



บทฟื้นฟูวิชาการ ; ความก้าวหน้าในการศึกษาวิจัยพันธุกรรม ของฮีโมโกลบิน

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

ในอดีตที่ผ่านมา ฮีโมโกลบินได้ถูกใช้เป็นตัวอย่างสำคัญในการศึกษาโปรตีนในแง่ของโครงสร้าง
คุณสมบัติ หน้าที่ ตลอดจนกลไกในการสังเคราะห์ ต่อมา ฮีโมโกลบินก็ยังมิพบทางอีกไม่น้อยสำหรับการ
ศึกษาถึงกลไกการทำงานของยีนส์ ปัจจุบันเราได้ความรู้เพิ่มขึ้นมากมายเกี่ยวกับพันธุกรรมของฮีโมโกลบิน
ทั้งในสภาวะปกติและผิดปกติ ทำให้เข้าใจถึงหน่วยงานของยีนส์ซึ่งเป็นศูนย์ควบคุมทุกสิ่งทุกอย่างของชีวิต
ดีขึ้นอีกมาก ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากผลของการคิดค้นเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมา อาทิ DNA-cDNA hybridiza-
tion และ gene mapping ซึ่งนับเป็นผลพลอยได้จากงานค้นพบที่สำคัญชิ้นรางวัลโนเบลสองอัน คือ
Viral reverse transcriptase และ DNA restriction enzymes. โดยเทคนิคต่างๆดังกล่าว
รวมตลอดจนการประยุกต์เอาวิธีการบางอย่างเข้าร่วมด้วย ทำให้สามารถพิสูจน์ความบกพร่องพื้นฐานและ
สาเหตุที่แท้จริงของโรคกรรมพันธุ์ของฮีโมโกลบินได้หลายอย่างทีเดียว ประโยชน์ที่ตามติดมาก็คือสามารถ
ทำ prenatal diagnosis ของโรคความผิดปกติเหล่านี้ได้ เพียงแต่นำเอา amniotic fluid มา
เพาะเลี้ยง แล้ววิเคราะห์ยีนส์ของ cultured cells เหล่านั้นโดยตรง ยิ่งกว่านั้น ในขณะนี้เขากำลัง
แยกเอา pure globin gene ออกมาใส่เป็น plasmid ให้กับโรงงานของแบคทีเรีย เพื่อตั้งความ-
หวังต่อไปถึงการรักษาโรคทางพันธุกรรม โดย genetic therapy ในอนาคต

* ภาควิชาคลินิกไมโครสโคปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

ภายในรอบสองปีที่ผ่านมา นับได้ว่างานวิจัยในเรื่องพันธุกรรมขั้นมูลฐานของโรคที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีโมโกลบินได้เจริญรุดหน้าไปอย่างรวดเร็วมาก แทบจะกล่าวได้ว่าอยู่ในขั้นแนวหน้าทีเดียว ในแง่การศึกษาธรรมชาติของพันธุกรรม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าโรคที่เกิดจากความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินมีอุบัติการณ์สูง และเป็นปัญหาใหญ่อันหนึ่งของสาธารณสุขชนซึ่งไม่มีชีวิตรักษาให้หายได้ และนี่น่าจะเป็นเหตุจูงใจอันสำคัญที่นักวิจัยทั้งฝ่ายแพทย์ทางโลหิตวิทยา และทางฝ่ายนักชีวเคมี ได้พยายามศึกษาค้นคว้ากันมาก ถึงธาตุแท้ของความผิดปกติในระดับยีนส์ สาเหตุวิธีการ เพื่อที่จะเป็นทางป้องกันหรือแก้ไขโรคอันเป็นปัญหานี้ให้ได้ โรคที่สำคัญเกี่ยวกับความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินมีทั้งแบบที่เกิดจาก qualitative abnormality ได้แก่พวกที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหลาย เช่น Sick cell disease, unstable hemoglobins และ methemoglobins และแบบที่เกิดจาก quantitative abnormality ได้แก่โรค Thalassemia ชนิดต่างๆ

พันธุกรรมของฮีโมโกลบิน

เช่นเดียวกับเอนไซม์หรือโปรตีนชนิดอื่นๆ

ฮีโมโกลบินหรือส่วนของโปรตีนที่เรียกว่าโกลบินนั้น ถูกควบคุมการสร้างโดยยีนส์เฉพาะของมันแต่เนื่องจากฮีโมโกลบินของคนมีหลายชนิด (heterogeneity) ยีนส์ซึ่งควบคุมการสร้างแต่ละชนิดของโกลบินจึงมีอยู่แยกจากกัน ฮีโมโกลบินในผู้ใหญ่มีน้อยกว่า ๔๔% จะเป็น Hb A ซึ่งประกอบด้วยสายโกลบินชนิด α สองสาย และชนิด β สองสาย ($\alpha_2 \beta_2$) และส่วนน้อยประมาณ ๓% เป็น Hb A₂ ($\alpha_2 \beta_2$) ในเด็กแรกคลอดนั้นมี Hb A น้อยมาก แต่จะเป็น Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะถูกแทนที่โดย Hb A ไปเรื่อยๆ จนเหลือไม่เกิน ๑% ในชาวปีแรก ความจริงในธรรมชาติของมนุษย์ ยังพบโกลบินชนิดอื่นๆ อีก แต่ไม่ค่อยมีความสำคัญและไม่ได้ศึกษากันมากนัก ได้แก่ โกลบินสาย E และ G ซึ่งพบเฉพาะในระยะต้นๆ ของชีวิตในครรภ์ ทั้งสาย β , δ และ ϵ นั้นมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนคล้ายๆกัน จำนวน ๑๔๖ ตัว ส่วนสาย ϵ มีกรดอะมิโนน้อยกว่าคือ ๑๔๑ ตัว สายโกลบินทั้ง ๔ ชนิดนี้เราทราบส่วนประกอบของมันทั้งหมด

หลักฐานจาก การศึกษาในประชากรต่างๆ พบว่า ส่วนใหญ่มียีนส์ของ α โกลบินเป็นจำนวนถึง ๒ คู่ (Double locus) นั่นคือมี ๒ ยีนส์ต่อ ๑ haploid chromosome ความเข้าใจอันนี้มีมานานแล้วโดยใช้เหตุผลจากการที่พบว่า เมื่อมีความ

ผิดปกติของฮีโมโกลบินเกิดขึ้นบนสาย α ก็มักจะพบ
 ปริมาณของ variant hemoglobin เป็นประมาณ
 ๑ ใน ๔ ของฮีโมโกลบินทั้งหมดแทนที่จะเป็นครั้งต่อ
 ครั้งดังเช่น β -chain variants และความรุนแรง
 ถึง ๔ ระดับของ α -thalassemia ก็เป็นเหตุผล
 สนับสนุนอีกอันหนึ่ง Duplicated gene ของ α
 โกลบินนี้ได้รับการพิสูจน์แน่นอนโดยการวิเคราะห์
 ยีนส์ของโกลบินโดยตรงเมื่อเร็วๆนี้เอง (๑,๒)
 และยังพบอีกว่ายีนส์ของ α โกลบินทั้งสองอยู่ห่าง
 กันราว ๒,๗๐๐ นิวคลีโอไทด์ หรือ ๒.๗ Kilo-
 bases บนโครโมโซมคู่ที่ ๑๖^(๓) สำหรับยีนส์ของ
 โกลบินชนิดที่เป็น non- α นั้น ปรากฏว่าเรียงกัน
 อยู่ทีโครโมโซมคู่ที่ ๑๑^(๔) ตามลำดับ $\begin{matrix} G & A \\ \delta & \delta \end{matrix} \delta \beta$
 ยีนส์ของ δ โกลบินก็มี ๒ คู่ ซึ่งนำการสร้างโกล-
 บินที่ต่างกันเพียงแห่งเดียวคือ glycine หรือ
 alanine ตำแหน่งที่ ๑๓๖ Hb A ในเด็กแรกคลอด
 เป็นชนิด $\begin{matrix} G & A \\ \delta & \delta \end{matrix} \delta \beta = 3:1$ คำนีกลับกันถ้าเป็น Hb F
 ในผู้ใหญ่ แม้เราจะแน่ใจได้ว่ายีนส์สำหรับ δ -
 chain ทั้งสองนี้มีอยู่แยกจากกันแต่ก็ไม่ทราบกลไก
 ในการควบคุมการสร้างของมันที่แท้จริง และสำ-
 หรับเรื่องของ δ -chain genes นี้จะยิ่งสับสน
 ขึ้นไปอีก โดยที่ในระยะหลังๆนี้ มีการค้นพบ Hb F
 ตัวใหม่คือ δ - โกลบินที่มี threonine แทนที่
 isoleucine ในตำแหน่งที่ ๗๔ มีปริมาณสูงถึง

