

การตรวจหา UNSTABLE HEMOGLOBIN ใน THALASSEMIAS

สุดารัตน์ โรจนกิจ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

สุรพร มาตระกูล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี)*

ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี พบ.**

บทคัดย่อ

ผู้รายงานได้นำวิธีการตรวจวัด unstable hemoglobin ที่นิยมใช้ทั่วไป 2 วิธีมาศึกษา กับคนไข้ thalassemias ชนิดต่าง ๆ พบว่าเปอร์เซ็นต์ของ unstable Hb ที่ได้จากวิธี Heat instability test และ Isopropanol precipitation test มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณ Hb H ที่วัดได้หลัง แยก Hb ด้วย electrophoresis แล้วโดยปริมาณ Hb H มีค่าต่าง ๆ ตั้งแต่ 5-17% ส่วนการตรวจ วัด unstable Hb ในคนไข้ thalassemias ชนิดอื่น ๆ 29 รายและใน heterozygous Hb E อีก 6 ราย พบว่ามีค่าสูงกว่าคนปกติเล็กน้อยโดยจะเห็นได้ชัดเจนกว่าเมื่อวัดโดยวิธี Isopropanol precipitation ยกเว้นคนไข้ B-thalassemia trait บางรายให้ค่าที่ไม่แตกต่างไปจากคนปกติ

Isopropanol ยังตกตะกอน unstable Hb (Hb H) ได้มากกว่าวิธีของความร้อน โดยจะ เห็นจากการหายไปของ Hb H ใน electrophoresis

บทนำ

Dacie และ Grimes เป็นเจ้าตำหรับของ Heat instability test ซึ่งเริ่มใช้กันมาตั้งแต่ปี 1964 (1,2) ในการตรวจหา unstable Hb variant อันเป็นสาเหตุหนึ่งของ hemolytic anemia หลังจากศึกษาเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเกี่ยวกับ buffer system ก็ทำให้ ได้วิธี การ ทด ทด อันหนึ่ง ในการ ตรวจวัด

unstable Hb ทั้งแบบ qualitative และ quantitative (3) และใช้กันแพร่หลายตลอดมา

ส่วนการใช้ Isopropanol ในการตกตะกอน unstable Hb นั้นเสนอโดย Carrell และ Kay เมื่อปี 1972 (4) และเนื่องจากเป็นวิธีการ ที่สะดวกรวดเร็วกว่ามากในระยะหลังจึงมีการใช้ วิธีนี้กันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งตะกอนของ

* ภาควิชาคลินิกโมเลกุลโรคโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

รับพิมพ์ 22 พฤษภาคม 2522

denatured hemoglobin ที่เกิดจาก isopropanol เป็นแบบ reversible precipitate จึงเหมาะสมที่จะใช้วิธีนี้หากต้องการวิเคราะห์ โมเลกุลของ unstable Hb ในชั้นต่อไป

ในการทดลองครั้งนี้ผู้เขียนต้องการที่จะเปรียบเทียบ ความสามารถในการ ตกตะกอน unstable Hb โดยวิธีทั้งสองโดยใช้ Hb H เป็น model สำหรับ unstable Hb และได้ทำการตรวจวัด unstable Hb ในคนไข้ thalassemias ชนิดต่าง ๆ ด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. Blood specimens เจาะเลือด venous blood ประมาณ 5 ml. กันแข็งด้วย EDTA เลือกคนปกติ 30 รายที่ใช้เป็น control ได้จาก blood donor ซึ่งให้ผลลบกับ Fetal cell staining และ inclusion bodies ส่วนคนไข้ thalassemias นั้นได้จากผู้ป่วยที่มาตรวจที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ รวมทั้งบิดามารดาของผู้ป่วยซึ่งถือว่าเป็น heterozygous state

