นิพนธ์ต้นฉบับ

อุบัติการณ์ Heterocellular HPFH ในประชากรไทย: การรายงานเบื้องต้น*

ธนูศักดิ์ ตาตุ[1], สุวรรณา โพธิ์หิรัญ[1], สวี เลย์ เทียน[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อตรวจหารูปแบบการกระจายตัวของระดับ F cells ในผู้ใหญ่คนไทยปกติและเพื่อค้นหาอุบัติการณ์ของ heterocellular HPFH ในคนไทย

วัสดุและวิธีการ ทำการศึกษาในผู้บริจาคโลหิตที่มาบริจาคโลหิต ณ งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่จำนวน 118 ราย และนักศึกษาสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 3 และ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่จำนวน 14 และ 25 รายตามลำดับ โดยทำการตรวจนับจำนวน F cells ด้วยวิธี immunofluorescence staining ตามด้วยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry

ผลการศึกษา ผลการศึกษาพบลักษณะการกระจายตัวของระดับ F cells มีลักษณะเบ้ขวาโดย 26.1% ของประชากรที่มีระดับ F cells มากกว่า 4.5% และอยู่มาทางด้านขวาของโค้งการกระจาย ซึ่งเข้าได้กับการมีภาวะ heterocellular HPFH

สรุป การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการแสดงอุบัติการณ์ของ heterocellular HPFH ในประเทศไทยซึ่งผลการศึกษาสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการศึกษาระดับโมเลกุลของภาวะนี้ในคนไทยต่อไป วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2545; 35: 164-169.

คำหัส : F cell, Heterocellular HPFH

---

* เป็นส่วนหนึ่งของภาคนิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) ปีการศึกษา 2545

[1] ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,

[2] Department of Clinical Haematology, GKT School of Medicine, King's College Hospital, The United Kingdom

Abstract: Incidence of Heterocellular HPFH among Thais: A Preliminary Report*

Tatu T[1], Phohirun S[1], Thein SL[2]

Objectives: The objectives of the present study were to determine the distribution of F cell levels as well as the incidence of heterocellular HPFH in Thais.

Materials and Methods: The study was conducted among 118 blood donors at Blood Bank unit, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital together with 14 and 25, respectively, of third and fourth-year MT students at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. All blood samples were analyzed for F cell levels by immunofluorescence staining technique followed by flow cytometric analysis of F cells.

Results: It was found that the F cell distribution in the studied subjects was positively skewed with 26.1% being heterocellular HPFH.

Conclusion: This is the first study to demonstrate the incidence of heterocellular HPFH in Thailand, which could pave the way to further molecular investigation of this condition in Thai population. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2002; 35: 164-169.**

Keywords : F cell, Heterocellular HPFH

---

* Part of Term Paper for B. S. (Medical Technology), 2002

[1] Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University,
[2] Department of Clinical Haematology, GKT School of Medicine, King's College Hospital, The United Kingdom.

บทนำ

ในคนมีการสร้างฮีโมโกลบิน (Hb) ชนิดต่างๆ ขึ้นในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต ได้แก่ Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$) เป็นฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้นเป็นชนิดแรกที่ yolk sac เมื่อตัวอ่อน (embryo) มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ เมื่อตัวอ่อนเจริญเติบโตมากขึ้นจะสร้างโกลบินเส้นซีต้า (ζ) และเส้นเอปซิลอน (ε) ลดลง แต่สร้างเส้นแอลฟา (α) และเส้นแกมมา (γ) เพิ่มขึ้นแทน จึงพบ Hb portland ($\zeta_2\gamma_2$) และ Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) เพิ่มขึ้น แต่เมื่อตัวอ่อนมีอายุประมาณ 10-12 สัปดาห์ จะตรวจไม่พบ embryonic hemoglobin ทั้งสามชนิดข้างต้น ชนิดของฮีโมโกลบินส่วนใหญ่ เป็น Hb F และมี Hb A เป็นส่วนน้อยคือประมาณ ร้อยละ 10 โดยที่ตับเป็นแหล่งในการสร้าง เม็ดเลือดแดงแทน อนึ่งการสร้างเส้นแอลฟาโกลบิน ค่อนข้างคงที่

