



วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

• เทคนิคการแพทย์ • กายภาพบำบัด • กิจกรรมบำบัด • รังสีเทคนิค

ปีที่ 48 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม 2558

ISSN : 0125-5347

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES



ທຣຽງພຣະເຈົ້າ

Content

- 88** ยีนฮีโมโกลบินอี มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปัจจัยภายในกลุ่มของยีนโกลบินที่เกี่ยวข้องกับระดับฮีโมโกลบินเอฟสูง: กรณีศึกษาในครอบครัว HbE/ β -thalassemia ชาวไทย
Closed relationship of β^E -allele and high HbF associated cis-loci: Case studies in Thai HbE/ β -thalassemia families
ลำปลายมาศ ต่างพันธ์ ฐนุศักดิ์ ตาตุ
Lamplimas Tangpan Thanusak Tatu
- 100** วิธีการแบบเร็วเพื่อแยกชนิดและเตรียมฮีโมโกลบิน A, A₂, E, F, Bart's และ Portland I ปริมาณมาก
Fast preparative separation of human hemoglobins A, A₂, E, F, Bart's and Portland I
คณิศร ภักดีภักดี ศศิวิทย์ เกิดมู ฐนุศักดิ์ ตาตุ
Kanet Pakdeepak Sasiwan Kerdpoor Thanusak Tatu
- 107** ความน่าเชื่อถือของการวัดในผู้ป่วยที่ใช้ประเมินภาวะข้อเข่าเสื่อม
Reliability study of outcome measures in subjects with knee osteoarthritis
พิมพ์ชนก องค์กรสันติภาพ อุบล พิรุณสาร อาทิตย์ พวงมะลิ
Pimchanok Oongsantiphap Upon Pirunsan Aatit Paungmali
- 115** ระดับ soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) สูง แต่ระดับ soluble FasL (sFasL) ต่ำ ในผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการรุนแรง
High plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) but low plasma levels of soluble FasL (sFasL) in patients with severe pandemic H1N1 2009 influenza infection
จินตนา พาวงค์ ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ เอนก มุ่งอ้อมกลาง ประยุทธ์ แก้วมะลิ่ง
Chintana Phawong Triwit Rattanarojpong Anek Mungaomklang Prayuth Kaewmalang
สมคิด คงอยู่ โสภณ เอี่ยมศิริถาวร บุญรัตน์ ทัดนัยไตรเทพ
Somkid Kongyu Sophon Iamsirithaworn Boonrat Tassaneetrithep
- 127** ผลการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์ และความเครียดของเด็กกำพร้า มูลนิธิห่วงใยเด็กกำพร้า จังหวัดเชียงใหม่
The effects of using a guidance activities package to develop life skills for coping with emotion and stress of orphan in the Care Corner Orphanage Foundation, Chiang Mai Province
ยุพาพรรณ ศรีอ้าย สุขอรุณ วงษ์ทิม นิธิพัฒน์ เมฆขจร
Yupapan Siriai Sukaroon Wongtim Nitipat Mekkhachorn
- 136** การตรวจหาจีโนไทป์ของ FY*A, FY*B และ FY*X ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)
Detection of FY*A, FY*B and FY*X genotypes in Duffy blood group system by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)
พูนทรัพย์ ผลาจรศักดิ์ ลักษมี จำรัสศรี พียดา คงเทศน์
Poonsub Palacajornsuk Laksamee Jamrassri Phiyada Kongtes
- 144** ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ภูมิปัญญาชาวบ้าน ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิล เซลล์เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด
Effects of folk wisdom boiled Herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *pandanus amaryllifolius* on neutrophil, red blood cell, and platelet functions
สุภาพร ขำจันทร์ ปาริยา ไบอุบล หนึ่งฤทัย นิลศรี
Supaporn Khamchun Pareeya Baiubol Nungruthai Nilsri
- 154** สนามฝึกทักษะรถนั่งคนพิการ
Wheelchair skill training circuit
ณรงค์รัตน์ สวัสดิทานนท์
Narongrat Sawattikanon





BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

Focus and scope

The Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences (Bull Chiang Mai Assoc Med Sci) is the official peer-reviewed journal of the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. Manuscripts (original articles, general articles, short technical reports, notes, and letter to editor) in areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, Radiologic Technology, and related fields are welcome. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci is published 3 times a year in January, May and September.

The goal of Bull Chiang Mai Assoc Med Sci is to provide a platform for scientists and academicians to promote, share, and discuss various new issues and developments in different areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, and Radiologic Technology.

The final decision on publication of a manuscript rests with the Editorial Board and ultimately with the Editor. All papers, regardless of type, represent the opinion of the authors and not necessarily that of the Editor, the Association of the Publisher.

Objectives

The Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences aims to publish integrating research papers in areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, Radiologic Technology, and related under peer-reviewed process by at least two internal or external reviewers.

Types of manuscript

Manuscripts may be submitted in the form of original articles, general articles, short technical reports, notes, or letters to editor where, as an approximate guide to length:

- Review articles would not normally exceed 20 journal pages of printed text, inclusive of tables, figures, and references.
- Original articles would not normally exceed 15 journal pages, similarly all-inclusive.
- Short communications including technical reports, notes, and letter to editor would not normally exceed 5 journal pages.

Peer review process

All manuscripts must be peer-reviewed by at least 2 internal or external reviewers in the areas of Medical Technology, Physical Therapy, Occupational Therapy, Radiologic Technology, and related.

Publication frequency

The Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences publishes 3 times a year

Volume 1: January-April

Volume 2: May-August

Volume 3: September-December

Editor

Associate Professor Dr. Preeyanat Vongchan

Associate Editor

Associate Professor Dr. Tanusak Tatu

Editorial Board

Associate Professor Dr. Preeyanat Vongchan

Associate Professor Dr. Tanusak Tatu

Professor Dr. Chatchai Tayapiwatana

Associate Prof. Dr. Suchart Kothan

Assistant Prof. Dr. Supaporn Chinchai

Dr. Araya Yanakai

Professor Dr. Suthat Fucharoen, M.D.

Professor Dr. Kesara Na Bangchang

Associate Prof. Dr. Supan Fucharoen

Associate Prof. Dr. Ganjana Lertmemongkolchai

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Chiang Mai University

Mahidol University

Thammasart University

Khon Kaen University

Khon Kaen University

Professor Dr. Navapun Charuruks, M.D.
Tusane Sakuldamrongpanich
Somchai Jeadsermanant
Associate Prof. Dr. Roongtiwa Vachalathiti
Assistant Prof. Dr. Wattana Jalayondeja
Assistant Prof. Dr. Raweevan Leksakulchai
Dr. Supalak Khemthong
Associate Prof. Therdchai Jivacate, M.D.

Assistant Prof. Dr. Prawit Janwantanakul
Assistant Prof. Dr. Rotsalai Kanlayanaphotporn
Assistant Prof. Dr. Kanda Chaipinyo
Assistant Prof. Dr. Rumpa Boonsinsukh
Associate Prof. Dr. Vinit Ungpinitpong
Assistant Prof. Dr. Yodchai Boonprakob
Associate Prof. Dr. Somchai Rattanathongkom
Assistant Prof. Dr. Pornratchanee Weerapong
Pornsawan Posawang

Assistant Prof. Nantaya Udompanich
Professor Eimorn Mairiang, M.D.
Professor Eimorn Mairiang, M.D.
Associate Prof. Dr. Rujaporn Chanachai
Associate Prof. Dr. Jiraporn Tocharoenchai

Business manager

Mrs. Jariya Garthong

Treasurer

Mrs. Angsumalee Srithiruen

Registra Staff

Mr. Thanakorn Karnluksanee
Mr. Manut Manokhum

Webpage Administrative Staff

Mr. Nopporn Phuangsombat
Mr. Anurak Bunpun
Mr. Tapapol Comnoi

Editorial Office

**Faculty of Associated Medical Sciences,
Chiang Mai University**
110 Inthawaroros Road, Suthep, Muang,
Chiang Mai, 50200
Phone 053 945072 Facsimile 053 946042

Bumrungrad International Hospital
Thai Red Cross
Charoenkrungpracharak Hospital
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University
Mahidol University
Prostheses Foundation of H.R.H The Princess
Mother
Chulalongkorn University
Chulalongkorn University
Srinakharinwirot University
Srinakharinwirot University
Khon Kaen University
Khon Kaen University
Khon Kaen University
Huachiew Chalermprakiat University
Sirindhorn National Medical Rehabilitation
Center
Khon Kaen University
Khon Kaen University
Mahidol University
Faculty of Medicine Siriraj Hospital
Mahidol University

Journal website

Homepage [http://: www.ams.cmu.ac.th/journal](http://www.ams.cmu.ac.th/journal)

Journal ISSN:

0125-5347

Journal Impact Factor

Thai Journal Citation Index Center (TCI) 2013 is 0.044

Disclaimer

Personal views expressed by the contributors in their articles are not necessarily those of the Bulletin Chiang Mai Associate Medical Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.



วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

ความมุ่งมั่นและขอบเขตของวารสาร

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่เป็นวารสารวิชาการดำเนินงานโดยคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เผยแพร่บทความที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิคและสาขาวิชาอื่นที่เกี่ยวข้อง เพื่อเป็นเวทีนำเสนอและแบ่งปันองค์ความรู้ทางวิชาการสำหรับนักวิจัย นักวิชาการ และนักวิชาชีพ ประกอบด้วย บทความทั่วไป บทความปริทัศน์ นิพนธ์ต้นฉบับ และ จัดหมายถึงบรรณาธิการ บทความทุกบทจะได้รับการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิที่เชี่ยวชาญในสาขาวิชานั้นจากภายในหรือภายนอก อย่างน้อย 2 คน วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ตีพิมพ์เผยแพร่ ปีละ 3 ฉบับ ใน เดือนมกราคม พฤษภาคม และกันยายน

วัตถุประสงค์

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่เป็นวารสารที่จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย ความรู้และความก้าวหน้าทางวิชาการที่มีคุณภาพในด้านเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิคและสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ด้วยระบบการตรวจประเมินคุณภาพบทความทางวิชาการจากผู้ทรงคุณวุฒิภายในหรือภายนอกที่มีความเชี่ยวชาญในสาขาวิชานั้น

ชนิดของบทความ

บทความทางวิชาการที่เกี่ยวข้องในสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิค และสาขาวิชาที่เกี่ยวข้องในลักษณะต่างๆ ได้แก่ นิพนธ์ต้นฉบับ บทความทั่วไป รายงานเทคนิคและบันทึกสั้น รวมถึงจัดหมายถึงบรรณาธิการ โดยจำกัดความยาวดังนี้

- บทความทั่วไป ความยาวไม่เกิน 20 หน้าพิมพ์ รวมเนื้อความ ตาราง รูปประกอบและเอกสารอ้างอิง
- นิพนธ์ต้นฉบับ ความยาวไม่เกิน 15 หน้าพิมพ์ รวมเนื้อความ ตาราง รูปประกอบและเอกสารอ้างอิง
- รายงานเทคนิค บันทึกสั้นและจัดหมายถึงบรรณาธิการ ความยาวไม่เกิน 5 หน้าพิมพ์

การพิจารณาบทความ

บทความที่ขอรับการพิจารณากับวารสารเทคนิคการแพทย์ ต้องได้รับการประเมินและพิจารณาเนื้อหาทางวิชาการจากผู้ทรงคุณวุฒิอย่างน้อย 2 คนที่เห็นพ้อง โดยเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายในหรือภายนอกที่เชี่ยวชาญในสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด รังสีเทคนิค และสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

กำหนดการตีพิมพ์

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ มีกำหนดการตีพิมพ์ 4 เดือนต่อ 1 ฉบับ ทั้งหมด 3 ฉบับต่อปี ดังนี้

ฉบับที่ 1 มกราคม-เมษายน

ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม

ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม

บรรณาธิการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์

รองบรรณาธิการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ธนศักดิ์ ตาตุ

กองบรรณาธิการ

รศ.ดร.ปรียานาถ วงศ์จันทร์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ.ดร.ธนศักดิ์ ตาตุ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ.ดร.ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รศ.ดร.สุชาติ โกทัญญ์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ.ดร.สุภาพร ชินชัย	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อ.ดร.อารยา ญาณกาย	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ศ.ดร.นพ.สุทัศน์ ฟูเจริญ	มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ.ดร.เกศรา ณ บางช้าง	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

รศ.ดร.สุพรรณ พุทธิชัย
รศ.ดร.กาญจนา เลิศมิ่งมงคลชัย
ศ.พญ.นพพรณ จารุรักษ์
คุณทัศนีย์ สกกุลดำรงค์พานิช
คุณสมชัย เจ็ดเสริมอนันต์
รศ.ดร.รุ่งทิพา วัฒนละอิตติ
ผศ.ดร.วรรณะ ชลาชนนเดชะ
ผศ.ดร.ระวีวรรณ เล็กสกุลไชย
อ.ดร.ศุภลักษณ์ เข้มทอง
รศ.นพ.เทอดชัย ชิวเกตุ
รศ.ดร.ประวีตร เจนวรรณะกุล
ผศ.ดร.รสลัย กัลยาณพจน์พร
ผศ.ดร.กานดา ชัยภิญโญ
ผศ.ดร.รัมภา บุญสินสุข
รศ.ดร.วินิจ อึ้งพินิจพงษ์
ผศ.ดร.ยอดชาย บุญประกอบ
รศ.ดร.สมชาย รัตนทองคำ
ผศ.ดร.พรวิชัย วีระพงษ์
คุณพรสวรรค์ โพธิ์สว่าง
ผศ.นันทยา อุดมพานิชย์
ศ.พญ.เอมอร ไม้เรียง
รศ.พญ.จิราภรณ์ เหล่าธรรมทัศน์
รศ.ดร.รุจพร ชนะชัย
รศ.ดร.จิราภรณ์ โตเจริญชัย

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รพ.บำรุงราษฎร์
สภาอากาศไทย
รพ.เจริญกรุงประชารักษ์
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล
มูลนิธิรักษาเทียมในสมเด็จพระศรีนครินทร์บรมราชชนนี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ศูนย์ฟื้นฟูสมรรถภาพแห่งชาติ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยมหิดล
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้จัดทำ

นางจริยา กาทอง

Journal Impact Factor

อ้างอิงศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (ประจำปี 2556) 0.044

ฝ่ายบัญชีและการเงิน

นางอัมมมาลี ศรีทริเรือน

ฝ่ายศิลปกรรม

รูปพล คำน้อย

ฝ่ายทะเบียน

นายธนกร การลักษณะณี
นายมะนัด มะโนคำ

เว็บไซต์ของวารสาร

Homepage [http://: www.ams.cmu.ac.th/journal](http://www.ams.cmu.ac.th/journal)

สารสนเทศ

นายณพพร พวงสมบัติ
นายอนุรักษ์ บุญปิ่น
นายรูปพล คำน้อย

รหัสวารสาร

0125-5347

ดำเนินการจัดทำโดย

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เลขที่ 110 ถนนอินทวิโรด ตำบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
50200
โทรศัพท์ 053 945072 โทรสาร 053 946042

การรับผิดชอบบทความ

ข้อมูล วรรณกรรม และข้อความใดๆ ที่ปรากฏในวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เป็นของผู้เขียน หรือเจ้าของต้นฉบับเดิมโดยเฉพาะ
วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไม่จำเป็นต้องเห็นพ้องด้วย

บทบรรณาธิการ

สวัสดีทุกท่านอีกครั้ง พบกันในฉบับพฤษภาคม 2558 เดือนที่ร้อนอบอ้าวมากในทุกภาคของประเทศไทย แม้จะมีพายุในหลายจังหวัด แต่ก็ไม่ได้ช่วยบรรเทาความร้อนได้เลย หลายท่านมีโอกาสดำรงชีพผ่าน พายุทอร์นาโดและพายุไต้ฝุ่น ไปเที่ยวต่างประเทศ เทียวทะเล เพื่อผ่อนคลาย นับเป็นสิ่งดีค่ะ นอกจากพักผ่อนแล้วยังเป็นการเสริมความรักความผูกพันในครอบครัวด้วย

เหตุการณ์แผ่นดินไหวอย่างรุนแรงในเมืองกาฐมาณฑุ ประเทศเนปาล สร้างความตระหนกแก่ทุกประเทศทั่วโลก นอกจากความเสียหายในชีวิตและทรัพย์สินของประชาชนแล้ว สิ่งที่สำคัญและน่าเสียดายที่สุดคือสถาปัตยกรรมเก่าแก่ และทรงคุณค่าทางประวัติศาสตร์ของโลกต้องสูญหายไปด้วย ปรากฏการณ์และภัยธรรมชาติที่เกิดขึ้นและสร้างความเสียหายแก่พื้นที่ต่างๆ เป็นระยะๆ เป็นเครื่องเตือนเรามาโดยตลอดว่าธรรมชาติยิ่งใหญ่และไม่สามารถฝืนได้เลย เราควรระมัดระวังและเตือนตนเองว่าให้ปรับวิถีการใช้ชีวิตของเราอย่างสอดคล้องกับธรรมชาติ อยู่ให้ได้อย่างไม่รบกวนและทำลาย เพื่อคงแผ่นดินอุดมสมบูรณ์ให้ลูกหลานในวันข้างหน้า

ฉบับนี้ยังคงมีเรื่องที่น่าสนใจมากทั้งด้านเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด การวิจัยจากงานประจำที่ช่วยพัฒนาวิธีการและช่วยแก้ไขปัญหาจากงานประจำวัน เรียนเชิญทุกท่านนะคะ สามารถสร้างงานวิจัยจากงานปฏิบัติประจำวันและส่งบทความเพื่อเผยแพร่ในวารสารได้ในช่องทางออนไลน์ที่ www.ams.cmu.ac.th/journal บทความจะได้รับการพิจารณาและประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาตามนโยบายด้านวิชาการของวารสาร ทั้งนี้ กองบรรณาธิการพร้อมให้คำแนะนำและช่วยเหลือ สามารถติดต่อสอบถามบรรณาธิการได้ทางอีเมลที่ปรากฏในเว็บไซต์

พบกันฉบับหน้าเดือนกันยายน 2558 ค่ะ

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์
บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

ยีนฮีโมโกลบินอี มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปัจจัยภายในกลุ่ม ของยีนโกลบินที่เกี่ยวข้องกับระดับฮีโมโกลบินเอฟสูง: กรณีศึกษาในครอบครัว HbE/ β -thalassemia ชาวไทย

Closed relationship of β^E -allele and high HbF associated cis-loci : Case studies in Thai HbE/ β -thalassemia families

■ ลำปลายมาศ ต่างพันธ์
Lamplimas Tangpan

ธนูศักดิ์ ตาตุ*
Thanusak Tatu*

แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

* Corresponding author (Email: tthanu@hotmail.com)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Introduction: Previous statistical analyses have demonstrated linkage disequilibrium of β^E -allele and surrounding *in-cis* sequences.

Objective: To confirm the linkage disequilibrium of β^E -allele and surrounding *in-cis* sequences.