๑๐% ในประชากร ๒ ใน ๕ คนของเด็กแรก-
 คลอดและอาจสูงกว่านี้ในโรคของการสร้างฮีโม-
 โกลบิน(๕) จนถึง ๔๐% ใน β - thalassemia
 (๖) เด็กในครรภ์ก็พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสร้าง
 $T\delta$ มากกว่าเด็กหลังคลอด (๗) การที่พบ $T\delta$ -
 Hb F เป็นปริมาณสูงในประชากรจำนวนมาก-
 อย่างนี้ ทำให้คิดว่า δ -chain gene คงจะไม่
 ใช่เป็นสองอันเสียแล้ว แต่ก็ยังมีเสียงแย้งว่า $T\delta$ -
 chain อาจจะเป็นเพียงผลของ polymor-
 phism ในสายไข่ของ $T\delta$ -globin gene
 มากกว่า (๘) หรือเป็นเพียง δ -variant ตัว
 หนึ่งเหมือน Hb F Sardinia (๙,๑๐) อีก-
 ประการหนึ่งผลการศึกษาของ Little และพวก
 (๑๑) โดย Restriction mapping ana-
 lysis (จะกล่าวถึงรายละเอียดในตอนหลัง) ก็
 บ่งบอกถึงการมี δ - chain loci เพียง ๒ อัน
 เท่านั้น ซึ่งอยู่ห่างกันประมาณ ๓.๕ Kilobases
 ดังนั้นหลักฐานเกี่ยวกับ $T\delta$ - gene ยังไม่เพียงพอ
 ที่จะเปลี่ยนแปลงอะไรเกี่ยวกับจำนวน δ -
 gene ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว จนกว่าจะได้ความ
 รู้ที่แน่ชัดกว่านี้

ความบกพร่องของการสังเคราะห์ และความผิดปกติของโครงสร้างส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากยีนส์ที่ผิดปกติ

การสร้างฮีโมโกลบินที่ผิดปกติจะแบ่งได้เป็น ๓ ลักษณะคือ อันแรก ทำให้เกิดความผิดปกติโครงสร้าง (Structural Abnormality) อันที่จริงโดยส่วนใหญ่แล้วความผิดปกติก็เป็นจุดเดียวในกว่าร้อยสลับจุดบนสายโกลบิน ที่กรดอะมิโนตัวหนึ่ง อาจถูกเปลี่ยนไปเป็นอีกตัวหนึ่ง ทั้งนี้ก็จากสาเหตุดั้งเดิมคือนิวคลีโอไทด์บนยีนส์เปลี่ยนไป นอกเหนือจากการแทนที่ของกรดอะมิโน โครงสร้างของฮีโมโกลบินอาจผิดปกติได้จากสาเหตุอื่นเช่น กรดอะมิโนหนึ่งตัว หรือหลายตัวหายไปเลยๆ (Deletion) หรือเพิ่มขึ้นมา (Addition) หรือมีเกินในทางปลาย (Elongation) หรือเกิดจากการที่ มี Crossing over ของคู่ยีนส์เมื่อโครโมโซมทั้งสองข้างเกิดเยื้องไปจากกัน (Unequal crossing over) ในขณะที่มีขบวนการแบ่งตัวไมโอซิส ความผิดปกติต่างๆ เหล่านี้อาจยังผลให้เกิดโมเลกุลของฮีโมโกลบินที่ด้อยคุณภาพ เช่นมี high oxygen affinity ทำให้เป็น polycythemia หรือด้อยเสถียรภาพ (unstable hemoglobins) ทำให้เกิด hemolytic anemia หรือ variants ที่ทำให้มีคุณสมบัติทางฟิสิกบางอย่างเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น Hb S ทำให้เกิด Sick cell anemia ตลอดจนพวก Hb Ms ที่ทำให้เกิด methemoglo-

binemia เป็นต้น ในบรรดาความผิดปกติทุกรูปแบบดังกล่าวมานี้ สาเหตุจาก single amino acid substitution เป็นแบบที่พบบ่อยที่สุดคือกว่า ๓๐๐ ตัว ในจำนวนนี้จะเป็นของ β -chain เสียประมาณสองในสาม ฮีโมโกลบินผิดปกติที่เราวิเคราะห์ได้เองในประเทศไทยก็เช่น Hb Siam, Hb Thailand, Hb Anantharaj, Hb Suan-Dok และ Hb Doi Suthep I สามตัวแรกจากตึกอานันทราช ร.พ. ศิริราช และสองตัวหลังจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลักษณะอันที่สอง ทำให้มีการสร้างน้อยลงสำหรับโกลบินบางสาย (Imbalance Synthesis) เป็นเหตุให้ขาดความสมดุลในการที่จะมาจับคู่กันเป็นฮีโมโกลบิน เกิดเป็นโรค thalassemias ชนิดต่างๆ แล้วแต่ว่าโกลบินชนิดไหนลดหรือหยุดการสร้าง เช่น α -thalassemia, β -thalassemia, $\delta\beta$ -thalassemia ประเทศไทยนับได้ว่าเป็นแหล่งที่มีอุบัติการณ์ของทั้ง α - และ β -thalassemia สูงมากที่สุดทีเดียวในแทบทุกภาคของประเทศ

ลักษณะความบกพร่องแบบที่สามคือเกิดกรณีที่ไม่มีการสลับเปลี่ยนจากการสร้าง Fetal Hb ไปเป็นการสร้าง adult Hb แทนเมื่อพ้นจาก-

ชีวิตในครรภ์ (Disorder of hemoglobin switching) ทำให้มีการสร้าง Hb F ต่อไปเรื่อยๆ จนเติบโต ซึ่งเรียกว่า Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH)

ความผิดปกติที่เป็นกรรมพันธุ์ทั้ง ๓ แบบเป็นที่รู้จักกันมานานทีเดียว มีอุบัติการณ์การกระจายอยู่แทบทุกส่วนของโลกก็ว่าได้ โดยเฉพาะ thalassemia ซึ่งทำให้เป็นปัญหาใหญ่ทางการแพทย์ เดิมทีเดียวโรคนี้ชื่อว่า Cooley's anemia และ Mediterranean anemia พบมากในหมู่ประชากรแถบเมดิเตอร์เรเนียนแถวกรีซ ไชปรัส อิตาลีและตุรกี ต่อมาพบว่าโรคนี้มีมากในแถบภาคพื้นตะวันออกเฉียงใต้ ในคนจีน และในทวีปอัฟริกาว่าครึ่งทวีปด้วย แต่พบน้อยมากในหมู่คนชาวยุโรปตอนเหนือๆ ส่วนโรคของ hemoglobinopathies นั้น แม้จะพบรายงานกว่า ๓๐๐ ชนิด แต่ส่วนใหญ่ก็เป็นแบบพบในครอบครัว ซึ่งคิดว่าเกิดจาก point mutation มากกว่าที่จะพบในกลุ่มประชากร และมักไม่ก่อให้เกิดปัญหาหรือโรคร้ายแรงอะไร มีเพียงไม่กี่ตัวเท่านั้นที่พบมีอุบัติการณ์สูงเช่น Hb E ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และ Hb S ที่มีระดับกันในกลุ่มชนอัฟริกาบางภาค และแม้แต่ในตะวันออกกลาง สำหรับภาวะของ HPFH นั้นมีหลายแบบใน

