกษา

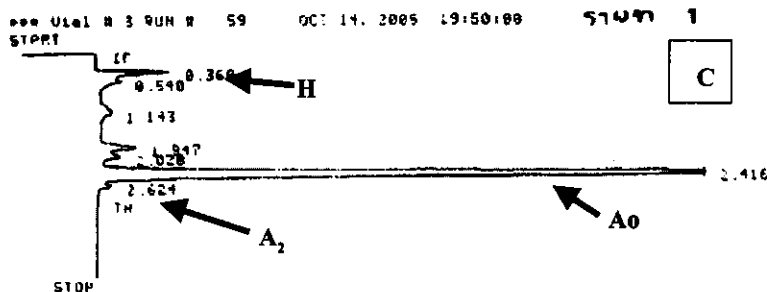
ทำการศึกษาในผู้ป่วย Hb H disease ที่เข้ารับการตรวจเลือดที่ศูนย์บริการเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 8 คน โดยทุกรายพบ Hb H inclusion bodies มากกว่า 50% เมื่อทำการตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี Modified Hb H inclusion body test⁽⁴⁾ จากนั้นวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ Hb H โดยวิธี weak cation-exchange HPLC ด้วยระบบ The Primus Variant System 99 ของเครื่องยี่ห้อ Primus (Primus

Corporation, Kansas City)⁽⁵⁾

ผลการศึกษา

การแยกชนิดฮีโมโกลบินโดยระบบ The Primus Variant System 99 ใช้เวลาในการแยกภายใน 4 นาทีต่อตัวอย่างเลือด 1 ตัวอย่าง จากการศึกษพบว่า ผู้ป่วย Hb H disease มีรูปแบบฮีโมโกลบินเป็น A_2AH โดย Hb H ถูกชะออกมาแรกสุด ตามด้วย HbA₀ และ HbA₂ ตามลำดับ ปริมาณ HbA₂ ต่ำกว่าปกติในทุกราย (1.0%-1.4%) และบางรายหาปริมาณไม่ได้ ปริมาณ Hb H มีความแตกต่างกันมากระหว่างตัวอย่างเลือดแต่ละตัวอย่าง (4.6%-20.6%) ดังแสดงในรูปที่ 1

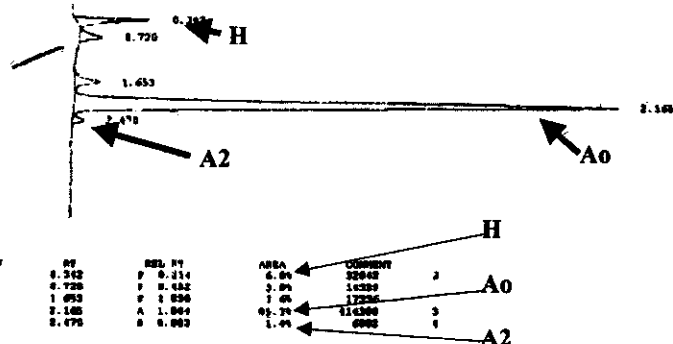




Closing signal: file H: SIGNAL BNC

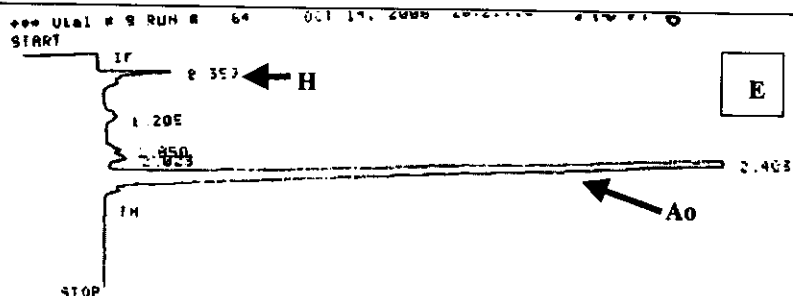
NUM	RT	REL RT	WIDTH	AREA %	COMMENT
1	0.368	RT F	0.254	0.01	H
2	0.640	RT F	0.381	0.125	
3	1.143	RT F	0.905	0.262	
4	1.047	RT F	1.302	0.120	
5	2.020	RT A	0.858	0.135	
6	2.416	RT A	1.022	0.126	A0 Peak
7	2.624	RT A	1.110	0.093	A2 Peak