เตรียม Hemoglobin solution โดยล้างเม็ดเลือด 3 ครั้งด้วย 0.9 % NaCl ทำให้เม็ดเลือดแตกด้วยปริมาณเท่าตัวของน้ำแล้ว extract เอล non-hemeprotein ออกด้วย CCl_4

2. Preliminary Classification of Thalassemias จัดแบ่งชนิดต่างๆของ thalassemias ด้วยผลการตรวจของ Fetal cell staining (5) ดู inclusion bodies (6), Cellulose acetate

electrophoresis ที่ alkaline pH (7), และหา ระดับของ HbA₂ (8)

3. Heat Instability Test (3)

เจือจาง hemolysate ให้ได้ความเข้มข้นขนาด 2 gm % ด้วย 0.15 M Tris-HCl buffer pH 7.4 Incubate 2 ml ของ solution นี้ใน waterbath 50°C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเอาตะกอนที่อาจเกิดบ้างออก ส่วน supernate นำไป incubate ต่ออีก 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิเดิม เมื่อถึงเวลาทำให้เย็นทันที โดยแช่ลงในน้ำแข็ง แล้วปั่นเอาตะกอนออก เจือจาง supernate ด้วยน้ำกลั่นขนาด 1:50 แล้ววัด O.D. ที่ 415 nm. เปรียบเทียบกับ Hb solution ที่ incubate 10 นาที ซึ่งเจือจางขนาดเดียวกัน กำหนดหาปริมาณของ hemoglobin ซึ่งตกตะกอนหายไป

4. Isopropanol Precipitation Test (4)

ใส่ Isopropanol buffer (เตรียมโดยผสม isopropanol 17 ml. กับ 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 จำนวน 83 ml , บิดฝาแน่นและเก็บในตู้เย็น) ปริมาตร 2 ml. ใน tube ขนาด 11x90 mm. นำไปอุ่นใน water bath 37°C 5 นาที จากนั้นใส่ hemolysate ที่มี ความเข้มข้น 7-10 gm % ลงไป 0.2 ml. mix และ incubate ต่ออีก 20 นาที รับประทานเอาตะกอนออกแล้ว dilute ทันที 1:50 ด้วยน้ำกลั่น เพื่อวัด O.D. ที่ 415 nm. เปรียบเทียบกับ O.D. ของ Hb + isopropanol ก่อน incubate ซึ่ง dilute ไว้ก่อนแล้ว วัดในเวลาเดียวกันเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ที่ตกตะกอนไปของ Hb ได้

ผลการทดลอง

1. Unstable hemoglobin ในคนไข้
Hb H disease ได้ตรวจคนไข้ 10 รายซึ่งเป็น
alpha-thal Hb H disease มี electrophoresis
เป็น AH หรือ AH Barts ดังแสดงผลตามตาราง

ที่ 1 เปอร์เซนต์ของ Hb H วัดโดย scan แผ่น
cellulose acetate electrophoresis ด้วย
spectrophotometer (Eppendorf Genatabau)
ใช้ Hg 546 filter และ W + W Electro-
recorder

No.	Hb typing	% rbc with inclusion bodies	F-cell	% Hb H (+ Bart's)	% Unstable Hb	
					HIT	IPT
1	AH	63	trace	8.2	8.6	9.8
2	AH	81	1 +	11.9	9.5	14.4
3	AH	65	2 +	11.1	7.2	12.5
4	AH	15	trace	5.2	6.8	3.3
5	AH	86	trace	16.7	9.6	12.1
6	AH	78	trace +	16.4	7.1	13.9
7	AH	85	1 +	11.9	10.4	16.3
8	AH	91	— *	15.0	12.6	19.3
9	AH Bart's	85	trace	11.9	13.5	14.7
10	AH Bart's	69	— *	11.9	11.9	10.4

ตารางที่ 1 แสดงผลของ % unstable Hb
เปรียบเทียบกับปริมาณ Hb H รวมทั้งการตรวจ
พบอย่างอื่นในคนไข้ alpha-thal Hb H disease