ในกลุ่มคนต่างๆ เช่น แบบที่พบในชนผิวดำเป็นลักษณะของการขาดการสร้าง β -chain และ δ -chain โดยสมบูรณ์ ทำให้มีการสร้าง γ -chain ในระดับสูงในผู้ใหญ่ ลักษณะการกระจายของ Hb F ในเม็ดเลือดแดงจะเท่าๆ กันทุกเม็ด (โดยการย้อม Hb F หรือ Acid elution staining) จากการตรวจโดยวิธี hybridization ระหว่าง β mRNA กับ β -globin structural gene ผลปรากฏว่าไม่มี β mRNA อยู่ใน reticulocyte เลย (๑๒,๑๓) และเมื่อพิสูจน์ลงไปว่านั่นอีกด้วยการวิเคราะห์ยีนส์โดยตรง ก็พบว่า ทั้ง β และ δ structural genes หายไปทั้งหมด (๒,๑๔) ส่วน HPFH อีกหลายแบบซึ่งมีพบบ้างในกลุ่มชนอื่นๆ นอกเหนือจากคนผิวดำนั้น ไม่เกี่ยวข้องกันกับ β -globin gene deletion (๑๔) ทำให้ยังมีการสร้าง HbA อยู่บ้างร่วมกับมีระดับของ Hb F สูงๆ

ห้องปฏิบัติการต่างๆ ไป อาจตรวจหาความผิดปกติของฮีโมโกลบิน เพื่อการวินิจฉัยโรคเหล่านี้ได้ภายในขอบเขตที่กว้างขวางพอสมควรทีเดียว และด้วยวิธีการที่ไม่ยากจนเกินไปนัก วิธีการตรวจเบื้องต้นดังกล่าวประกอบด้วย การทำ Electrophoresis ที่ alkaline และ acid

pH ซึ่งอันนี้จะทำให้สามารถดูได้ว่า นอกจาก Hb A แล้วยังมี Hb ผิดปกติอื่นหรือไม่ Hb A₂ สูงไหมมี Hb H หรือ Hb Bart's หรือเปล่า การทำ acid elution test เป็นวิธีการที่ง่ายมากเพียงแค่จุ่มสไลด์เลือกที่เตรียมใหม่ๆ และทิ้งให้แห้งลงใน ๘๐% ethyl alcohol ๒ นาที และย้ายไปจุ่มอีก ๒ นาทีใน ๐.๑% Amido black β ใน ๘๐% alcohol ซึ่งปรับ pH เป็น ๑.๕ ล้างด้วยน้ำก็อกเลือกของใครมี fetal cell ปรากฏอยู่มากกว่า ๐.๑% ขึ้นไปแสดงว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นเกี่ยวกับการสร้างฮีโมโกลบินแล้ว โดยเฉพาะเป็นตัวบ่งบอกที่ดีมากสำหรับ β -thalassemia และ HPFH สำหรับ heterozygote β thalassemia นั้นมีการตรวจที่บอกได้แน่นอนคือระดับของ Hb A₂ ซึ่งสูงขึ้นจาก ๓% ในคนปกติถึง ๔-๘% วิธีการหา Hb A₂ ก็ทำได้ง่ายโดย microcolumn chromatography ดังเคยเสนอรายละเอียดแล้วในวารสารเล่มนี้ (๑๖) การตรวจดู Inclusion bodies เป็นอีกหนึ่งที่เราควรจะทำด้วยเพื่อช่วยในการวินิจฉัย α -thalassemia และยังช่วยบอกถึงการมี unstable hemoglobin ขึ้นได้ด้วยเมื่อปรากฏมีก้อนตกตะกอนอยู่ในเม็ดเลือดแดง

จุดแห่งปัญหาและหนทางนำไปสู่การแก้ปัญหา

โรคที่ถ่ายทอดได้ทางกรรมพันธุ์ เป็นโรคที่มีปัญหามาก ทั้งนี้เพราะเราไม่สามารถจะรักษาให้หายจากโรคได้ โรคกรรมพันธุ์ส่วนใหญ่นั้น ตั้งแต่เป็นเด็กเล็กๆ ก็ต้องอาศัยการประคบประหงมเป็นพิเศษจากบิดามารดาและแพทย์ซึ่งก็ได้แต่รักษาตามอาการ หรือช่วยป้องกันความรุนแรงของโรคเพื่อให้มีชีวิตที่สบายขึ้น และอยู่รอดต่อไปได้จนถึงที่สุดถ้าผู้ป่วยรับยีนส์เสียมาเพียงข้างเดียว (heterozygote) ก็อาจจะค่อยยังชั่วหน่อย พยาธิสภาพส่วนนั้นอาจถูกบดบังหรือทดแทนได้ด้วยอีกข้างที่ดี แต่เขาก็ยังเป็นพาหะของโรคนั้นถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานต่อไปอีกได้ไม่มีวันสิ้นสุด เคยคิดกันว่าโรคทางกรรมพันธุ์มีทางแก้โดยการป้องกัน ภายใต้อวิธีการที่เรียกว่า "Genetic Counselling" โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพันธุศาสตร์ ให้คำปรึกษาแนะนำ คู่แต่งงานเกี่ยวกับโรคเหล่านี้และหนทางที่จะถ่ายทอดไปยังบุตร อย่างไรก็ตาม genetic counselling ก็มีปัญหามากในทางปฏิบัติ ไม่สามารถจะถือเป็นการแก้ได้ เพียงแต่อาจลดอุบัติการณ์ของโรคได้บ้างถ้าทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ถึงแม้จะมีคนเคยพูดไว้ว่าสิ่งลึกซึ้งที่สุดของ

ชีวิตก็คือยีนส์ หน่วยเล็กๆ ที่ฝังตัวอยู่ในโครโมโซม ซึ่งเป็นเสมือนตัวกำกับ และควบคุมทุกสิ่งทุกอย่าง ตั้งแต่ลักษณะทางกายภาพ ชีวภาพ ตลอดจนพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิต แต่สิ่งเล็กๆ นานี้กำลังถูกเปิดเผยออกมาทีละน้อยๆ ทั้งนี้ก็ด้วยความอุตสาหะวิริยะของบรรดานักค้นคว้าวิจัย นักสืบเสาะหาความลับของธรรมชาติไม่ว่าเขาเหล่านั้นจะตั้งความหวังเพื่อให้ได้ความรู้ อย่างเดียวหรือจะตั้งความหวังเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ การสาธารณสุขก็ตาม แต่อย่างน้อย ผลพลอยได้ก็ตามมาก็คือประโยชน์อันมหาศาล ทำให้เริ่มมองเห็นหนทางไปสู่จุดแห่งการป้องกัน หรือแก้ไขโรคของกรรมพันธุ์บางอย่างได้

ก่อนอื่นขอให้ท่านทบทวนความทรงจำเกี่ยวกับเหตุการณ์บางอย่างภายในเซลล์ บนโครโมโซม ซึ่งอยู่ในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ทุกๆ เซลล์นั้น เป็นที่อยู่ของยีนส์นับได้เป็นจำนวนล้านๆ ยีนส์ จากยีนส์แต่ละยีนส์จะมีข่าวสารจาก DNA ส่งออกจากนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสซึมโดย mRNA ซึ่งพิมพ์ข่าวสารมาจาก DNA structural genes ตัว mRNA เองก็เลยทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีนชนิดที่จำเพาะ ซึ่งรับมาจาก specific gene นั้นๆ กลไกของ DNA → RNA → protein นับเป็นจุดกลางอันสำคัญของชีวโมเลกุล โรคทางกรรมพันธุ์หลายอย่างเกิดจาก point mutation