Batch 146, Vial 2, Load: 1000 16:16:10



Closing signal: file H: SIGNAL BNC

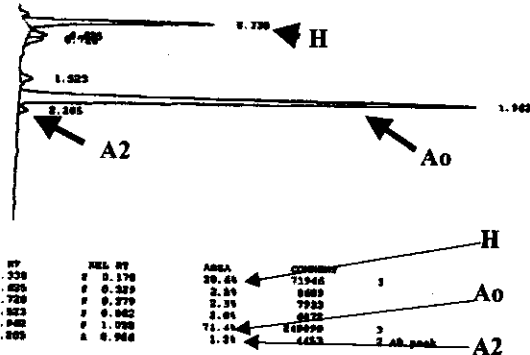
NUM	RT	REL RT	WIDTH	AREA %	COMMENT
1	0.312	F	0.314	0.01	H
2	0.720	F	0.432	0.09	
3	1.453	F	1.856	0.14	A0
4	1.400	A	1.000	0.10	
5	0.470	A	0.000	0.00	A2



Closing signal: file H: SIGNAL BNC

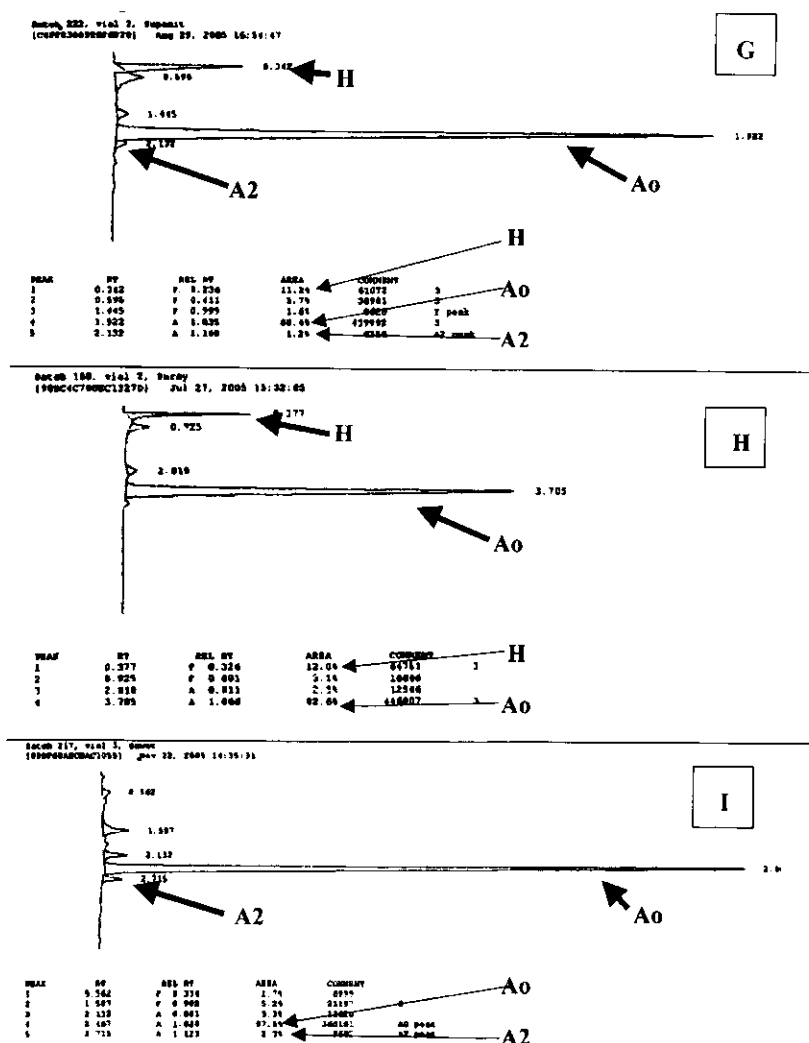
NUM	RT	REL RT	WIDTH	AREA %	COMMENT
1	0.352	RT F	0.273	0.01	H
2	1.205	RT F	0.449	0.366	RLC Peak
3	1.850	RT F	1.304	0.195	
4	2.023	RT A	0.556	0.171	
5	2.403	RT A	1.316	0.148	A0 Peak