Materials and Methods: Associations of the β^E -allele with the β -globin haplotype, (AT)_xN_z(AT)_y motif of β LCR-HS2, XmnI- $\alpha\gamma$ polymorphism, pre- $\alpha\gamma$ framework, (TG)_n motif in IVSII of $\alpha\gamma$ -globin gene and HBBP1 : rs2071348 polymorphism were analyzed in three Thai HbE/ β^0 -thalassemia families.

Results: The β^E -allele was always *in-cis* with the β -globin haplotype III, pre $\alpha\gamma$ -framework 2, XmnI+, (TG)₁₃ motif within IVSII of $\alpha\gamma$ -globin gene and "C" at HBBP1 : rs2071348 locus, all previously shown to be associated with high HbF expression. Combination of the (AT)₉N₁₂(AT)₁₀ motif of β LCR-HS2 and these *cis*-acting factors seemed to be required for maximum HbF-expression.

Conclusion: This family study substantially confirmed the linkage between the β^E allele and *cis*-acting loci associated with high HbF phenotype. This study also highlighted the closed relationship between HbE and HbF as well as the need of combination of the analyzed *cis*-acting sequences in activating HbF expression in human.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 88-99. Doi: 10.14456/jams.2015.14

Keywords: HbE/ β^0 -thalassemia, HbF, β -globin haplotype, β -globin mutations, *cis*-acting loci

บทคัดย่อ

บทนำ: การวิเคราะห์ทางสถิติก่อนหน้านี้พบความเกี่ยวพันของ β^E -allele กับดีเอ็นเอบริเวณรอบๆ

วัตถุประสงค์: เพื่อแสดงหลักฐานเชิงประจักษ์ยืนยันความเกี่ยวพันของ β^E -allele กับดีเอ็นเอบริเวณรอบๆ

วัสดุและวิธีการ: ทำการศึกษาความเกี่ยวพันของ β^E -allele และ β -globin cluster haplotype, $(AT)_x N_z (AT)_y$ motif บน β LCR-HS2, *XmnI*- γ polymorphism, pre- γ framework, (TG) $_n$ motif ใน IVSII บน γ -globin gene และ *HBBP1* : rs2071348 polymorphism ในครอบครัวผู้ป่วยชาวไทยโรค HbE/ β^0 -thalassemia จำนวน 3 ครอบครัว

ผลการศึกษา: β^E -allele มักอยู่บนโครโมโซมข้างเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของลำดับดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับระดับฮีโมโกลบินเอฟที่สูงขึ้นซึ่งประกอบด้วย β -globin haplotype III, pre γ -framework 2, *XmnI* บวก, (TG) $_{13}$ motif ใน IVSII บน γ -globin gene และเบส “C” ตำแหน่ง rs2071348 บนยีน *HBBP1* และพบว่าการอยู่ร่วมกันของ $(AT)_9 N_{12} (AT)_{10}$ motif บน β LCR-HS2 และ *cis*-acting factors ที่กล่าวข้างต้นพบมีความจำเป็นในการสร้างฮีโมโกลบินเอฟที่สูงขึ้น

สรุปผลการศึกษา: การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถยืนยันอย่างเป็นรูปธรรมความเกี่ยวพันของ β^E allele และดีเอ็นเอบริเวณรอบๆ ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณฮีโมโกลบินเอฟที่เพิ่มมากขึ้น และนอกจากนั้นการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดของ HbE และ HbF อีกทั้งยังแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของดีเอ็นเอบริเวณรอบๆ เหล่านี้ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ HbF ในมนุษย์

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 88-99. Doi: 10.14456/jams.2015.14

คำสำคัญ: HbE/ β^0 -thalassemia, HbF, β -globin haplotype, β -globin mutations, *cis*-acting loci

Introduction

HbE ($\alpha_2\beta^E_2$) is abnormal hemoglobin arising from an assembly of mutated β^E (A-G at codon 26 altering glutamic to lysine) and normal α -globin chains. This hemoglobin variant is common in Southeast Asia, attaining a frequency of about 60% among the population of Thailand, Laos and Cambodia.^{1,2} The β^E -mRNA was shown to be ineffectively synthesized owing to competitive utilization of an alternative splice site at codon 25³ and the silencing effect of the $(AT)_9 T_5$ motif in the β -globin promoter.⁴ The reduction of β^E -mRNA leads to a reduced β^E -globin chain, which results in the β^+ -thalassemia phenotype. Thus, compound heterozygote of the β^E -globin and β -thalassemia alleles leads to a syndrome referred to as HbE/ β -thalassemia.¹

Phenotypically, HbE/ β -thalassemia presents in a broad range of clinical symptoms, ranging from transfusion-dependent β -thalassemia major to a mild form of β -thalassemia intermedia requiring only occasional blood transfusion.^{2,5} Several factors have been shown to be responsible for this clinical heterogeneity, including

types of the counterpart β -thalassemia alleles, co-existence of α -thalassemia and co-inheritance of high HbF genetic variants.⁵ The *XmnI*- γ site, a “T” substitution for “C” at nucleotide -158 in γ promoter, was shown to be a major *cis*-acting genetic factor associated with increased HbF.⁶⁻⁹ Recent statistical analyses in Thai HbE carriers, HbE homozygotes and HbE/ β -thalassemia revealed association of the *XmnI*- γ site and other surrounding *cis*-acting loci with β^E -allele.^{8,10,11}

In this study, we attempted to confirm these previous findings by conducting family studies to determine associations of β^E -allele and *cis* sequence variations, including the *XmnI*- γ polymorphism, β -globin haplotypes, $(AT)_x N_z (AT)_y$ motif of β LCR-HS2, pre- γ framework (PG γ F), (TG) $_n$ motif in IVSII of γ -globin gene and *HBBP1* : rs2071348 single nucleotide polymorphism. The information obtained from this study should confirm the previous linkage disequilibrium analyses and provide evidence of the close relationship between HbE and HbF.

Subjects

This study was approved by the research ethics board of Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University (Approval notice 205/2012). Three northern Thai families, each having one HbE/ β^0 -thalassemia member, were recruited. EDTA blood samples were collected. Hb typing was performed by cation exchange HPLC (The Primus Variant System 99, Kansas City, MO, USA). The β -thalassemia mutations in the first and second families were identified by multiplex allele-specific PCR¹² and that in the third family by automated fluorescent nucleotide sequencing.¹³ Based on the results of Hb typing and β -globin genotyping, all volunteers were diagnosed. The first family had four members: HbE/ $\beta^{41/42(-TTCT)}$ -thalassemia proband, HbE-heterozygous father, β -thalassemia heterozygous mother and HbE-heterozygous brother. The second family had four members: HbE/ $\beta^{17(A-T)}$ -thalassemia proband, HbE-heterozygous mother, HbE-heterozygous brother and β -thalassemia heterozygous father. The third family had four members: HbE/ $\beta^{IVS1-nt1(G-T)}$ -thalassemia proband, HbE/ $\beta^{IVS1-nt1(G-T)}$ -thalassemia sister, HbE heterozygous father and β -thalassemia heterozygous mother.

Molecular analysis

Genomic DNA was prepared from leukocytes by the direct Chelex extraction method.¹⁴ The *XmnI*- γ polymorphism was determined by *XmnI* digestion of PCR products covering the position -158 on γ -promoter, following the procedure described previously.¹⁵ Determination of A/C polymorphism of *HBBP1*: *rs2071348* was performed by the tetra-primer ARMS-PCR, established previously in our laboratory.¹⁵ The RFLP haplotypes (*HindIII*- ϵ , *HindIII*- γ , *HindIII*- δ , *HindIII*-5' $\psi\beta$, *HindIII*-3' $\psi\beta$, *Avall*- β and *Hinfl*- β) were generated following the procedure described previously.^{16,17} Sanger's direct nucleotide sequencing was employed to genotype the (AT)_xN_z(AT)_y motif of β LCR-HS2, PG γ F, (TG)n motif in IVSII of γ -globin gene.¹⁸⁻²⁰

Association of β^E -allele and sequence variations on β -globin gene cluster

Five β -globin haplotypes (*HindIII*- ϵ , *HindIII*- γ , *HindIII*- δ , *HindIII*-5' $\psi\beta$, *HindIII*-3' $\psi\beta$, *Avall*- β and *Hinfl*- β) were observed in these three families, including haplotypes I (+ - - - - ++), III (- + - + + -), V (+ - - - - + -), VI (- + + - - +) and VII (+ - - - - +) (Table 1). β^E -allele was *in-cis* with only haplotype III.

Five (AT)_xN_z(AT)_y motifs of β LCR-HS2 were found. These included (AT)₉N₁₂(AT)₁₀, (AT)₁₀N₁₂(AT)₁₀, (AT)₁₁N₁₂(AT)₁₀, (AT)₈N₁₂(AT)₁₁ and (AT)₉N₁₂(AT)₁₁ (Figure 1 and Table 1). The β^E allele was predominately *in-cis* with the (AT)₉N₁₂(AT)₁₀ motif.

According to Pissard & Beuzard, the combination of SNPs at positions -1450, -1280 and -1225 related to γ -globin gene cap site formed three pre- γ frameworks (PG γ F).(21) These included PG γ F1 (TGA), PG γ F2 (TAG) and PG γ F4 (TGG). Interestingly, combinations of SNPs at positions -1067, -807, -369 and -309 formed two sub-PG γ Fs (TCCA and AACA) and were shown to be PG γ F-specific. The "TCCA" was specific to PG γ F 2, whereas the "AACA" was always *in-cis* to the PG γ Fs 1, 4. The β^E -allele was *in-cis* with only PG γ F2 (Table 1).