บน DNA จึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติบนโปรตีน ทำให้ทำงานไม่ได้หรือไม่ดี หรือมีคุณสมบัติบางอย่างเปลี่ยนไป ชีวิตที่น่าจะเป็นปกติสุขของมนุษย์ก็ต้องเปลี่ยนไปเป็นโรคต่างๆ ไปด้วย

โรคทางกรรมพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮีโมโกลบิน นับเป็นกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่ง และมีอุบัติการณ์ที่สูงกว่าโรคกรรมพันธุ์ชนิดอื่นๆ และมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยมากที่สุด ความผิดปกติมีทั้งในแง่คุณภาพ (Hemoglobinopathies) และในแง่ปริมาณ (Thalassemias) ดังได้กล่าวมาแล้ว การศึกษาวิจัยที่เคยทำมาในระยะก่อนๆ จะเป็นการวิเคราะห์ผลผลิตตอนปลายมือ ฮีโมโกลบิน หรือลึกเข้าไปอีกหน่อยคือ วิเคราะห์ mRNA ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocyte) ทำให้คาดคิดลักษณะความผิดปกติของยีนส์ได้บ้าง แต่เพื่อให้ได้ความเข้าใจที่ถูกต้องสมบูรณ์ เขาจึงจำเป็นต้องหาวิธีวิเคราะห์ที่ยีนส์โดยตรง บทบาทของ Reverse transcriptase ต่อการศึกษา Globin gene.

เป็นที่ทราบกันดีว่า จำนวนยีนส์สำหรับโปรตีน และเอนไซม์ต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง อย่างมนุษย์นั้น มีจำนวนและชนิดนับไม่ถ้วน การที่จะดึงเอาเฉพาะ globin genes ออกจากโครโมโซมมาศึกษา ถ้าไม่มีวิธีการก็เหมือนกับ

จะหาหยาหน้าที่จำเพาะหยาหนึ่งจากทะเลสาบสมุทร
ทีเดียว เมื่อก่อนหน้านั้น เขาใช้วิธีแยกเอา spe-
cific globin DNA ออกจาก genes ต่างๆ
โดย indirect method กล่าวคือ เริ่มต้นด้วย
การเตรียม mRNA โดยการใช affinity co-
lumn chromatography (๑๗) เนื่องจาก glo-
bin mRNA มี poly A nucleotides ทาง-
ปลาย ๓' จึงใช้ poly U-sepharose หรือ
oligo Td-cellulose เป็นตัวจับ Globin
mRNA อาจแยกจาก reticulocyte โดยอาศัย
ขนาดซึ่งมี M.W. ประมาณ ๒๖๕,๐๐๐ (๑๘) หลัง
จากนั้นต้องอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งจากไวรัส
คือ RNA dependent DNA polymerase หรือ
Reverse transcriptase (๑๙) พิมพ์เอา DNA
sequence กลับจาก mRNA โดยที่ในเวลาเดียว
กันก็ใช้นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากสารรังสีเอาไว้ด้วย
Nucleotide sequence ที่เขาสังเคราะห์ขึ้นได้
ใหม่นี้เรียกว่า complementary DNA หรือ copy
DNA (cDNA) โดยวิธีนี้เขาจะเตรียม cDNA
ของ α -globin ได้โดยใช้ mRNA จาก reticu-
locyte ของคนไข้ β thalassemia homozy-
gote และเตรียม cDNA ของ β -globin ได้โดย
ใช้ mRNA จากคนไข้ Hydrops fetalis (α -

thalassemia homozygote) ซึ่ง chain
specific mRNA นี้ทดสอบได้โดย cell-free
protein synthesis system ใน wheat
germ (๒๐) สำหรับ globin specific
cDNA ที่เตรียมได้นี้ได้เคยถูกนำไปใช้เป็นตัวตรวจ
หา mRNA ในโรค thalassemia ชนิดต่างๆ
อย่างได้ผลมาแล้ว ตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์
total cell mRNA โดย cDNA/mRNA
hybridization ทำให้ทราบว่า β -thalasse-
mia บางรายไม่มี β -chain mRNA อยู่ในไซโต-
พลาสซึมเลย (๒๑,๒๒) ในขณะที่บางรายมีพบเป็น
 β -chain mRNA ที่ผิดปกติ (๒๒,๒๓) cDNA นี้
อีกเช่นกันที่เขาเข้าไปใช้ตรวจสอบ DNA ของ
globin gene โดยวิธีการ DNA/cDNA Hybri-
dization (๒๔,๒๕) โดยใช้หลักง่ายๆ คือทำ
ให้สายคู่ของ DNA จากเซลล์ที่จะทำการตรวจคลาย
ตัวออกจากกันด้วยความร้อนหรือ high salt
solution ขณะเดียวกันก็ใส่ cDNA probe
เข้าไปแล้วจึงทำให้เย็นลง cDNA จะเข้าไปจับคู่
(reanneal) กับ specific DNA ที่ comple-
mentary กัน จากนั้นสายคู่และสายเดี่ยวของ
DNA จะถูกแยกจากกันโดย hydroxy apatite
ใน column chromatography จากการตรวจ

วัดด้วย annealed และ unannealed cDNA probe เขาก็สามารถหาปริมาณของ globin gene ได้ โดยเทคนิคอันนี้เขาสามารถพิสูจน์ออกมาได้ว่า α -thalassemia เป็นโรคที่เกิดจากการขาดหายไปของ α -globin gene (๒๕) ต่างจากส่วนใหญ่ของ β thalassemia ซึ่งพบว่า β -globin gene อยู่แน่ (๒๖)

บทบาทของ Restriction endonuclease กับ การทำ Gene mapping.

การนำเอาประโยชน์ของ Restriction endonuclease มาใช้ในการวิเคราะห์โมเลกุลของ DNA (๒๗) ทำให้การศึกษาพันธุกรรมของฮีโมโกลบินได้ก้าวขึ้นไปอีกขั้นหนึ่งอย่างเต็มภาคภูมิ นั่นคือวิธีการของ gene mapping ซึ่งให้ความรู้เกี่ยวกับ globin gene ออกมามากมายทีเดียว

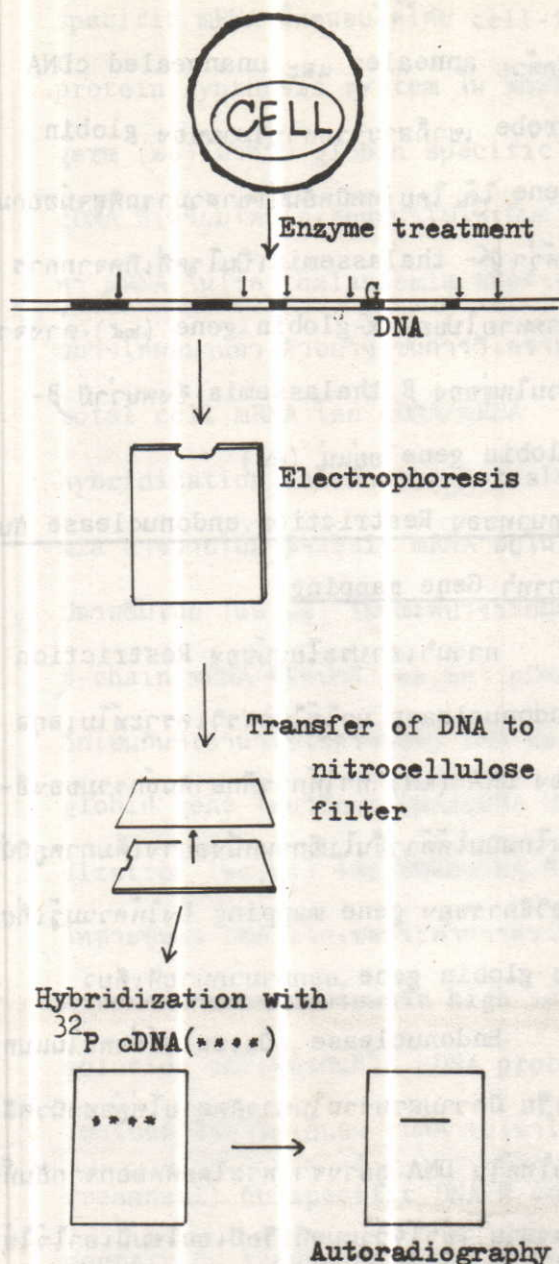
Endonuclease เป็นเอนไซม์ซึ่งพบในแบคทีเรีย มีความสามารถในการตัดสายไข่อู๋ของนิวคลีโอไทด์ใน DNA อย่างจำเพาะโดยตัดออกจากกันทั้งสองสาย เข้าใจว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์นี้เอาไว้ใช้สำหรับป้องกันตัวเองจากไวรัส และตัวแบคทีเรียเองจะป้องกัน DNA ของมันไว้โดย methylation ที่ susceptible site เสีย Restriction enzymes มีมากมายหลายตัวจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ แต่ละตัวก็อาจมีความจำเพาะในการย่อย