* Not done

จะเห็นว่าคนไข้ในโรคนี้นี้ variation
ของปริมาณ Hb H ตั้งแต่ 5-17 % ความมาก-
น้อยของ Hb H สัมพันธ์กับปริมาณเม็ดเลือดที่
พบ inclusion bodies สำหรับ Hb ที่หายไป
ภายหลัง denaturation ทั้งโดยวิธีของความร้อน
และถูกกับ isopropanol ส่วนใหญ่จะใกล้เคียง

กับปริมาณ Hb H ที่มีอยู่จริง ยกเว้น HIT ใน
รายที่ 3, 5 และ 6 วิธีของ isopropanol precipi-
tation จะตกตะกอน unstable Hb ได้มาก
กว่าความร้อน เมื่อได้นำเอา supernate ภาย-
หลัง incubation ของคนไข้พวกนี้ไปตรวจสอบ
อีกทีโดย electrophoresis ปรากฏว่า โดยวิธี
isopropanol นั้น band ของ Hb H หายไป
หมด แต่โดยวิธี heat instability test ยังมี
Hb H เหลืออยู่ให้เห็นได้บ้าง (ภาพที่ 1)

เลือกจากคนปกติ 32 คน ภายหลังที่ treat

ด้วยวิธีทั้งสองพบว่า Hb บางส่วนหายไปเช่นกัน ค่าความ unstable Hb ได้ 2.32 ± 1.21 สำหรับ HIT และ 0.99 ± 0.63 สำหรับ IPT

2. Unstable Hb ในคนไข้ thalassemias ชนิดอื่น ๆ คนไข้ thalassemias อื่นๆที่ไม่มี unstable Hb H หรือ Bart's จำนวน 30 คน ได้จัดกลุ่มดังนี้

a. Beta-thal homozygote : มี 3 ถึง 4 Fetal cell, inclusion bodies negative, electrophoresis เป็น AF หรือ F, ระดับของ Hb A₂ ปกติ, blood cell morphology มี anisocytosis และ poikilocytosis ตลอดจนมีอาการทางคลินิกของ thalassemia major

b. Beta-thal Hb E disease: พวกนี้มี Hb F สูง, electrophoresis เป็น EF หรือ EAF, Fetal cells มีมาก ร่วมกับอาการทางคลินิกของ thalassemia

c. Hb E heterozygote : Electrophoresis เป็น AE ไม่มีลักษณะของ thalassemia การตรวจ

อย่างอื่นปกติ อาจมี target cell ได้บ้างใน blood smear มักเป็นบิดาหรือมารดาของคนไข้ในกลุ่ม b

d. Beta thal trait : Electrophoresis ปกติ แต่มีระดับของ Hb A₂ สูง (ประมาณ 4-7%) ส่วนใหญ่เป็นบิดามารดาของคนไข้ในกลุ่ม a

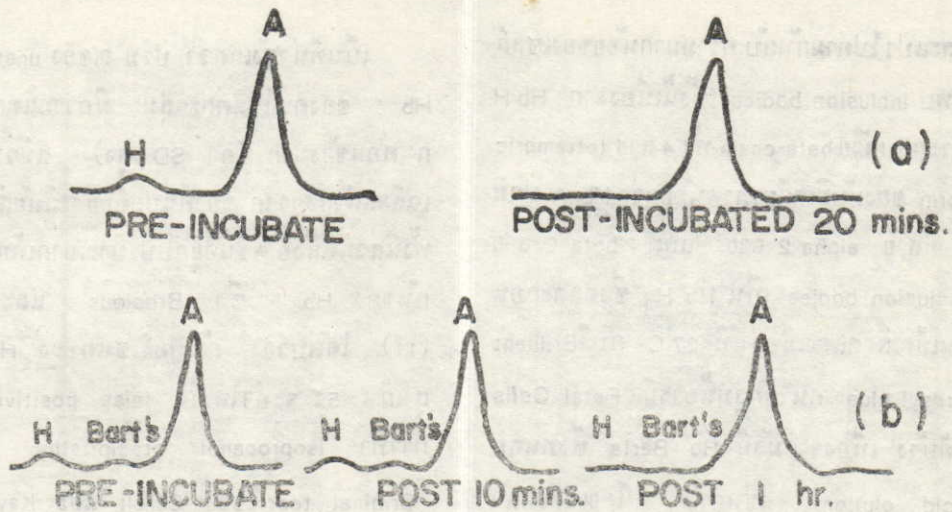
e. Alpha-thal trait : กลุ่มนี้แทบจะตรวจไม่พบความผิดปกติของเลือด หรือฮีโมโกลบินเลย เป็นบิดามารดาของคนไข้ alpha-thal Hb H disease หรือเด็ก Hydrops fetalis ไม่มี Hb H แต่อาจพบ inclusion bodies ในเม็ดเลือดแดงบางตัวได้