ตลอดเวลาที่เป็นทารก (fetus) อยู่ในครรภ์จนกระทั่งคลอดออกมา (newborn infant) และเจริญเติบโตเป็นผู้ใหญ่ (adult) ส่วนการสร้างแกมมาโกลบินและเบต้าโกลบินจะค่อนข้างคงที่ไปจนถึงอายุประมาณ 34 สัปดาห์ หลังจากนั้นการสร้างแกมม่าโกลบินจะลดลง และจะสร้างเบต้าโกลบินเพิ่มขึ้นจึงทำให้ทารกในครรภ์มีปริมาณของ Hb F ลดลงและมี Hb A เพิ่มขึ้น ทารกที่คลอดครบกำหนดมีการสร้างเส้นเบต้าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและลดการสร้างเส้นแกมม่าลง ซึ่งจะทำให้ปริมาณของ Hb F ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 2 เดือนแรกทารกมี Hb F เหลือประมาณร้อยละ 25-60 ปริมาณของ Hb F จะค่อยๆ ลดลงและเมื่อทารกมีอายุ 4 เดือนจะมีปริมาณร้อยละ 5-20 หลังจากนั้นเมื่อทารกอายุ 1-2 ปี จะมีส่วนประกอบของฮีโมโกลบินเหมือนกับผู้ใหญ่ปกติ คือ พบ Hb A ร้อยละ 95-98, Hb A_2 ร้อยละ 2-3 และ Hb F น้อยกว่าร้อยละ 1 ทั้งนี้ Hb F ที่พบปริมาณน้อยกว่า 1% ในผู้ใหญ่ปกติจะพบในเม็ดเลือดแดงบางเม็ดเท่านั้น ซึ่งเรียกว่า F cells[1,2]

Hereditary Persistence of Fetal Hemolgobin (HPFH) เป็นภาวะที่ยังคงมีการสร้าง Hb F และ F cells ในผู้ใหญ่ ซึ่งตามปกติมีการสร้าง Hb F และ F cells เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผู้ที่เป็น HPFH ส่วนมากไม่แสดงอาการทางคลินิก แม้แต่ลักษณะทางโลหิตวิทยามักจะไม่เปลี่ยนแปลงชัดเจนเช่นกัน ดังนั้นการตรวจพบผู้ที่เป็น HPFH มักจะตรวจพบได้โดยบังเอิญ โดยทั่วไปมีการแบ่ง HPFH ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ pancellular HPFH และ heterocellular HPFH [3,4] pancellular HPFH มีลักษณะเด่นคือ เมื่อตรวจหา F cells โดยการย้อม blood smear ด้วย acid elution technique พบเม็ดเลือดแดงทุกเม็ดเป็น F cells (100% F cells) แต่ใน heterocellular HPFH พบเม็ดเลือดแดงบางเม็ดเท่านั้นที่เป็น F cells (F cell < 100%) การศึกษาระดับโมเลกุลสามารถระบุถึงความผิดปกติระดับโมเลกุลของ pancellular HPFH อย่างชัดเจนซึ่งส่วนใหญ่เกิดจาก deletion ของ β-globin gene cluster บางส่วนซึ่งทำให้ δ และ β-globin genes ขาดหายไปและบางส่วนเกิดจาก point mutations บน γ-globin genes promoter regions แต่การศึกษาผู้ที่เป็น heterocellular HPFH ยังไม่สามารถระบุกลไกระดับโมเลกุลได้อย่างชัดเจนเนื่องจากยังพบว่า δ และ β-globin genes ยังคงมีอยู่และตรวจไม่พบความผิดปกติบน promoter regions ของ γ-globin genes [4] จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานการพบ heterocellular HPFH ได้ประมาณ 15-30% ในคนปกติทั่วไป [5-7] และพบว่าบางครั้งการที่ผู้ป่วย β-hemoglobinopathies มี heterocellular HPFH อยู่ด้วยสามารถบรรเทาความรุนแรงของอาการทางคลินิกได้ [8,9] ทั้งนี้เนื่องจากแกมมาโกลบินที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมากใน heterocellular HPFH ทำให้ความสมดุลของการสร้างเส้นโกลบินชนิด α และ non-α มากขึ้นกว่าผู้ป่วย β-thalassemia ทั่วไปซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มักมีอาการทางคลินิกที่รุนแรงมากอันเป็นผลมาจากความไม่สมดุล ของการสร้างเส้นโกลบินดังกล่าวซึ่งเกิดจากเส้นโกลบินชนิดเบต้าถูกสร้างน้อยลงหรือไม่สร้างเลย แม้การศึกษาระดับโมเลกุลที่ผ่านมาไม่พบความผิดปกติที่ชัดเจนบน β-globin cluster แต่พบว่ามียีนบางชนิดที่อยู่บน chromosomes X, 6, 8, 11 ที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ HPFH ชนิดนี้ [6,10-12]