ลำดับของนิวคลีโอไทด์บน DNA แตกต่างกันไปทำงานคล้ายกับ specific proteolytic enzyme สำหรับ site specific endonuclease นี้ ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ๑๙๗๐ จากนั้นก็มีคนประยุกต์เอาเอนไซม์เหล่านี้มาใช้ในการวิเคราะห์ viral genome โดยพันทิ (๒๘) ต่อมาเมื่อมีการค้นพบเอนไซม์ตัวใหม่ๆ มากขึ้น จึงเริ่มมีการทำ chromosome mapping, วิเคราะห์ nucleotide sequence ของ DNA, แยกยีนส์ต่างๆ ออกมา ตลอดจนการต่อโครงสร้างของ DNA nucleotides ขึ้นใหม่ (๒๗)

ขั้นตอนการทำ Globin gene map:-

DNA ของเซลล์เมื่อให้ถูกย่อยโดย restriction enzyme หนึ่งๆ แล้ว อาจได้ชิ้นส่วนของ DNA ขนาดต่างๆ กันออกมามากมายนับจำนวนพันได้ ชิ้นส่วนเหล่านี้จะถูกนำมาแยกโดย electrophoresis บน agarose gel ซึ่งอาศัยหลักความแตกต่างกันของขนาด โดยที่ชิ้นส่วนที่เล็กจะวิ่งไปไกลกว่าชิ้นส่วนที่ใหญ่ เมื่อสามารถแยก DNA ทั้งหมดของเซลล์ออกมาเป็นส่วนๆ อยู่บน slab gel อย่างนี้แล้ว ขั้นตอนต่อไปก็คือ หาตำแหน่งของ globin gene ซึ่งก็ต้องใช้คุณสมบัติของ DNA/cDNA hybridization อีก โดยเตรียม radioactive cDNA (cDNA) ของ globin gene เพื่อ

เข้าไปหา α - หรือ β -globin gene ใน electrophoregram ดังกล่าว วิธีการทำจริงๆ เขาไม่สามารถจะทำ hybridization ในเนื้อเยลซึ่งชิ้นส่วนของ DNA ต่างๆ ผังอยู่ได้ จะต้องนำมาซับลงบน absorbent filter แล้วจึง hybridize กับ cDNA probe เสร็จแล้วจับภาพเข้ากับแผ่นฟิล์ม X-ray เพื่อให้ได้ radioautograph ของสารรังสี cDNA อีกทอดหนึ่ง โดยวิธีการย้ายถ่ายเทเป็นกระบวนการตามที่ได้กล่าวมาแล้วนี้ จะได้ผลขั้นสุดท้ายออกมาเป็นภาพ (map) ที่ประณีตถูกต้อง และแน่นอนของ globin gene ลักษณะของภาพนี้จะจำเพาะสำหรับการย่อย DNA ด้วย restriction enzyme ตัวหนึ่งๆ ในตอนแรก



รูปที่ ๑ แสดงวิธีการในการทำ Globin gene map โดยการย่อยของ Restriction endonuclease ในขั้นตอน จนกระทั่งได้ autoradiograph ของ globin gene map. G หมายถึง globin gene

ขณะนี้เขาทำ α, β -globin

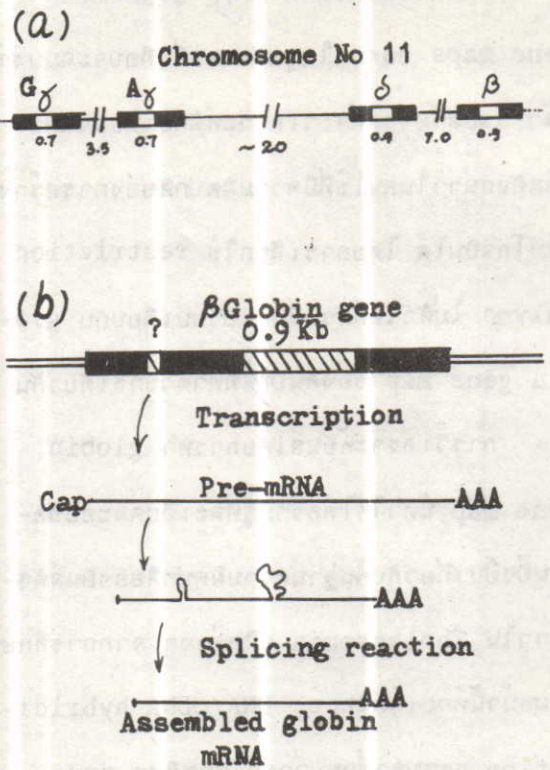
gene maps ออกมาในรูปลักษณะที่เกือบจะสมบูรณ์แล้ว และสามารถที่จะวิเคราะห์ลักษณะของแผนภาพดังกล่าวในคนไข้ที่มีความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินได้ โดยการเลือกใช้ restriction enzyme ไม่ตัวใดก็ตัวหนึ่ง เปรียบเทียบกับ globin gene map ของคนปกติที่ทำด้วยวิธีเดียวกัน

การวิเคราะห์ยีนส์โดยการทำ globin gene map นี้ทำให้ได้ความรู้ที่จะแยกแยะออซซิเจนอิงขึ้นเกี่ยวกับพื้นฐานความผิดปกติของยีนส์ดังกล่าวใน Thalassemia ชนิดต่างๆ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ด้วยเทคนิคของ DNA/cDNA hybridization ธรรมดาซึ่งพบว่าสาเหตุจริงๆ ของ thalassemias นั้นไม่เป็นไปในลักษณะเดียวกันหมด (มี heterogeneity) เช่น HPFH เกิดจากการขาดหายไปของ β -globin gene (๑๒,๑๓) $\alpha\beta$ -Thalassemia เกิดจากการขาดหายไปเป็นบางส่วนของ α และ β -globin coding sequences (๒๔,๓๐) ใน β -thalassemia ส่วนใหญ่ β -globin gene ยังมีอยู่เป็นปกติ (๒๖) แต่โดยที่ mRNA หายไปหรือมีปริมาณน้อยลง (๒๒) บางรายงานก็บอกว่า mRNA มีเป็นปกติในนิวเคลียสแต่ไม่มีในไซโตพลาสซึมของ erythroid cells