The *XmnI*+ and *XmnI*- sites were equally distributed in these three families. The $\beta^{17(A-T)}$, $\beta^{41/42(-TTCT)}$ and $\beta^{IVS1-nt1(G-T)}$ were *in-cis* with the *XmnI*- site. The β^A -allele was *in-cis* with both the *XmnI*+ and *XmnI*- sites. However, the β^E -allele was *in-cis* with only the *XmnI*+ site (Table 1).

Two (TG)n motifs within IVS2 of γ -globin gene were observed, including (TG)₁₃ and (TG)₉(CG)₅(TG)₈ motifs (Figure 2). Combination of single nucleotide polymorphisms (SNPs) loci *rs 2187608*, *rs 28379094*, *rs 28440105* and *rs 3841756* formed three sub-haplotypes within this region, including "GGGA", "CAGA" and "CAG delA". The (TG)₁₃ motif was *in-cis* with only the "GGGA" sub-haplotype. The (TG)₉(CG)₅(TG)₈ motif was *in-cis* with either the "CAGA" or "CAG delA" sub-haplotypes. The β^E -allele was *in-cis* with only the (TG)₁₃ motif within this region (Figure 2 and Table 1).

In cases of A-C polymorphism of the *HBBP1:rs 2071348* locus, the polymorphic “C” allele was less frequent

than wild type “A” allele. However, the β^E -allele was *in-cis* with only the polymorphic “C” allele (Table 1).

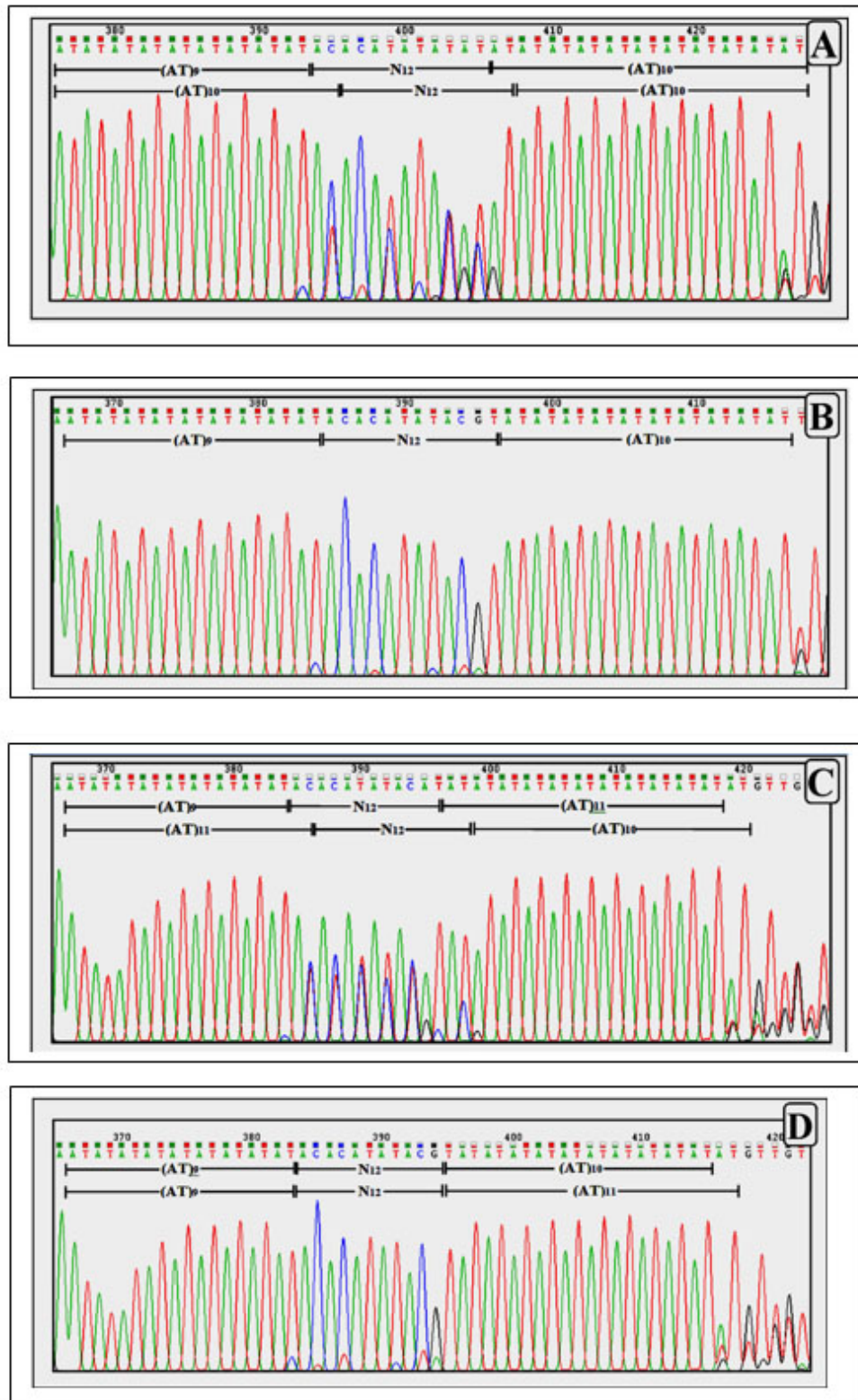


Figure 1 Electropherograms of the (AT) x N z (AT) y motif of β LCR-HS2. Boundary of (AT) x , N z and (AT) y repeats are shown as the lines above peaks within each electropherogram.

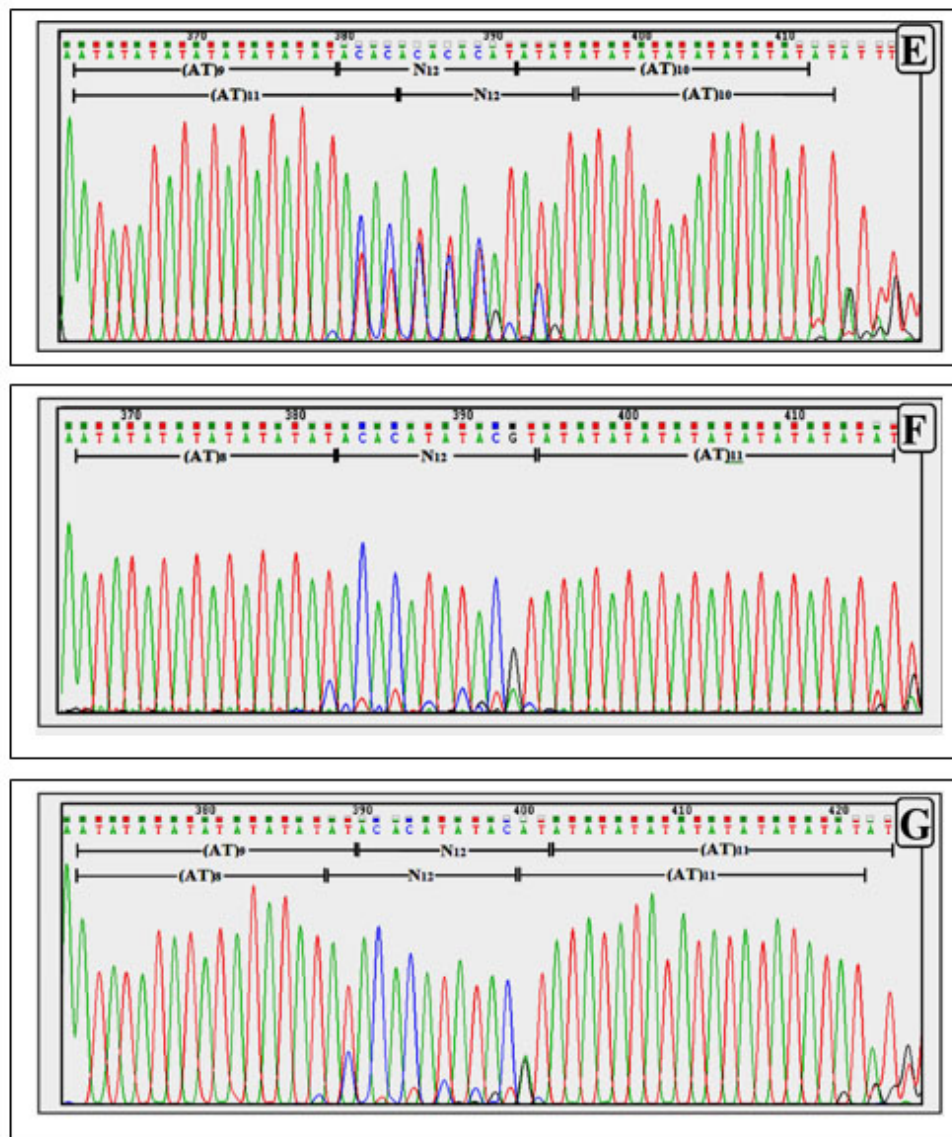


Figure 1 Electropherograms of the (AT)_xN_z(AT)_y motif of β LCR-HS2. Boundary of (AT)_x, N_z and (AT)_y repeats are shown as the lines above peaks within each electropherogram. (continued)

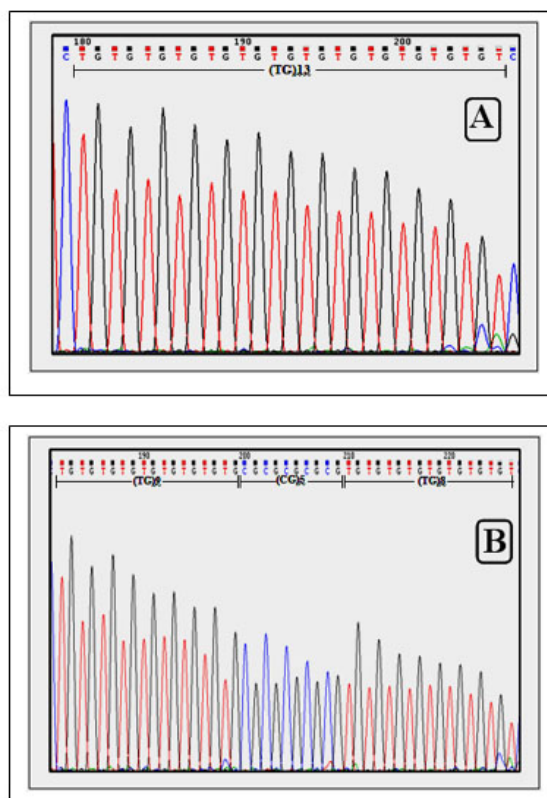


Figure 2 (TG)*n* motif within IVS2 of A_{γ} -globin gene. A, B are the (TG)₁₃/(TG)₁₃ and (TG)₉(CG)₅(TG)₈/(TG)₉(CG)₅(TG)₈, respectively.