การศึกษาเกี่ยวกับ heterocellular HPFH อย่างชัดเจนทั้งอุบัติการณ์และกลไกระดับโมเลกุลที่ทำให้เกิดสภาวะนี้ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงทำเพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของ heterocellular HPFH อันจะเป็น

แนวทางของการศึกษากลไกระดับโมเลกุลต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มประชากร 153 ราย แบ่งเป็นผู้บริจาคโลหิต ที่งานธนาคารเลือด ณ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จำนวน 114 ราย นักศึกษาสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 14 ราย นักศึกษาสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 3 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 25 ราย โดยทำการเจาะเก็บเลือดจำนวน 3 ml และใช้ ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็ง

การตรวจนับและวิเคราะห์ระดับ F cells

การตรวจนับปริมาณ F cells ในตัวอย่างตรวจอาศัยวิธี immunofluorescence staining[7,13] โดยใช้ FITC-conjugated mAb to human γ-globin chains (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Swee Lay Thein, Department of Molecular Haematology, King's College Hospital, London, UK) วิเคราะห์ด้วย flow cytometric analysis โดยใช้เครื่อง FACsort™ และวิเคราะห์ F cells โดยใช้ CellQuest™ program

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS 9.0 for Windows เพื่อคำนวณ descriptive statistics (mean, standard deviation), และแสดงผลการกระจายของระดับ F cells ในรูป histogram

ผลการศึกษา

ระดับ F cells ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ศึกษาในกลุ่มประชากรจำนวนทั้งหมด 153 ราย แบ่งเป็นเพศชาย 108 ราย เพศหญิง 45 ราย อายุเฉลี่ยทั้งหมดเท่ากับ 27.9 ปี (17-52 ปี) เพศชายเท่ากับ 27.4 ปี (17-50 ปี) และเพศหญิงเท่ากับ 28.9 ปี (17-52 ปี) จากการตรวจวิเคราะห์ระดับ F cells ในประชากรทั้งหมดพบระดับ F cells เท่ากับ 4.3±4.7% ($\bar{X}$±SD) แยกเป็นเพศชาย เท่ากับ 3.8±3.8% และในเพศหญิง เท่ากับ 5.6±6.1%

การกระจายตัวของระดับ F cells ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาทั้งหมด