(๓๑) และบางรายงานก็ว่าพบ mRNA ที่ผิดปกติ โดยที่ coding sequence ทางด้านปลาย ๓' ขาดหายไป (๒๒) ความรู้เหล่านี้ได้รับการตรวจสอบพิสูจน์โดย globin gene map หลายรายการแล้ว (๒,๑๔) β thalassemia ในบางคนพบว่าเป็นผลจาก gene mutation (๓๒) ส่วน α -thalassemia ก็ได้รับการพิสูจน์ว่าส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไปของ α -chain gene หนึ่งอัน หรือสองอันซึ่งอาจเป็นผลจาก unequal crossing over (๓๓) แต่ก็ยังมีส่วนน้อยซึ่งพบว่าไม่ใช่ gene deletion (๓๔,๓๕) ซึ่งอาจเป็น defective α -loci (๓๖) เมื่อมาถึงตอนนี้จะมองเห็นได้อย่างชัดเจนถึง heterogeneity ของสาเหตุพื้นฐานของ thalassemias ความแตกต่างอันนี้เป็นจริงแม้แต่ใน thalassemia ชนิดเดียวกัน ในเผ่าพันธุ์เดียวกัน จนยากที่เราจะบอกให้ชัดเจนไปเลยว่า thalassemia ชนิดนั้นเกิดจาก gene deletion แน่หรือไม่ จนกว่าจะได้ทำในจำนวนประชากรชาว thalassemias ให้มากกว่านี้ทั้งนี้เพราะวิธีการวิเคราะห์นั้นมีย่อยอย่างดีแล้วตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น

อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการใช้วิธีการ

ที่สลับซับซ้อน และชาญฉลาดในการทำ Restriction mapping ทำให้พบสิ่งที่น่าสนใจอย่างหนึ่งใน globin gene คือเขาพบว่า globin genes ไม่ได้เป็นสายโซ่นิวคลีโอไทด์ที่ต่อเนื่องกันไปตลอดในแต่ละยีน แต่ถูกคันไว้ด้วยช่วงของ DNA อย่างอื่นเป็น intervening sequence (๓๗) ซึ่งเขาให้ชื่อว่า inserts หรือ introns ในขนาดความยาวถึงหลายร้อย base pairs ขณะนี้ยังไม่มีใครทราบหน้าที่ของ inserts เหล่านี้ เข้าใจว่าอาจมีสอแทรกอยู่ในยีนส์อื่นๆ ด้วย การค้นพบอันนี้ทำให้ออกคิดไม่ได้ว่า ในขณะที่เกิด transcription ในตอนแรกมันคงจะ transcribe ให้ mRNA สายยาว ซึ่งอาจเรียกว่าเป็น pre-mRNA ก่อนแล้วจึงมีการตัดและต่อใหม่ (๓๗) เพื่อให้ได้ mRNA ของ globin protein อีกทีก่อนที่จะถูกส่งไปยังไซโตพลาสซึม



รูปที่ ๒ (a) แสดงแผนภาพของ non α -globin gene loci ซึ่งอยู่บน chromosome ที่ ๑๑ ช่องว่างใน gene คือ introns ที่พบ ซึ่งมีขนาดความยาวเป็น kilobase pairs (Kb) ตามตัวเลขที่กำกับอยู่

(b) แสดงให้เห็นลักษณะการตัดตอนเอา intervening sequence ออกหลังจาก transcription ได้ mRNA สายยาว (pre-mRNA) โดยมี cap structure ของ globin mRNA ทางปลาย ๕' ส่วน AAA หมายถึง poly-adenylic acid ทางปลาย ๓'

ถ้าข้อสันนิษฐานอันนี้เป็นจริงเราก็น่าจะกล่าวได้ว่า
อย่างเต็มปากเต็มคำว่า ในจุดของการตัดต่อ mRNA
นี้ โอกาสที่จะเกิดการผิดพลาดเป็นไปได้หลายแห่ง
และหลายลักษณะอย่างไม่มีข้อสงสัย ทำให้คิดเลย
ไปอีกว่าสาเหตุของความผิดปกติในการสร้างฮีโม-
โกลบินในแง่ของ thalassemias และ hemo-
globinopathies บางอัน อาจเกิดที่จุดนี้ได้โดย
เฉพาะพวกที่มี globin gene อยู่ครบ

สำหรับการนี้ของ thalassemia ที่พบยีนส์
ปรากฏอยู่ แต่ไม่มีการสร้างโกลบินนี้ เขาได้ลอง
ศึกษาว่า ถ้าสามารถใส่เอาชิ้นส่วนของ DNA
ที่มี globin gene ต่างๆ ดังกล่าว เข้าไปใน
bacterial plasmid (๓๘,๓๙) หรือแม้แต่ใน
Erythroleukemia cells ของหนู (๔๐) จาก
นั้นก็จะแยกเอาเฉพาะ clone ที่มี globin
gene มาเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะนำมา-
ตรวจวิเคราะห์ sequence ของ globin gene
เพื่อดูความผิดปกติ หรือเพื่อให้ได้ globin
gene ที่บริสุทธิ์ในปริมาณมากๆ ทำเป็น c DNA
probe ความพยายามในขั้นนี้ เขาได้ทำมาถึงแล้ว
โดยมีนักวิจัยทางด้านนี้หลายท่านได้ประสบผลสำ-
เร็จในการเพาะ human globin gene แล้ว
จากทั้งคนปกติและผู้ป่วยโรค thalassemia
กลไกของความผิดปกติต่างๆ ที่ยังไม่ทราบกำลัง

ถูกเปิดเผยออกมากขึ้นๆ ขณะที่เขียนบทความ เมื่อนี้ก็
มีรายงานผลการตรวจ β thalassemia gene
และ α thalassemia gene ด้วยเทคนิคดังกล่าว
ตีพิมพ์ออกมาแล้ว (๔๑,๔๒)

ประโยชน์ในด้านการแพทย์

เป็นที่ทราบดีว่าโรคของกรรมพันธุ์นั้น รักษา
ให้หายขาดไม่ได้เลย จะเป็นได้ก็แค่เพียงในแง่ของ
การป้องกันไม่ให้เกิดขึ้นเท่านั้น สำหรับ Thalas-
semia นอกจากโดยวิธีการของ genetic coun-
selling แล้ว ก็มีวิธีทำ prenatal diagnosis
ขึ้นมาช่วยอีกแรงหนึ่ง ซึ่งในตอนแรกเขาใช้วิธี-
ตรวจวัดอัตราการสร้าง globin chain ของ
เลือดเด็กในครรภ์ในระยะ Mid trimester
(๔๓,๔๔) วิธีการอันนี้ค่อนข้างจะยุ่งยากกับทั้ง
ฝ่ายสูติแพทย์ และวิธีการทำในห้องปฏิบัติการ อีก
ทั้งผลที่ได้ก็ไม่ชัดเจนเท่าที่ตัดสินใจยาก

หลังจากที่มีเทคนิคของ DNA/cDNA
hybridization และ globin gene mapp-
ing เกิดขึ้น เส้นทางของการทำ prenatal
diagnosis ของโรคดังกล่าวก็เป็นไปได้ง่ายขึ้น
มากเพราะเพียงแค่เจาะเอาน้ำคร่ำมาวิเคราะห์
โดยผ่านการทำ amniotic cell culture
เพื่อให้ได้ปริมาณของ DNA มากพอ DNA นี้จะเป็น
ตัวแทนพันธุกรรมของตัว เด็กในครรภ์ เทคนิคอันนี้

มีใช้ทำกันแล้วในระดับของปฏิบัติการวินิจฉัย (๔๕, ๔๖)

Globin gene map ที่ Orkin และเพื่อนร่วมงานของเขาทำครั้งแรกในการวินิจฉัย β -thalassemia ในระยะอยู่ในครรภ์นั้น เขาใช้ Restriction endonuclease ๒ ตัว คือ Eco RI ซึ่งตัด GAATTC และ Hing III ซึ่งตัด AAGCTT; Eco RI จะย่อย DNA ของคนปกติได้ ๔ fragments ที่มี β globin gene sequence เขาพบว่า ๓ ใน ๔ fragments นี้หายไป ใน β -thalassemia และ HPFH ถ้าใช้ Hind III จะย่อยปกติได้ ๓ fragment ที่มี globin gene sequence ดังกล่าว และ ๒ fragments ในนี้จะหายไป ใน β thalassemia homozygote (๒)