Table 1. β -globin haplotypes and sequence variations of β -globin cluster in three Thai HbE/ β^0 -thalassemia families.

Family I	(AT)xNz(AT)y	β -haplotypes	Hind II	Pst I	F	-1067	-807	-369	-309	-158	Hind III	Hind III	rs2071348	Hind II	Hind II	β^E	Ava II	Hinf I
I-I	9-12-10	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+		β^E	+	-
	10-12-10	VI	-	2	T	C	C	A	+	+	+	A	-	-		β^A	-	+
I-II	10-12-10	VII	+	1	A	A	C	A	-	-	-	A	-	-		$\beta^{41/42}$	-	+
	9-12-10	V	+	1	A	A	C	A	-	-	-	A	-	-		β^A	+	-
II-I*	10-12-10	VII	+	1	A	A	C	A	-	-	-	A	-	-		$\beta^{41/42}$	-	+
	9-12-10	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+		β^E	+	-
II-II	9-12-10	V	+	1	A	A	C	A	-	-	-	A	-	-		β^A	+	-
	10-12-10	VI	-	2	T	C	C	A	+	+	+	A	-	-		β^A	-	+

Family I	(TG)n	rs2187608(C>G)	rs28379094(G>A)	rs28440105(T>G)	rs3841756(delA)
I-I	(TG)13	G	G	G	A
	(TG)13	G	G	G	A
I-II	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
II-I*	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)13	G	G	G	A
II-II	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)13	G	G	G	A

(AT)xNz(AT)y is the repeat motif of β LCR-HS2. β -haplotypes are the RFLP-haplotypes of β -thalassemia chromosome. PG γ /F stands for G_{γ} framework. rs2071348 is the SNP (C/A) in *HBBP1* locus. Numbers preceded by the minus symbol indicate locations of SNPs in promoter region of G_{γ} -globin gene. "-158" is the *XmnI*- G_{γ} site. "+" indicates presence of cutting sites and "-" indicates absence of cutting sites for the restriction enzymes.

Table 1. β -globin haplotypes and sequence variations of β -globin cluster in three Thai HbE/ β^0 -thalassemia families.
(continued)

The diagram shows the beta-globin gene cluster with the following components from left to right: β -LCR, HS2, ϵ , γ (G and A), $\psi\beta$, δ , and β . Restriction sites for *Hind* II, *Hind* III, *Pst* I, *F*, *Ava* II, and *Hinf* I are indicated by arrows. The table below summarizes the polymorphisms for Family II.

Family II	(AT)xNz(AT)y	β -haplotypes	<i>Hind</i> II	<i>Pst</i> I	<i>F</i>	-1067	-807	-369	-309	-158	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	rs2071348	<i>Hind</i> II	<i>Hind</i> II	β^{mutant}	<i>Ava</i> II	<i>Hinf</i> I
I-I	11-12-10	VII	+	1	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	β^{17}	-	+
	9-12-11	I	+	1	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	β^A	+	+
I-II	9-12-10	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+	-	β^A	+	-
	9-12-10	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+	-	β^E	+	-
II-I	9-12-11	I	+	1	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	β^A	+	+
	9-12-10	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+	-	β^E	+	-
II-II*	11-12-10	VII	+	1	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	β^{17}	-	+
	9-12-10	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+	-	β^E	+	-

Family II	(TG)n	rs2187608(C>G)	rs28379094(G>A)	rs28440105(T>G)	rs3841756(delA)
I-I	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
I-II	(TG)13	G	G	G	A
	(TG)13	G	G	G	delA
II-I	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)13	G	G	G	delA
II-II*	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)13	G	G	G	delA

The diagram shows the beta-globin gene cluster with the following components from left to right: β -LCR, HS2, ϵ , γ (G and A), $\psi\beta$, δ , and β . Restriction sites for *Hind* II, *Hind* III, *Pst* I, *F*, *Ava* II, and *Hinf* I are indicated by arrows. The table below summarizes the polymorphisms for Family III.

Family III	(AT)xNz(AT)y	β -haplotypes	<i>Hind</i> II	<i>Pst</i> I	<i>F</i>	-1067	-807	-369	-309	-158	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	rs2071348	<i>Hind</i> II	<i>Hind</i> II	β^{mutant}	<i>Ava</i> II	<i>Hinf</i> I
I-I	8-12-11	I	+	4	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	β^A	+	+
	8-12-11	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+	-	β^E	+	-
I-II	8-12-11	VII	+	1	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	β^A	-	+
	9-12-11	I	+	1	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	$\beta^{\text{IVS1-1}}$	+	+
II-II*	8-12-11	III	-	2	T	C	C	A	+	+	-	C	+	+	-	β^E	+	-
	9-12-11	I	+	1	A	A	C	A	-	-	-	-	A	-	-	$\beta^{\text{IVS1-1}}$	+	+

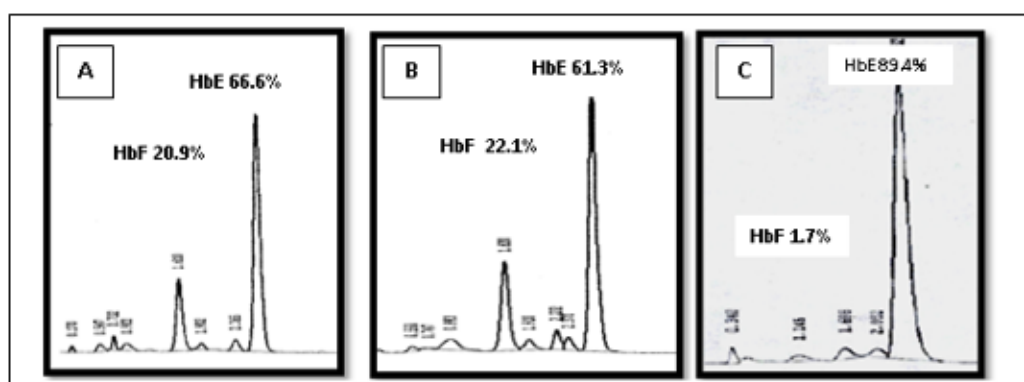
Family III	TG repeated	rs2187608(C>G)	rs28379094(G>A)	rs28440105(T>G)	rs3841756(delA)
I-I	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)13	G	G	G	A
I-II	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	A
	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	delA
II-II*	(TG)13	G	G	G	A
	(TG)9(CG)5(TG)8	C	A	G	delA

(AT)xNz(AT)y is the repeat motif of β LCR-HS2. β -haplotypes are the RFLP-haplotypes of β -thalassemia chromosome. PGI/F stands for $\alpha\gamma$ framework. rs2071348 is the SNP (C/A) in HBBP1 locus. Numbers preceded by the minus symbol indicate locations of SNPs in promoter region of $\alpha\gamma$ -globin gene. "-158" is the XmnI- $\alpha\gamma$ site. "+" indicates presence of cutting sites and "-" indicates absence of cutting sites for the restriction enzymes.

Extended β -globin haplotypes and HbF synthesis in Thai HbE/ β^0 -thalassemia

Extended haplotypes of the β -globin gene cluster in three HbE/ β -thalassemia; two with Hbs EF and another with Hb EE, were analyzed and compared. The first patient (II-I in family I, as shown in Table 1 and A in Figure 3), with 66.6% HbE and 20.9% HbF, was compound heterozygous for β^E and $\beta^{41/42(-TTCT)}$ alleles. The second patient (II-II in family II, as shown in Table 1 and B in Figure 3), with 61.3% HbE, 22.1% HbF, was compound heterozygote for β^E and $\beta^{17(A-T)}$. The third patient (II-II in

family III, as shown in Table 1 and C in Figure 3), with 1.7% HbF and 89.4% HbE, was heterozygous for β^E and $\beta^{IVS1-nt1(G-T)}$ (Figure 3). As shown in Figure 3, the β^E -allele in the two patients ("A" and "B") with high HbF levels was *in-cis* with the $(AT)_9N_{12}(AT)_{10}$, haplotype III, $PG\gamma F_2$, $(TG)_{13}$ and "C" at the *HBBP1: rs 2071348* locus. In contrast, the β^E -allele in the patient ("C") with a lower HbF level than patients "A", "B" was also *in-cis* with haplotype III, $PG\gamma F_2$, $(TG)_{13}$ and "C" at the *HBBP1: rs 2071348* locus. However, the $(AT)xNz(AT)y$ motif of the β LCR-HS2 in patient "C" was $(AT)_8N_{12}(AT)_{11}$.