Batch 147, Vial 2, Load: 1000 16:12:11



Closing signal: file H: SIGNAL BNC

NUM	RT	REL RT	WIDTH	AREA %	COMMENT
1	0.330	F	0.170	0.01	H
2	0.020	F	0.320	0.01	
3	0.720	F	0.370	0.09	
4	1.523	F	0.500	0.09	A0
5	1.000	F	0.000	0.00	
6	2.000	A	0.000	0.00	A2



รูปที่ 1 แสดง hemoglobin chromatogram ของผู้ป่วย Hb H disease (A-H) และ คนปกติ (I) หลังจากแยกด้วย weak cation-exchange HPLC บนระบบ Primus Variant System 99 ของเครื่องยี่ห้อ Primus

วิจารณ์และสรุปผล

การวินิจฉัยผู้ป่วย Hb H disease ในการตรวจประจำวัน (routine laboratory) อาศัยการตรวจหา Hb H ในตัวอย่างเลือดเป็นสำคัญ การพบ Hb H เป็นสิ่งบ่งบอกว่าอัตราการสร้าง α -globin chains ในผู้ป่วยลดลง ทำให้ β -globin chain เหลืออยู่และจับกันเป็น homotetramer ซึ่งเรียกว่า Hb H ซึ่งถ้าอุ่น (incubate) เม็ดเลือดแดงที่มี Hb H อยู่ภายในกับสียพิเศษบางชนิดคือ brilliant cresyl blue (BCB) จะทำให้ Hb H ถูก oxidize และตกตะกอนภายในเม็ดเลือดแดงเรียกว่า Hb H inclusion bodies การพบ เม็ดเลือดแดงที่มี Hb H inclusion bodies จำนวนมาก (ตั้งแต่ 40% ขึ้นไป) แสดงว่าผู้ป่วยมี Hb H ปริมาณมาก ซึ่งสามารถตรวจดูได้ด้วยวิธี cellulose acetate electrophoresis หรือ วิธี HPLC และถ้าสามารถ

มองเห็นแถบ Hb H โดยวิธี cellulose acetate electrophoresis หรือมองเห็น Hb H peak โดยวิธี HPLC สามารถระบุว่าผู้ป่วยเป็น Hb H disease

HPLC ชนิด weak cation-exchange HPLC เป็นเทคนิควิธีการแยกชนิดและหาปริมาณอีโมโกลบิน ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันทั้งนี้เนื่องจากมีความถูกต้องและมีความไวสูง ขั้นตอนทำไม่ยุ่งยาก ใช้ตัวอย่างเลือดเพียงเล็กน้อย และใช้เวลาน้อยมากในการตรวจตัวอย่างแต่ละราย โดยใช้เวลาแต่ละรายไม่เกิน 6 นาที

ผู้ป่วย Hb H disease โดยทั่วไปมี Hb A, Hb A₂ และ Hb H ในเม็ดเลือดแดง โดยมีปริมาณ HbA₂ ประมาณ 1/3 ของระดับปกติ ทั้งนี้เนื่องจาก α -globin chain มีปริมาณน้อยลงและ affinity ของ α -globin chain ต่ำ