นอกจาก thalassemia แล้ว การทำ prenatal diagnosis ยังเป็นไปได้สำหรับ hemoglobinopathies บางอันด้วย (๔๗) ตัวอย่างเช่น Hb O Arabia ($\beta^{121}\text{glu} \rightarrow \text{lys}$) เกิดจาก mutation ใน DNA sequence จาก GAATTC ไปเป็น AAATTC ซึ่งทำให้ Eco RI ตัดไม่ได้ก็เลยได้ fragment ใหญ่แทน ๒ fragments เล็กตามปกติบน globin gene map หรือโรคของ Sick cell ซึ่งเกิดจาก Hb S

($\beta^6\text{glu} \rightarrow \text{val}$) เป็นการเปลี่ยนแปลงของ GAGGAG ไปเป็น GTGGAG ก็มีโอกาที่จะทำ prenatal diagnosis ได้เมื่อพบเร็วๆนี้ว่าเอ็นไซม์ Mnl I ซึ่งสกัดได้จาก Moraxella non liquifaciens สามารถตัด nucleotide sequence GAGG ได้ ความหวังสำหรับ prenatal diagnosis ของ Sick cell disease นี้ Kan และ Dozy ได้ทำเป็นผลสำเร็จแล้ว (๔๘)

นับได้ว่าเป็นระยะเวลาเพียงสองปีเท่านั้นที่มีการนำเอาประโยชน์จากผลงานวิจัยขั้นพื้นฐานของ molecular genetics มาใช้อย่างเป็นจริงเป็นจังได้ ในระดับของการแพทย์วินิจฉัย ความฝันสำหรับอนาคต

ความเจริญก้าวหน้าในด้านการทำ Human gene mapping ได้เป็นไปอย่างรวดเร็วมากในรอบปีที่ผ่านมา เชื่อแน่ว่าในไม่ช้านี้ เราจะเข้าใจถึงพื้นฐานความผิดปกติของการสร้างฮีโมโกลบินอีกหลายๆอย่างที่ยังเหลืออยู่ และถ้าเรามีความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของ globin gene ได้ลึกซึ้งยิ่งขึ้นแล้วก็คงจะหาคำตอบได้ว่าการสร้างโกลบินแต่ละชนิด มีการแทนที่กันได้อย่างไร และด้วยปัจจัยอะไรกระตุ้นในระหว่างการเจริญในช่วงของทารกในครรภ์และหลังคลอด

(Hemoglobin Switching) ตลอดจนในภาวะที่มีการกระตุ้นให้มีการสร้าง fetal hemoglobin อีกในสัตว์หลังทารก จวบจนปัจจุบันนี้เรายังมีความรู้ค่อนข้างมากเกี่ยวกับปัจจัยและกลไกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการสลับเปลี่ยนการสร้างฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง $\alpha \rightarrow \beta$ chain switch ได้รับความสนใจเป็นพิเศษ (๔๔) โดยเฉพาะในแง่ที่จะนำมาใช้ประโยชน์กระตุ้น α -gene ในผู้ใหญ่เพื่อผลในทางคลินิก ตัวอย่างเช่น ถ้าหากเราสามารถจะสร้างภาวะคล้าย HPFH ในคนไข้ Sick cell disease หรือ β thalassemia ได้แล้ว ก็จะช่วยลดความรุนแรงของอาการในโรคดังกล่าวได้ (๔๐) อันนี้จะนับได้เป็นก้าวใหม่อันหนึ่งในการรักษาโรคของพันธุกรรม

นอกจากนี้ ความสามารถในการแยก globin gene ออกมาเลี้ยงให้บริสุทธิ์ใน bacterial plasmid หรือ erythroleukemia cell ดังได้กล่าวมาแล้ว อาจเป็นช่องทางให้เราได้มีโอกาสที่จะนำไปใส่ให้กับคนไข้ที่ globin gene ขาดหายไปหรือที่ globin gene ไม่ทำงาน ซึ่งถ้ามองตามหลักการแล้วก็ไม่แน่ว่าจะเกินขอบเขตของความเป็นไปได้ แต่อย่างไรก็ตาม เรื่องของพันธุกรรมเป็นเรื่องที่มีความสลับซับซ้อนและละเอียดอ่อนมาก ความยากและปัญหาต่าง จมอองข้ามไม่

ได้เลย แม้ว่าเราจะสามารถใส่ globin gene เข้าไปใน genome ของเซลล์หลายชนิด จนกระทั่งทำให้มันสังเคราะห์โกลบินได้ก็ตาม แต่เขาก็ยังต้องเดินทางอีกไกลทีเดียวที่จะก้าวไปถึงขั้นที่จะเรียกว่า Gene Therapy ที่แท้จริง ยกตัวอย่างปัญหาที่เห็นได้ง่ายๆ เช่น globin gene ดังกล่าวจะใส่เขาไปที่เซลล์ไหน ถ้าท่านรู้จัก hemopoietic cells ก็อาจจะตอบว่า stem cell ใจเล้าเพราะเป็นพ่อแม่ของ hemopoietic cell ทั้งปวง แต่จะมีใครบอกได้แน่นอนว่า stem cell อยู่ที่ไหน มีรูปร่างอย่างไร และถึงแม้จะหา stem cell พบและสอดใส่ globin gene ให้ได้จริงแล้ว ก็จะต้องมาเผชิญกับปัญหาในการขจัด hemopoietic cell line ที่ผิดปกติของตัวคนไข้อีกเพื่อให้เหลือเฉพาะ cell line ใหม่ที่แก้ไขแล้ว นี่เป็นเพียงตัวอย่างปัญหาที่คาดคิดกันได้ ในขณะที่เท่านี้มันยังจะมีปัญหาตามมาอีกมากมายทีเดียวเมื่อลงมือทำกันจริงๆ อย่างไรก็ตามไม่มีใครกล้าพูดได้อย่างเต็มปากว่า ความฝันอันนี้เป็นไปไม่ได้ Inshaallah วันหนึ่งข้างหน้าสิ่งที่เราเรียกว่ายากในวันนี้ อาจจะกลายเป็นง่ายไปได้ เมื่อเวลานั้นมาถึง ดังคำกล่าวที่ว่า "What seemed distant to us years ago is now at our threshold".

เอกสารอ้างอิง

1. Kan, Y.W., Dozy, A.M. Varmus, H.E., et al. Deletion of α -globin genes in Haemoglobin-H disease demonstrates multiple α -globin structural loci, *Nature* 255: 255, 1975.
2. Orkin, S.H., Alter, B.P., Altay, C., et al, Application of endonuclease mapping to the analysis and prenatal diagnosis of thalassemias caused by globin gene deletion. *New Engl. J. Med.* 299:166, 1978.
3. Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P., et al. Localization of the human α -globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell* 12: 205, 1977.
4. Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., et al. Chromosomal localization of human globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1456, 1978.
5. Huisman, T.H.J., Schroeder, W.A., Reese, A., et al. The T γ -chain of human fetal hemoglobin at birth and in several abnormal hematological conditions. *Ped. Res.* 11: 1102, 1977.
6. Ricco, G., Mazza, U., Turi, R.M., et al. Significance of a new type of human foetal haemoglobin carrying a replacement isoleucine $\rightarrow$ threonine at position 75(E 19) of the chain. *Hum. Genet.* 32: 305, 1976.
7. Saglio, G., Mazza, U., Camaschella, C., et al. Composition of the γ -chains of human fetal hemoglobin at birth and during intrauterine life. *Acta Haematol.* 62:45, 1979.
8. Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J.