	β - alleles	(AT)xNz(AT)y	β - haplo	$PG\gamma F$	$XmnI$ - γ	γ IVS2-(TG)n	<i>HBBP1</i> <i>rs2071348</i>
A	β^E	9-12-10	III	2	C	$(TG)_{13}$	C
	$\beta^{41/42}$	9-12-10	VII	1	T	$(TG)_9(CG)_5(TG)_8$	A
B	β^E	9-12-10	III	2	C	$(TG)_{13}$	C
	β^{17}	11-12-10	VII	1	T	$(TG)_9(CG)_5(TG)_8$	A
C	β^E	8-12-11	III	2	C	$(TG)_{13}$	C
	$\beta^{IVS1nt1}$	9-12-11	I	1	T	$(TG)_9(CG)_5(TG)_8$	A

Figure 3 Hb typing by HPLC (top panel) and cis-acting sequence variations (lower panel) in HbE/ β^0 -thalassemia patients "A", "B" and "C" as mentioned in the text. β^{17} represents $\beta^{17(A-T)}$, $\beta^{41/42}$ represents $\beta^{41/42(-TTCT)}$, $\beta^{IVS1nt1}$ represents $\beta^{IVS1-nt1(G-T)}$, β -haplo represents β -haplotypes and $PG\gamma F$ represents pre- γ framework.

Discussion

The β^E -allele mutates from the normal β^A -allele by missense mutation of codon 26 of the β -globin gene, altering the codon for glutamic acid to that for lysine.¹ This mutation is common in Southeast Asia.^{22,23} This high incidence was shown to be due to natural selection against malaria, particularly *Plasmodium falciparum*.²⁴⁻²⁶

Recent pairwise LD analyses in Thai HbE/ β^O -thalassemia by Ma *et al*⁸ and in Thai homozygous HbE (EE), heterozygous HbE (AE) and normal (A_2A) individuals by Ohashi *et al*¹⁰ indicated significant linkage disequilibrium of the β^E -allele and surrounding *in-cis* sequence variations. These studies assumed that malarial selection was involved. The family studies undertaken in this study found that the β^E -allele was always *in-cis* with the $(AT)_9N_{12}(AT)_{10}$ motif, β -globin haplotype III, PG γ F 2, $(TG)_{13}$ motif within IVS2 of $A\gamma$ -globin gene, *XmnI*+ and “C” allele of *HBBP1* : *rs2071348*, confirming those previous statistical assumptions. Interestingly, all of these *in-cis* sequence variations have been shown to be associated with increased HbF expression.^{15,21,27-35} Hence, closed relation between HbE and *cis*-acting genetic factors associated with increased HbF expression observed in this study was most likely a result of positive selection against malaria, which is endemic in Thailand. Red blood cells containing Hbs E and F retarded the growth of *P. falciparum*, probably due to increased oxidative stress.^{36,37} Thus, individuals inheriting both HbE and HbF-activating loci are likely to survive malarial infection.

Analysis in 3 HbE/ β -thalassemia patients having typical EF (“A”, “B” in Figure 3) and atypical EE (“C” in Figure 3) phenotypes highlighted the importance of combination of the $(AT)_9N_{12}(AT)_{10}$ motif, β -globin haplotype III, PG γ F 2, $(TG)_{13}$ motif within IVS2 of $A\gamma$ -globin gene, *XmnI*+ and “C” allele of *HBBP1* : *rs2071348* in activating HbF production. The $\beta^{17(A-T)}$, $\beta^{41/42(-TTCT)}$ and $\beta^{IVS1-nt1(G-T)}$ -alleles in these three patients were *in-cis* to the β -globin haplotype I & VII, PG γ F I, $(TG)_9(CG)_5(TG)_8$ motif within IVS2 of $A\gamma$ -globin gene, *XmnI*- and “A” allele of *HBBP1* : *rs2071348* previously shown to be involved with low HbF expression.^{15,33,34} Thus, HbF expression in these three

patients was likely the result of increased expression of the γ -globin gene on the β^E -chromosome. However, in patient “C” (Figure 3), the $(AT)_xN_z(AT)_y$ motif in the β^E -chromosome was $(AT)_8N_{12}(AT)_{11}$, which has been previously shown to be involved in normal HbF expression³³ and should be responsible for the atypically low HbF in patient “C”. The $(AT)_xN_z(AT)_y$ motif of β LCR-HS2 has been shown to be a classical enhancer for $G\gamma$ -globin gene expression via opening chromosomal domain, thus increasing accessibility of RNA polymerase.³⁸ The $(AT)_8N_{12}(AT)_{11}$ motif might have less impact on the chromosome opening activity at γ -globin promoter, resulting in minimal γ -globin gene expression. This study was, however, the first to describe this unusual phenomenon.

In conclusion, this family study confirmed the linkage of the β^E allele and *cis*-acting loci associated with high HbF phenotype. The close relationship between HbE and HbF as well as the need of combination of the analyzed *cis*-acting sequences in activating HbF expression was highlighted.

Acknowledgements

This work was financially supported by a Research Chair Grant from The National Science and Technology Development Agency of Thailand. The authors would like to thank the Research Administration Center, Chiang Mai University for proofreading and correcting English language. LT was supported by the Post Graduate Study Fund, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

Conflict of interest

None

References

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The Thalassaemia Syndromes (Fourth edition). Oxford: Blackwell Scientific; 2001.
2. Fucharoen S, Weatherall DJ. The hemoglobin E thalassemias. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2(8).
3. Winichagoon P, Fucharoen S, Wilairat P, Chihara K, Fukumaki Y. Role of alternatively spliced beta E-globin mRNA on clinical severity of beta-thalassemia/hemoglobin E disease. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1995; 26(Suppl 1): 241-5.
4. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looareesuwan S, *et al.* Strong linkage disequilibrium of a HbE variant with the (AT)9(T)5 repeat in the BP1 binding site upstream of the beta-globin gene in the Thai population. J Hum Genet. 2005; 50(1): 7-11.
5. Vichinsky E. Hemoglobin e syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007; 79(1): 79-83.
6. Labie D, Dunda-Belkhodja O, Rouabhi F, Pagnier J, Ragusa A, Nagel RL. The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression. Blood. 1985; 66(6): 1463-5.
7. Garner C, Tatu T, Reittie JE, Littlewood T, Darley J, Cervino S, *et al.* Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. Blood. 2000 Jan 1; 95(1): 342-6.
8. Ma Q, Abel K, Sripichai O, Whitacre J, Angkachatchai V, Makarasara W, *et al.* Beta-globin gene cluster polymorphisms are strongly associated with severity of HbE/ β^0 -thalassemia. Clin Genet. 2007; 72(6): 497-505.
9. 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.
10. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looareesuwan S, *et al.* Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. Am J Hum Genet. 2004; 74(6): 1198-208.
11. Verma IC, Kleanthous M, Saxena R, Fucharoen S, Winichagoon P, Raizuddin S, *et al.* Multicenter study of the molecular basis of thalassemia intermedia in different ethnic populations. Hemoglobin. 2007; 31(4): 439-52.
12. Tatu T, Kiewkarnkha T, Khuntarak S, Khamrin S, Suwannasin S, Kasinrerker W. Screening for co-existence of α -thalassemia in β -thalassemia and in HbE heterozygotes via an enzyme-linked immunosorbent assay for Hb Bart's and embryonic ζ -globin chain. Int J Hematol. 2012; 95(4): 386-93.
13. Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguansermsri T. Analysis of β -thalassemia mutations in northern Thailand using an automated fluorescence DNA sequencing technique. Hemoglobin. 2003; 27(2): 89-95.
14. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 1991; 10(4): 506-13.
15. Kerdpoo S, Limweeraprajak E, Tatu T. Effect of Swiss-type heterocellular HPFH from *XmnI*- ζ and *HBBP1* polymorphisms on HbF, HbE, MCV and MCH levels in Thai HbE carriers. Int J Hematol 2014; 99(3): 338-44.
16. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. Am J Hematol. 1989; 32(1): 66-9.
17. Dos Santos Silva W, de Nazare Klautau-Guimaraes M, Grisolia CK. β -globin haplotypes in normal and hemoglobinopathic individuals from Reconcavo Baiano, State of Bahia, Brazil. Genet Mol Biol. 2010; 33(3): 411-7.

18. Tatu T, Garner C, Thein SL. Variation of HbF and F cell levels in relation to *cis*-regulatory sequences in the β -globin cluster. *Blood (Suppl 1)*. 1999; 94: 423a.
19. Tatu T, Thein S. Automated genotyping for accurate assignment of the $(AT)_x N_z (AT)_y$ motif within the β -globin locus control region-hypersensitive site 2. *Br J Haematol*. 2001; 112(2): 488-92.
20. Tatu T. Genetic basis of HbF and F cell production in human adults [D.Phil.]. Oxford: Oxford; 2001.
21. Pissard S, Beuzard Y. A potential regulatory region for the expression of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Blood*. 1994 Jul 1; 84(1): 331-8.
22. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. The population genetics of the haemoglobinopathies. In: Rodgers GP, editor. *Bailliere's Clinical Haematology, International practice and research: Sickle cell disease and thalassaemia*. London: Bailliere Tindall; 1998. p. 1-51.
23. Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassaemia in SouthEast Asia: problems and strategy for prevention and control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992; 23(4): 647-55.
24. Nagel RL, Roth EF, Jr. Malaria and red cell genetic defects. *Blood*. 1989; 74(4): 1213-21.
25. Weatherall DJ. Thalassaemia and malaria, revisited. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997; 91(7): 885-90.
26. Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, *et al*. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. *Blood*. 2002 ; 100(4): 1172-6.
27. Hattori Y, Kutlar F, Kutlar A, McKie VC, Huisman TH. Haplotypes of β^S chromosomes among patients with sickle cell anemia from Georgia. *Hemoglobin*. 1986; 10(6): 623-42.
28. Lanclos KD, Oner C, Dimovski AJ, Gu YC, Huisman THJ. Sequence variations in the 5' flanking and IVS II regions of $G\gamma$ and $A\gamma$ genes of β^S chromosomes with five different haplotypes. *Blood*. 1991; 77(11): 2488-96.
29. Oner C, Dimovski AJ, Altay C, Gurgey A, Gu YC, Huisman TH, *et al*. Sequence variations in the 5' hypersensitive site-2 of the locus control region of β^S chromosomes are associated with different levels of fetal globin in hemoglobin S homozygotes. *Blood*. 1992 Feb 1; 79(3): 813-9.
30. Adekile AD, Dimovski AJ, Oner C, Lanclos KD, Huisman TH. Haplotype-specific sequence variations in the locus control region (5' hypersensitive sites 2, 3, 4) of β^S chromosomes. *Hemoglobin*. 1993; 17(5): 475-8.
31. Lu Z-H, Steinberg MH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Relation of regulatory sequences *cis* to the β -globin gene cluster. *Blood*. 1996; 87(4): 1604-11.
32. Merghoub T, Perichon B, Maier-Redelsperger M, Dibenedetto SP, Samperi P. Dissection of the association status of two polymorphisms in the β -globin gene cluster with variations in F-cell number in non-anemic individuals. *Am J Hematol*. 1997; 56: 239-43.
33. Zertal-Zidani S, Ducrocq R, Sahbatou M, Satta D, Krishnamoorthy R. Foetal haemoglobin in normal healthy adults: relationship with polymorphic sequences *cis* to the β globin gene. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10(5): 320-6.
34. Nuinoon M, Makarasara W, Mushiroda T, Setianingsih I, Wahidiyat PA, Sripichai O, *et al*. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in β^0 -thalassemia/hemoglobin E. *Hum Genet*. 2010; 127(3): 303-14.