δ -globin chain มีน้อยกว่าต่อ β -globin chain ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณ Hb A₂ ต่ำกว่าปกติ⁽⁶⁾ และผลการศึกษาค้างนี้สามารถยืนยันความจริงข้อนี้ได้เนื่องจากพบว่าปริมาณ Hb A₂ โดยเฉลี่ยต่ำกว่า 2% นอกจากนี้ปริมาณ Hb H ในผู้ป่วย Hb H disease ที่ศึกษาค้างนี้มีความแตกต่างกันเป็นอย่างมาก บางรายมีปริมาณน้อยจนผู้อ่านผลอาจจะละเลยไป ในขณะที่บางรายมีระดับสูงอย่างชัดเจน ลักษณะเช่นนี้ปรากฏเช่นกันในการศึกษาค้างก่อนๆ⁽⁷⁾ ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากความแตกต่างของความผิดปกติระดับโมเลกุลของ Hb H disease ในแต่ละตัวอย่าง การศึกษาค้างก่อนๆ พบว่ารายที่เป็น Hb H disease ชนิด non-deletion ของ α -globin gene มักจะมีระดับ Hb H สูงกว่า Hb H disease ชนิดที่มี deletion ของ α -globin gene⁽⁶⁾

⁷⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้างนี้ยังไม่ได้วิเคราะห์ความผิดปกติระดับโมเลกุลของ Hb H disease ของตัวอย่างเลือดทั้ง 9 รายที่ศึกษาซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปว่ากลไกการเกิดโรคระดับโมเลกุลของผู้ป่วย Hb H disease ที่ศึกษานี้เป็นอย่างไร

ผลการศึกษาค้างนี้ช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานตระหนักถึงความแตกต่างอย่างมากของระดับ Hb H ที่จะตรวจพบได้ในการแยกชนิดและหาปริมาณฮีโมโกลบินโดยวิธี weak cation-exchange HPLC และแนะนำว่าผู้ปฏิบัติงานจะต้องทราบความแตกต่างของ hemoglobin chromatogram ของ Hb H disease เทียบกับ normal hemoglobin chromatogram เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบในกรณี que พบ fast eluted Hb peak การปฏิบัติเช่นนี้จะทำให้การแปลผล Hb identification ของ Hb H disease ไม่ผิดพลาด โดยเฉพาะกรณีที่อาศัยข้อมูลจาก HPLC เพียงอย่างเดียว

อนึ่งการศึกษาค้างนี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บไม่เกิน 6 ชั่วโมง และเก็บในตู้เย็นตลอดเวลาก่อนตรวจ

ดังนั้นปัญหาการสลายตัวของ Hb H ก่อนทำการตรวจไม่ควรจะมี และทุกรายได้ผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นว่ามี Hb H inclusion bodies หรือไม่ซึ่งผลพบว่าทุกรายมี Hb H inclusion bodies มากกว่า 50% ซึ่งเข้าได้กับ Hb H disease

References

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassemia Syndromes. Oxford: Blackwell Scientific; 1981.
2. วิชัย เหล่าสมบัติ. ธาลัสซีเมีย (Thalassemia). กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์; 2541.
3. ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี. วิธีตรวจรักษาและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงในเด็ก. เชียงใหม่: วัฒนชัย; 2537.
4. Tatu T, Jannoi S, Jamwuttipreecha K, Sa-nguansemsri T. Screening for alpha-thalassemia 1 using the Dried Brilliant Cresyl Blue method. Thai J Hematol Transf Med. 2003; 13(4):315-20.
5. Primus C. The Primus Variant System 99. The Kansas City; 1999.
6. Kutlar F, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Gurgey A, Altay C, Efremov GD, et al. The levels of zeta, gamma, and delta chains in patients with Hb H disease. Hum Genet. 1989 May;82(2):179-86.
7. Shyamala M, Kiefer CR, Moscoso H, Garver FA. A monoclonal antibody-linked immunoassay for hemoglobin H disease. Ann Hematol. 1992 Jul;65(1):37-40.