ได้ทดสอบหาปริมาณของ Hb ที่ถูกตกตะกอนได้ด้วย HIT และ IPT ในคนไข้กลุ่มต่างๆ ดังกล่าว ดังผลแสดงในตารางที่ 2 จะเห็นว่า คนไข้ thalassemias เหล่านี้มีปริมาณของ Hb ที่ถูก denature โดยวิธีการทั้งสองดังกล่าวมากกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ

Syndrome	HIP Mean $\pm$ SD	P	IPT Mean $\pm$ SD	P
Normal (32)	2.3 ± 1.2	—	0.99 ± 0.36	—
Beta-Thal Homozygote (8)	5.4 ± 1.6	$< .001$	8.4 ± 3.6	$< .001$
Beta-Thal HbE (6)	6.4 ± 2.2	$< .001$	9.0 ± 5.3	$< .001$
HbE Heterozygote (6)	2.6 ± 1.5	$< .05$	2.4 ± 1.3	$< .001$
Beta-Thal trait (10)	4.3 ± 2.3	$< .01$	2.7 ± 2.3	$< .001$
Alpha-Thal trait (5)	4.4 ± 1.6	$< .001$	5.1 ± 2.7	$< .001$

ตารางที่ 2 ปริมาณของฮีโมโกลบินที่ตกตะกอนได้ด้วย Heat instability test (HIT) และ isopropanol precipitation test (IPT)

ในคนไข้ thalassemias ชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับคนปกติตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนรายที่ทำ



ภาพที่ 1 แสดง Scanning pattern ของ Hb electrophoresis ก่อนและหลังกระบวนการ Denaturation โดย (a) Isopropanol Precipitation Test (b) Heat Instability Test

วิจารณ์

วิธีของการตรวจสอบ Stability ของฮีโมโกลบิน ได้ทำการทดลองพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ Isopropanol precipitation test มีค่าอยู่ระหว่าง 7-10 gm % ส่วน heat instability test ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2 gm % โดยที่ค่าความเข้มข้นของ hemolysate ที่อยู่ในช่วงนี้ตกตะกอน Hb ของคนปกติได้น้อยที่สุด ผลอันนี้คล้ายคลึงกับที่ Carrell กับ Kay (4) ได้ศึกษาไว้เมื่อเสนอวิธีการของเขาจะใช้ได้ก็ในช่วงความเข้มข้น 7-13 gm %

ในวิธีการของ HIT การที่ incubate 10 นาทีก่อน แล้วนำเอาตะกอนออกนั้น ยังไม่เป็นการตกตะกอนของ Hb แต่เป็น protein