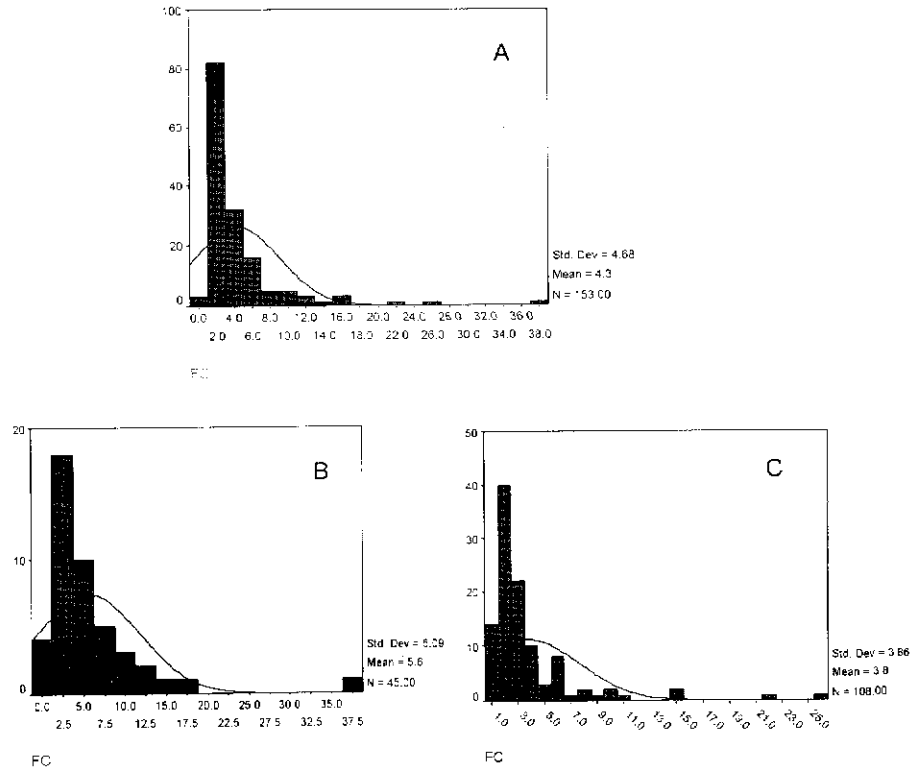
เพื่อตรวจหารูปแบบการกระจายตัวของระดับ F cells ในกลุ่มประชากรนี้ ได้นำค่า F cells จากประชากรทั้งหมดมา plot histogram โดยใช้โปรแกรม SPSS 9.0 for Windows พบว่าลักษณะการกระจายของค่า F cell ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา เป็นแบบเบ้ขวา (right skew) ทั้งในเพศหญิง, เพศชายและในกลุ่มประชากรทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 1

อุบัติการณ์ของ heterocellular HPFH ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา

การศึกษาอุบัติการณ์ของ heterocellular HPFHในกลุ่มประชากรทั้งหมดโดยกำหนดระดับ F cell ที่สูงกว่า 4.5% ถือว่าเป็น heterocellular HPFH[6] พบกลุ่มที่มีระดับ F cells น้อยกว่า หรือเท่ากับ 4.5% จำนวน 113 รายคิดเป็น 73.9% และกลุ่มที่มีระดับ F cells มากกว่า 4.5% ซึ่งเป็น heterocellular HPFH จำนวน 40 ราย คิดเป็น 26.1%

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหารูปแบบการกระจายตัวของระดับ F cells ในผู้ใหญ่คนไทยปกติเพื่อตรวจสอบหาอุบัติการณ์ของ heterocellular HPFH แต่เนื่องจากระดับ Hb F



รูปที่ 1 Histogram แสดงการกระจายตัวของระดับ F cells ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาทั้งหมด (A), เพศหญิง (B) และเพศชาย (C)