- Efremov, G.D., et al. Further studies of the frequency and significance of the δ T-chain of human fetal hemoglobin. *J. Clin. Invest.* 63:268, 1979.
9. Grifoni, V., Kamuzura, H., Lehmann, H., and Charlesworth, D., A new Hb variant: Hb F Sardinia 75 (E 19) isoleucine-threonine found in a family with Hb G Philadelphia, β -chain deficiency and a Lepore-like haemoglobin indistinguishable from Hb A₂. *Acta Haematol.* 53:347, 1975.
10. Saglio, G., Ricco, G., Mazza, U., et al. Human T- globin chain is a variant of A- δ chain (A- δ Sardinia). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:3420, 1979.
11. Little, P.F.R., Flavell, R.A., Kooter, J.M., et al. The structure of the human foetal globin gene locus. *Nature* 278:227, 1979.
12. Kan, Y.W., Holland, I.P., and Dozy, A.M., et al. Deletion of the β -globin structure gene in hereditary persistence of foetal hemoglobin. *Nature* 258:162, 1975.
13. Forget, B.G., Hillman, D.G., Lazarus, H.H., et al. Absence of messenger RNA and gene DNA for β -globin chains in hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Cell* 7:323, 1976.
14. Mears, J.G., Ramirez, F., Leibowitz, D., et al. Changes in restricted human cellular DNA fragments containing globin gene sequences in thalassemias and related disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1222, 1978.
15. Weatherall, D.J., Clegg, J.B., *The Thalassemia Syndromes*, 2nd ed. Oxford Blackwell Scientific Publications 1972, p. 1-374.

16. Teosiri, P., Chaonua, P., Matra-
goon, S., et al. Simple deter-
mination of hemoglobin A₂ for
detection of beta-thalassemia
heterozygote. Bull. Chiang Mai
Ass. Med. Sci. 10:17, 1977.
17. Aviv, H., and Leder, P., Purifi-
cation of biologically active
globin messenger RNA by chroma-
tography on oligothymidyl acid-
cellulose. Proc. Natl. Acad.
Sci. 69 :1408, 1972.
18. Kacian, D.L., Gambino, R., Dow,
L.W., et al. Decreased globin
messenger RNA in thalassemia
detected by molecular hybridiza-
tion. Proc. Natl. Acad. Sci.
70:1886, 1973.
19. Kacian, D.L., Watson, K.F.,
Burny, A., and Spiegelman, S.,
Purification of the DNA polyme-
rase of avian myeloblastosis
virus. Biochim. Biophys. Acta
246:365, 1971.
20. Pritchard, J., Longley, J., Clegg,
D.J., and Weatherall, D.J., Assay
of thalassemic messenger RNA in
the wheat germ system. Brit. J.
Haematol. 32:473, 1976.
21. Forget, B.G., Benz, E.J.JR.,
Skoultchi, A., et al. Absence
of messenger RNA for beta globin
chain in β^0 -thalassemia. Nature
247:379, 1974.
22. Old, J.M., Proudfoot, N.J., Wood,
W.G., et al. Characterization
of β globin mRNA in the β^0 thalas-
semias. Cell 14:289, 1978.
23. Kan, Y.W., Holland, J.P., Dozy,
A.M., and Varmus, H.G., Demon-
stration of non functional β -
globin mRNA in homozygous
 β^0 -thalassemia. Proc. Natl. Acad.
Sci. 72:5140, 1975.
24. Gambino, R., Kacian, D.,
O'Donnell, J., et al. A limited
number of globin genes in human
DNA. Proc. Natl. Acad. Sci.,

- 71:3966, 1974.
25. Taylor, J.M., Dozy, A., Kan, Y.W. et al. Genetic lesion in homozygous alpha thalassemia (hydrops fetalis) *Nature* 251:392, 1974.
26. Tolstoshev, P., Mitchell, J., Lanyon, G., et al. Presence of gene for β globin in homozygous β^0 thalassemia. *Nature* 259:95, 1976.
27. Nathans, D., and Smith, H.O., Restriction endonuclease in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44:273, 1975.
28. Danna, K.J., Nathan, D., Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68:2913, 1971.
29. Ottolenghi, S., Comi, P., Gigliani, B., et al. $\delta\beta$ -thalassemia is due to a gene deletion. *Cell* 9:71, 1976.
30. Ramirez, F., O'Donnell, J.V., Marks, P.A., et al. Abnormal or absent beta mRNA in β^0 Ferrara and gene deletion in delta beta thalassemia *Nature* 263:471, 1976.
31. Comi, P., Gigliani, B., Barbarano, L., et al. Transcriptional and post-transcriptional defects in β^0 thalassemia. *Eur. Biochem.* 79:617, 1977.
32. Chang, J.C., and Kan, Y.W., β^0 thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:2886, 1979.
33. Phillips III, J.A., Vik, T.A., Scott, A.F., et al. Unequal crossing over: A common basis of single globin genes in Asians and American Blacks with Hemoglobin-H Disease. *Blood*: 55:1066, 1980.
34. Kan, Y.W., Dozy A.M., Trecartin, R., Todd, D., Identification of

- a non deletion defect in α -thalassemia. *New Engl. J. Med.* 297:1081, 1977.
35. Embury, S.H., Lebo, R.V., Dozy, A.M., and Kan, Y.W., Organization of the α -globin genes in the Chinese α -thalassemia syndromes. *J. Clin. Invest.* 63:1307, 1979.
 36. Orkin, S.H., Old, J., Lazarus, H., et al. The molecular basis of α -thalassemias: Frequent occurrence of dysfunctional α loci among non-Asian with Hb H disease. *Cell* 17:33, 1979.
 37. Leder, P. Discontinuous genes. *New Engl. J. Med.* 298:1079, 1978.
 38. Wilson, J.T., Forget, B.G., Wilson, L.B., and Weissman, S.M., Human globin messenger RNA: Importance of cloning for structural analysis. *Sci.* 196:200, 1977.
 39. Wilson, J.T., Wilson, L.B., De Tiel, J.K., et al. Insertion of synthetic copies of human globin genes into bacterial plasmids. *Nucl. Acids Res.* 5:563, 1978.
 40. Deisseroth, A., Hendrick, D., Human alpha globin gene expression following chromosomal dependent gene transfer into mouse erythroleukemia cells. *Cell* 15:55, 1978.
 41. Orkin, S.H., Kolookner, R., Michelson, A., and Husson, T., Cloning and direct examination of a structurally abnormal human β o-thalassemia globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3558, 1980.
 42. Deisseroth, A., Bode, U., Lebo, R., et al. Isolation of hybrid cell clones that contain deletion and non-deletion defects of alpha-thalassemia in man. *Blood* 55: 992, 1980.
 43. Kan, Y.W., Golbus, M.S., Trecartin, R., et al. Prenatal diagnosis of homozygous

- β -thalassemia. *Lancet* 2:790, 1975.
44. Alter, B.P., Friedman, S., Hobbins, J.C., et al. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and alpha G-Philadelphia. *New Engl. J. Med.* 294:1040, 1976.
45. Koenig, H.M., Commander (MC) U.S.N., Vedvick, T.S., et al. Prenatal diagnosis of hemoglobin H disease. *J. Ped.* 92:278, 1978.
46. Kan, Y.W., Golbus, M.S., and Dozy, A.M., Prenatal diagnosis of α -thalassemia, clinical application of molecular hybridization. *New Engl. J. Med.* 295: 1165, 1976.
47. Little, P.F.R., Whitelaw, A.G., Williamson, A.R., et al. The detection and use of hemoglobin mutants in the direct analysis of human globin genes. *Blood* 55:1060, 1980.
48. Kan, Y.W., and Dozy, A.M., Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human β -globin structural gene, its relation to the sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:5631, 1978.
49. Nienhuis, A.W., and Stamatoyannopoulos, G., Hemoglobin Switching. *Cell* 15:307, 1978.
50. May, A., The mechanism and prevention of sickling. *Brit. Med. Bull.* 32:223, 1976.