35. Dabke P, Colah R, Ghosh K, Nadkarni A. Effect of a group of genetic markers around the 5' regulatory regions of the β globin gene cluster linked to high HbF on the clinical severity of β thalassemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2013; 50: 156-60.
36. Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ. Effects of fetal hemoglobin on susceptibility of red cells to *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1977; 270: 171-3.
37. Vernes AJ, Haynes JD, Tang DB, Dutoit E, Diggs CL. Decreased growth of *Plasmodium falciparum* in red cells containing haemoglobin E, a role for oxidative stress, and a sero-epidemiological correlation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986; 80(4): 642-8.
38. Li Q, Harju S, Peterson KR. Locus control regions; coming of age at a decade plus. *TIG*. 1999: 403-8.

วิธีการแบบเร็วเพื่อแยกชนิดและเตรียมฮีโมโกลบิน A, A₂, E, F, Bart's และ Portland I ปริมาณมาก

Fast preparative separation of human hemoglobins A, A₂, E, F, Bart's and Portland I

■ คณศ ภักดีภักดิ์ ศศิวัลย์ เกิดมณี ชนุศักดิ์ ตาตุ*
Kanet Pakdeepak Sasiwan Kerdpoo Thanusak Tatu*

ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยาและเทคโนโลยีสุขภาพ แผนกวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Research Center for Hematology and Health Technology, Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology,
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

* Corresponding author (Email: tthanu@hotmail.com)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Background Preparative separation of hemoglobins is useful for preparing purified hemoglobins used as standard and control materials, as antigen for immunization or for immunological tests for hemoglobins.

Objectives: This study was aimed to develop the fast procedures for preparative separation of hemoglobins in hemolysate.

Methods: For fast preparative separation of Hbs A, A₂, E (with A₂) and F, three stepwise pH gradient liquid chromatography was developed namely *Protocol A*, *Protocol A₂/E* and *Protocol F* using the medium pressure liquid chromatography (MPLC) system and Tris-HCl-KCN (THK) buffer. The techniques of CAE with band elution was also developed to quickly separate and purify Hb Bart's and Hb Portland I.

Results: Compared to the conventional continuous pH gradient anion-exchange liquid chromatography run on the MPLC system which lasted 240-340 minutes, this newly established protocols took considerably short separating time. The *Protocol A*, *Protocol A₂/E* and the *Protocol F* required only 50, 50 and 70 minutes, respectively, to complete run. The outcomes of separation of conventional and the new methods were comparable. Hbs Bart's and Portland were successfully separated within 15 minutes in CAE, followed by band elution.

Conclusion: The new stepwise pH gradient anion-exchange liquid chromatography protocols run in the MPLC system and CAE with band elution techniques were successfully developed for fast preparative separation of hemoglobins. These protocols should be useful in preparation of purified hemoglobins that might be used as antigen, standard and control materials for hemoglobin study after specific types and separating patterns of purified hemoglobins were correctly confirmed by other standard techniques.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 100-106. Doi: 10.14456/jams.2015.13

Keywords: Hemoglobin, medium pressure liquid chromatography, cellulose acetate electrophoresis, continuous pH gradient liquid chromatography, stepwise pH gradient liquid chromatography

บทคัดย่อ

พื้นฐาน การแยกน้ำละลายฮีโมโกลบินให้ได้เป็นฮีโมโกลบินบริสุทธิ์ที่มีความสำคัญและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายทาง เช่น ใช้เป็นสารมาตรฐาน สารควบคุมคุณภาพการตรวจชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน ใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดี หรือใช้เป็นสารทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการแบบเร็วเพื่อเตรียมฮีโมโกลบินบริสุทธิ์ปริมาณมาก

วิธีการ สำหรับการเตรียมฮีโมโกลบิน A, A₂, E (with A₂) และ F บริสุทธิ์ปริมาณมากโดยเร็ว ได้ทำการพัฒนาเทคนิค stepwise pH gradient liquid chromatography ภายใต้หลักการ medium pressure liquid chromatography (MPLC) ร่วมกับใช้บัฟเฟอร์ชนิด Tris-HCl-KCN (THK) โดยระบบที่พัฒนาขึ้นตั้งชื่อว่า *Protocol A*, *Protocol A₂/E*, และ *Protocol F* ส่วนการเตรียมฮีโมโกลบิน Bart's และ Portland 1 บริสุทธิ์และปริมาณมากได้ทำการพัฒนาเทคนิค Cellulose acetate electrophoresis (CAE) ตามด้วยการชะแถบฮีโมโกลบิน

ผลการวิจัย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมฮีโมโกลบินบริสุทธิ์ในวิธีดั้งเดิม (conventional continuous pH gradient liquid chromatography) ซึ่งใช้เวลาในแต่ละครั้งประมาณ 240-340 นาที แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้สามารถแยกชนิดฮีโมโกลบินที่ต้องการได้อย่างรวดเร็วคือ *Protocol A*, *Protocol A₂/E*, และ *Protocol F* ใช้เวลาเพียงแค่ 50 นาที, 50 นาทีและ 70 นาทีตามลำดับ ปริมาณฮีโมโกลบินบริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เทคนิค CAE ตามด้วยการชะแถบฮีโมโกลบินสามารถเตรียมฮีโมโกลบิน Bart's และ Portland I บริสุทธิ์ปริมาณมากในเวลา 15 นาที

สรุปผลการทดลอง การศึกษานี้ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาวิธีการเตรียมฮีโมโกลบินบริสุทธิ์ปริมาณมากโดยวิธี stepwise pH gradient anion-exchange liquid chromatography protocols ภายใต้ระบบ MPLC และวิธี CAE ตามด้วยการชะแถบฮีโมโกลบิน วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเตรียมฮีโมโกลบินบริสุทธิ์ที่อาจใช้เป็นแอนติเจน สารควบคุมคุณภาพ และสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาฮีโมโกลบินหลังจากทำการยืนยันชนิดและรูปแบบการแยกของฮีโมโกลบินด้วยวิธีมาตรฐานอื่น

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 100-106. Doi: 10.14456/jams.2015.13

คำสำคัญ Hemoglobin, medium pressure liquid chromatography, cellulose acetate electrophoresis, continuous pH gradient liquid chromatography, stepwise pH gradient liquid chromatography

Introduction

Hemoglobin (Hb) is the principal protein in red blood cells (RBCs). Its main task is to transport O₂/CO₂ and stabilize pH in the erythrocytes. More than one type of hemoglobins are synthesized at each developmental stage of human. In embryo, Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) and Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) are predominantly produced. In fetus, HbF ($\alpha_2\gamma_2$) predominates, followed by HbA ($\alpha_2\beta_2$). In adult life, HbA is the major hemoglobin, followed respectively by HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) and HbF.¹ Types and quantities these hemoglobins thus determine status of hemoglobin production in human at each developmental stage, change of which indicates the syndrome of thalassemia and hemoglobinopathies.

Separation and quantification of hemoglobins in blood may be performed to make the diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies. To date, several techniques have been developed for this task, including cation-exchange HPLC, cation-exchange LPLC, isoelectric focusing (IEF) and capillary electrophoresis (CE).^{2,3}

Another objective of hemoglobin separation is to prepare the purified hemoglobin for further use as antigen, standard and control materials for hemoglobin studies. To obtain the large quantity of the hemoglobin, the so-called preparative separation is performed. Conventionally, the preparative separation of hemoglobin is performed by continuous gradient ion exchange column liquid chromatography.⁴ However, this technique is laborious

and time-consuming taking almost 5 hours. Some unstable hemoglobins might not remain intact at the end of the chromatography. Thus, this study was aimed to develop the fast and effective protocols for preparative separation of Hbs A, A₂, E, F, Bart's and Portland I. This new protocol was anticipated to be useful for those working in immunologic production of antibody to hemoglobins as well as those involved in diagnosis of thalassemia by the hemoglobin analysis techniques.