ชนิดอื่นเพียงจำนวนเล็กน้อย และลักษณะเป็นสีขาว แต่ตะกอนที่ตกหลัง incubate 1 ชั่วโมงนั้นเป็น hemoglobin (9) Heat และ isopropanol มีกลไกในการตกตะกอนฮีโมโกลบินต่างกัน ความร้อนเป็น physical stress ซึ่งทำลาย conformation ของ protein โดยตรง และมักเป็น irreversible denaturation ส่วน isopropanol ซึ่งเป็น polycationic compound จะลดเสถียรภาพของ protein โดยทำลาย ionic bonds หรือ salt bridges ซึ่งจำเป็นในการรักษา tertiary และ quaternary conformation ของฮีโมโกลบินโมเลกุล

ปริมาณของ Hb H ในคนไข้ทั้ง 10 คน ที่เป็น alpha-thalassemia มีมากน้อยต่างกัน

และแปรไปตามกันกับ ความมากน้อยของเซลล์ที่พบ inclusion bodies ทั้งนี้เนื่องจาก Hb H ประกอบด้วย beta-chain ทั้ง 4 สาย tetrameric form ของมันมีเสถียรภาพน้อยกว่า Hb A ปกติ ซึ่งมีสาย alpha 2 สาย และ beta 2 สาย Inclusion bodies เป็น Hb H ซึ่งตกตะกอนในเม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่ที่ 37°C กับ Brilliant cresyl blue คนไข้กลุ่มนี้อาจมี Fetal Cells ได้บ้าง เนื่องจากมักมี Hb Barts ซึ่งทนต่อ acid elution เช่นกัน โดยเฉลี่ยแล้ว isopropanol จะตกตะกอน unstable Hb ได้มากกว่า โดยวิธีความร้อน ทั้งยังมีหลักฐานจากการหายไปของ Hb H หลัง treat ด้วย isopropanol แต่ด้วยความร้อนนั้น Hb H หายไปไม่หมด นอกจากนั้นความร้อนยังทำลาย Hb ปกติได้มากกว่าที่ isopropanol ทำอีกด้วย (ตารางที่ 2)

Thalassemia ซึ่งมีการไม่สมดุลกันของการสร้าง globin chains ทำให้โกลบินที่เหลืออยู่ในลักษณะที่เป็น free chain เช่น alpha-chain ใน beta-thal หรือจับกันเองเป็น unstable tetramer เช่น β_4 (HbH) ใน alpha-thal เหล่านี้ซึ่งมีเสถียรภาพน้อยกว่าปกติ ดังนั้น จะเห็นได้ว่าใน thalassemias ทุก form จะตรวจพบว่ามี unstable สูงกว่าในคนปกติ มากน้อยเรียงตามลำดับความรุนแรงของชนิด thalassemia ด้วย สำหรับ Hb E ก็เคยมีการพิสูจน์แล้วว่าเสถียรภาพน้อยกว่าปกติ (10)

เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณของ unstable Hb ของคนไข้แต่ละกลุ่ม มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก (ค่า SD สูง) แม้ว่าโดยเฉลี่ยแล้วสูงกว่าค่าของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ส่วนหนึ่งอาจขึ้นอยู่กับปริมาณมากน้อยต่างกันของ Hb F ซึ่ง Brosious และคณะ (11) ได้พบว่า ถ้าเปอร์เซ็นต์ของ Hb F สูงเกิน 5% จะทำให้เกิด false positive ในการทำ isopropanol precipitation test (Original test ของ Carell และ Kay นั้น โดยเฉพาะการช้อนและไม่ช้อนเท่านั้น) อีกประการหนึ่งในแต่ละบุคคล อาจมีความมากน้อยของ excess chain ไม่เท่ากัน แม้ว่าจะอยู่ในกลุ่มโรคเดียวกัน