ในผู้ใหญ่ปกติมีค่าค่อนข้างต่ำซึ่งทำให้ระดับ F cells ต่ำด้วย ดังนั้นจึงทำการตรวจนับจำนวน F cells โดยใช้วิธีที่มีความไวสูงคือ immunofluorescence staining ทำให้ระดับ F cells ที่ตรวจนับได้มีความน่าเชื่อถือ ซึ่งพบว่าลักษณะการกระจายตัวของระดับ F cells มีลักษณะเบ้ขวาโดย 26.1% ของประชากรที่ศึกษามีลักษณะเป็น heterocellular HPFH ซึ่งเหมือนอุบัติการณ์ heterocellular HPFH ในกลุ่มประชากรกลุ่มอื่น ที่เคยมีผู้ศึกษามาแล้ว[7,13] อีกทั้งยังพบว่าในกลุ่มประชากรเพศหญิงจะมีระดับของ F cells มากกว่าเพศชาย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ในเพศหญิงและยีนบางชนิดที่อยู่บน chromosome X[6] ซึ่งเพศหญิงมีมากกว่าเพศชาย การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มคนไทยที่มีสุขภาพปกติ ยังมีส่วนหนึ่งของประชากรที่ยังคงมีความสามารถในการสังเคราะห์ Hb F และ F cells ในปริมาณที่มากอยู่ในช่าย heterocellular HPFH ซึ่งผลครั้งนี้สามารถนำไปสู่การศึกษาระดับโมเลกุลที่ควบคุมการสังเคราะห์ Hb F และ F cells ใน heterocellular HPFH ในคนไทยต่อไป ผลระยะยาวคือทำให้ทราบกลไกระดับโมเลกุล ที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงชนิดฮีโมโกลบิน (Hb switching) และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้การอธิบายความหลากหลายในการตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วยโรค β-thalassemia ด้วยยาที่กระตุ้นการสังเคราะห์ Hb F ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือรวมคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเจ้าหน้าที่ผู้ดูแลเครื่องมือที่กรุณาอำนวยความสะดวก

ในการวิเคราะห์ระดับ F cells ด้วยเครื่อง FACsort™ และขอขอบคุณ อาจารย์ นวลชื่น คำทอน และเจ้าหน้าที่หน่วยธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการจัดเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิต ส่วนหนึ่งของงานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนสนับสนุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ประจำปี พ.ศ. 2545

เอกสารอ้างอิง

1. ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี. วิธีตรวจรักษาและการป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรงในเด็ก. เชียงใหม่: วัฒนชัย; 2537.
2. จินตนา ศิรินาวิน, วันชัย วนะชิวะนาวิน, วรวรรณ ตันไพจิตร, ชนินทร์ ลิ่มวงศ์. ธาลัสซีเมีย สำหรับเวชปฏิบัติ. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน; 2544.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes. Oxford: Blackwell Scientific; 1981.
4. Rochette J, Craig JE, Thein SL. Fetal hemoglobin levels in adults. Blood Reviews 1994; 8: 213-24.
5. Ruthland PC, Pembrey ME, Davies T. The estimation of fetal hemoglobin in healthy adults by radioimmunoassay. Br J Haematol 1983; 53: 673-82.
6. Miyoshi K, Kaneto Y, Kawai H, Ohchi H, Niki S, Hasegawa K, 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: 1854-60.
7. Thein SL, Craig JE. Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. Hemoglobin 1998; 22: 401-14.
8. Rucknagel DL, Sarniak SA, Whitten CF, Odenheimer DA. Fetal hemoglobin concentration predicts disease severity in children with sickle cell anemia. Prog Clin Biol Res 1987; 251: 487-96.
9. Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta-thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? Br J Haematol 1998; 100: 70-8.
10. Craig JE, Rochette J, Fisher CA, Weatherall DJ, Marc S, Lathrop GM, et al. Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. Nat Genet 1996; 12: 58-64.
11. Garner C, Tatu T, Game L, Kelly P, Spector TD, Farrall M, et al. A candidate gene study of F cell levels in an unselected sample of sibling pairs with joint linkage and association analysis. GeneScreen 1999; 1: 9-14.
12. Garner CP, Tatu T, Best S, Creary L, Thein SL. Evidence of Genetic Interaction between the β-Globin Complex and Chromosome 8q in the Expression of Fetal Hemoglobin. Am J Hum Genet 2002; 70: 793-9.
13. Thorpe SJ, Thein SL, Sampietro M, Craig JE, Mahon B, Huehns ER. Immunochemical estimation of haemoglobin types in red blood cells by FACS analysis. Br J Haematol 1994; 87: 125-32.