เนื่องจากว่า ฮีโมโกลบินบางชนิดมีเสถียรภาพน้อยกว่าปกติ ดังนั้น ในการตรวจเกี่ยวกับ hemoglobinopathies และ thalassemias จึงควรจะทำให้เร็วที่สุด เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจาก Hb บางส่วนตกตะกอนไป นอกจากความร้อนแล้ว ความเย็นก็ทำให้ unstable Hb ตกตะกอนได้เช่นกัน ผู้เขียนได้ลองเก็บ hemolysate ของคนที่ มี Hb H ไว้ในตู้เย็น พบว่ามีตะกอนเกิดขึ้นที่ก้น tube และปริมาณ Hb H ลดลง โดยเฉพาะเมื่อเก็บ freeze ที่ 0°C จะมีตะกอนของ unstable Hb เห็นชัดมาก ในการตรวจถ้าไม่สามารถทำ electrophoresis ได้ทันที ควรจะเก็บไว้ในรูปเม็ดเลือดในที่เย็นจะดีกว่า

เอกสารอ้างอิง

1. Grimes, A.J., Meisler, A. and Dacie, J.V. (1964). Hereditary Heinz-Body Anemia Brit. J. Haemat. 10: 388
2. Grimes, A.J., Meisler, A., and Dacie, J.V. (1964). Congenital Heinz-Body Anemia: Further evidence of the cause of Heinz-Body Production in Red Cell. Brit. J. Haemat. 10: 381
3. Dacie, J.V., and Lewis, S.M. (1975). Practical Haematology 5th ed. Churchill Livingstone P. 150
4. Carrell, R.W., and Kay, R. (1972). A Simple Method for the Detection of Unstable Haemoglobins. Brit J. Haemat. 23:615.
5. Sanguanserm, T., Kohne, E., Kleihauer, E., and Betke, K. (1974). Amido-Schwarz - elutions method, in zum cytologischen nachweis von fetalem hemoglobin mit amidoschwarz. Schmidl H. Univ. Munchen. p.6.
6. Lehmann, H., and Huntsman, R.G. (1974) Man's Haemoglobins North Holland Publishing Company. Amsterdam, Oxford. p 391
7. Wehinger, H., and Alebonyed, M. (1970) Densitometrisch quantitative bestimmung von hemoglobin A2 nach mikrozonenelektrophorese auf cellulose-acetate folie-klin. Wschr. 48: 70
8. Teowsiri, P., Chaonua, P., Matragoon S., et al (1977) Simple determination of Hb A2 for detection of beta thalassemia heterozygote Bull. Chiang Mai Ass. Med. Sci. 10: 17
9. Winterbourn, C.C., and Carrell, R.W. (1974) Studies of hemoglobin denaturation and Heinz body formation in the unstable hemoglobins. J. Clin. Invest. 54: 678
10. Yuthavong, Y., Ruenwongsa, P., Benyajati, C., et al (1975) Studies on the structure stability of hemoglobin E. J. Med. Assoc. Thai 58: 351
11. Brosious, E.M., Morrison, B.Y., Schmidt, R.M., (1976) Effect of hemoglobin F levels, KCN, and Storage on the Isopropanol precipitation test for unstable hemoglobins. Am. J. Clin. Path. 66: 878

ABSTRACT

**Determination of Unstable Hemoglobin in
Thalassemias**

Sudarot	Rojanakij	B.Sc. (Med. Tech)
Suraporn	Matragoon	B.Sc. (Med. Tech), M.Sc (Bio-chemistry)*
Torpong	Sanguansermisri	M.D.**

There are two methods generally used in the detection of unstable hemoglobin in solution; Heat Instability Test and Isopropanol Precipitation Test. The both methods are compared in the denaturation of unstable hemoglobin in alpha thalassemia, in those the amount of hemoglobin H are determined spectrophotometrically after electrophoretic separation. Ten cases of thalassemia Hb H possess varying amount of 5-17% Hb reveal a relative

same degree of denatured hemoglobin by both methods.

Another 29 cases of various types of thalassemias as well as six cases of Hb E heterozygote show relative higher extent of denatured hemoglobin than normal. This is more significantly with isopropanol test, the easier and quicker method. It even precipitate down the unstable hemoglobin more completely than the heat does.

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

**Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

Received : 22 May 1979.