Materials and Methods

Preparation of hemolysate

Hemolysate was prepared from cord blood (for Hbs F, Portland I and Bart's) and peripheral blood (for Hbs A, A₂, E) by the standard carbon tetrachloride (CCl₄) extraction.⁵ Briefly, 3.0 mL of EDTA blood was washed for 3 times with normal saline solution (NSS) to yield packed red cell (PRC). Two volume of distilled water was then mixed with the PRC to lyse the red blood cells. The red cell debris was thereafter removed by extracting against one volume of carbon tetrachloride (CCl₄). Finally, the clear hemolysate at the top layer was collected which contains approximately 8-10 g/dL hemoglobin. The thesis was ethnically approved by the Research Ethic Committee, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University (Approved notice number 103/2556)

Conventional preparative separation of Hbs A, A₂, E, F by continuous gradient medium pressure liquid chromatography (MPLC)

Separation of Hbs A, F, A₂, E (with A₂) was performed in MPLC Fraction Collector (EKTA™ Prime, GE Healthcare Bioscience, Upsala, Sweden) using DEAE-Sepharose beads packed in C10/10 column (GE Healthcare Bioscience, Upsala, Sweden). 0.5 mL hemolysate mixed with 3 mL Tris-HCl-KCN (THK) buffer pH 9.0 was loaded into the column. Separation of hemoglobins was performed by the continuous pH gradient of Tris-HCl-KCN (THK) buffer from 9.0 to 6.5. In case of separating HbA from HbF, proportion of THK buffer pH 6.5 was increased from 25% to 100% at the increasing rate of 1% /6 min. In case of separating HbA from HbA₂ or HbA from HbE (with HbA₂), the proportion of the THK buffer pH 6.5 was increased from 15% to 100% at the

rate of 1%/5 min. Flow rate was set at 1 mL/min for both protocols.

Fast preparative separation of Hbs A, A₂, E, F by stepwise gradient medium pressure liquid chromatography (MPLC)

Separation of Hbs A, F, A₂, E (with A₂) was performed in MPLC Fraction Collector (EKTA™ Prime, GE Healthcare Bioscience, Upsala, Sweden) using DEAE-Sepharose beads packed in C10/10 column (GE Healthcare Bioscience, Upsala, Sweden). 0.5 mL hemolysate mixed with 3 mL Tris-HCl-KCN (THK) buffer pH 9.0 was applied into the column. Elution of hemoglobin fractions was accomplished under the stepwise pH gradient of Tris-HCl-KCN (THK) buffer from 9.0 to 6.5. Three stepwise pH gradient protocols so-called **Protocol A**, **Protocol A₂/E** and **Protocol F** were developed to specifically and quickly separate HbA, HbA₂/E and HbF, respectively. In the **Protocol A**, a separating process comprised initial increase of THK buffer pH 6.5, at 2-mL/min flow rate, from 0% to 40% in 6 min and held at 40% for 15 min before increasing to 60% in 5 min and held at this proportion for 20 min to completely elute the HbA. At the end, proportion of THK buffer pH 6.5 was immediately increased to 100% and stayed at this proportion for 20 min to elute the remaining Hbs. In the **Protocol A₂/E**, the process consisted of initial increase of THK buffer pH 6.5 from 0%-40% in 6 min at the rate of 1 mL/min. This proportion was held for 25 min to completely elute HbA₂/E before increasing to 100% in 5 min to completely elute the remaining Hbs in 25 min. In the **Protocol F**, the process was composed of an initial increase of THK buffer pH 6.5 from 0% to 50% in 6 min at 1 mL/min flow rate and held at this proportion for 5 min before increasing to 65% and stayed at this proportion for 40 min to completely elute HbF (Figure 1C).

Preparative separation of Hbs Bart's and Portland I by cellulose acetate electrophoresis (CAE) with band elution

Purification of Hbs Portland I and Bart's was performed using cellulose acetate electrophoresis (CAE) at alkaline condition followed by band elution as described previously.⁶ Briefly, the hemolysate was prepared from cord blood of Hb Bart's hydrops fetalis babies and subjected to CAE. After Hb Bart's and Hb Portland were

clearly separated in CAE, the bands of these two hemoglobins were manually cut apart by using a clean scissors, soaked overnight at 4°C in 5 mL of phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 to elute Hb Bart's and Hb Portland from the cellulose acetate plate.

Concentrating and quantifying the purified hemoglobins

The pooled fractions of purified hemoglobins from MPLC and pooled bands of purified Hb from CAE were concentrated by using ultrafiltration (VIVASpin™, Sartorius AG, Goettingen, Germany). The concentration of the purified hemoglobins was finally measured by the modified cyanmethemoglobin method.⁷ Practically, 20 µL of hemolysate was mixed with 4 mL of VKZ-Drabkin's solution (0.61 mM K_3FeCN_6 , 0.77 mM KCN, 1.03 mM KH_2PO_4 , 0.05% (v/v) sterox SE in DW) and incubated at RT for 10 minutes. After measuring the optical density at 540-nm wavelength, the concentration of hemoglobin in g/L was directly calculated from the equation : $[Hb \text{ in g/dL} = (OD_{540} \times 64458 \times 201) / (44 \times d \times 1000)]$, where "d" was the light path in centimeter.

Results

The new stepwise MPLC separation of hemoglobins A₂/E and F

Three stepwise MPLC protocols arbitrarily named *Protocol A*, *Protocol A₂/E* and *Protocol F* were successfully established (Figures 1A, 1B, 1C). As compared to the conventional continuous pH gradient which lasted approximately 240 min for A₂/E and A (Figure 2A) and approximately 340 min for F (Figure 2B), this newly established protocols drastically reduced the separation duration. The *Protocol A* and the *Protocol A₂/E* required only 50-minutes to prepare 31.6 mg HbA, 3.0 HbA₂, 15.4 HbE (with A₂), whereas the *Protocol F* took only 70 minutes to prepare 33.8 mg HbF from 0.5 mL loaded hemolysate. These amount of hemoglobins were comparable to those obtained from the conventional anion-exchange continuous gradient liquid chromatography (54.3 mg HbA, 2.6 mg HbA₂, 17.1 mg HbE (with A₂) and 23.6 mg HbF). The separated hemoglobin peaks obtained from each new protocol were correctly confirmed by the CAE as shown in Figure 1D.

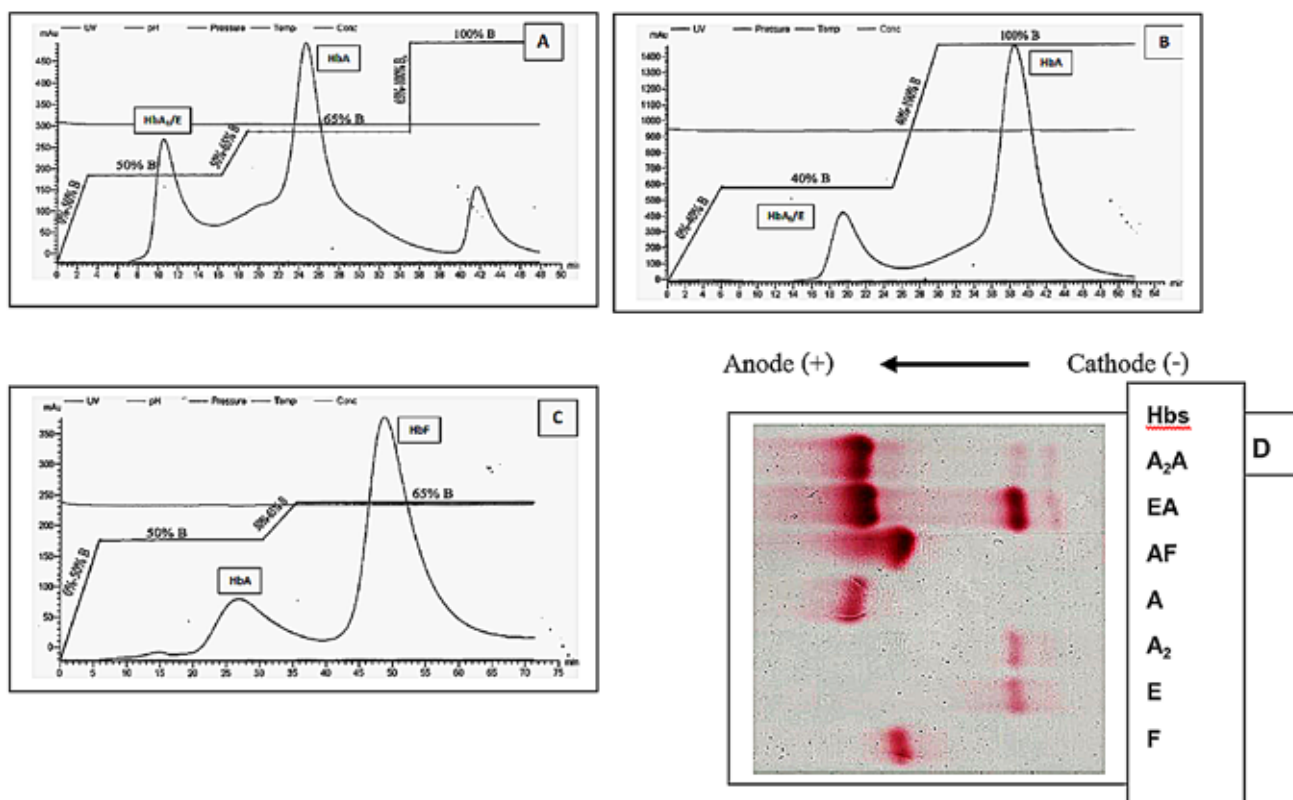


Figure 1 Stepwise MPLC hemoglobin chromatograms of Protocols A (A), Protocols A₂/E (B) and Protocols F (C). (D) CAE patterns of hemoglobins obtained from Protocol A (Lanes A, A₂ or E), Protocol A₂/E (Lanes A, A₂ or E) and Protocol F (Lanes A, F). Note that HbA₂ and HbE have the same retention times.

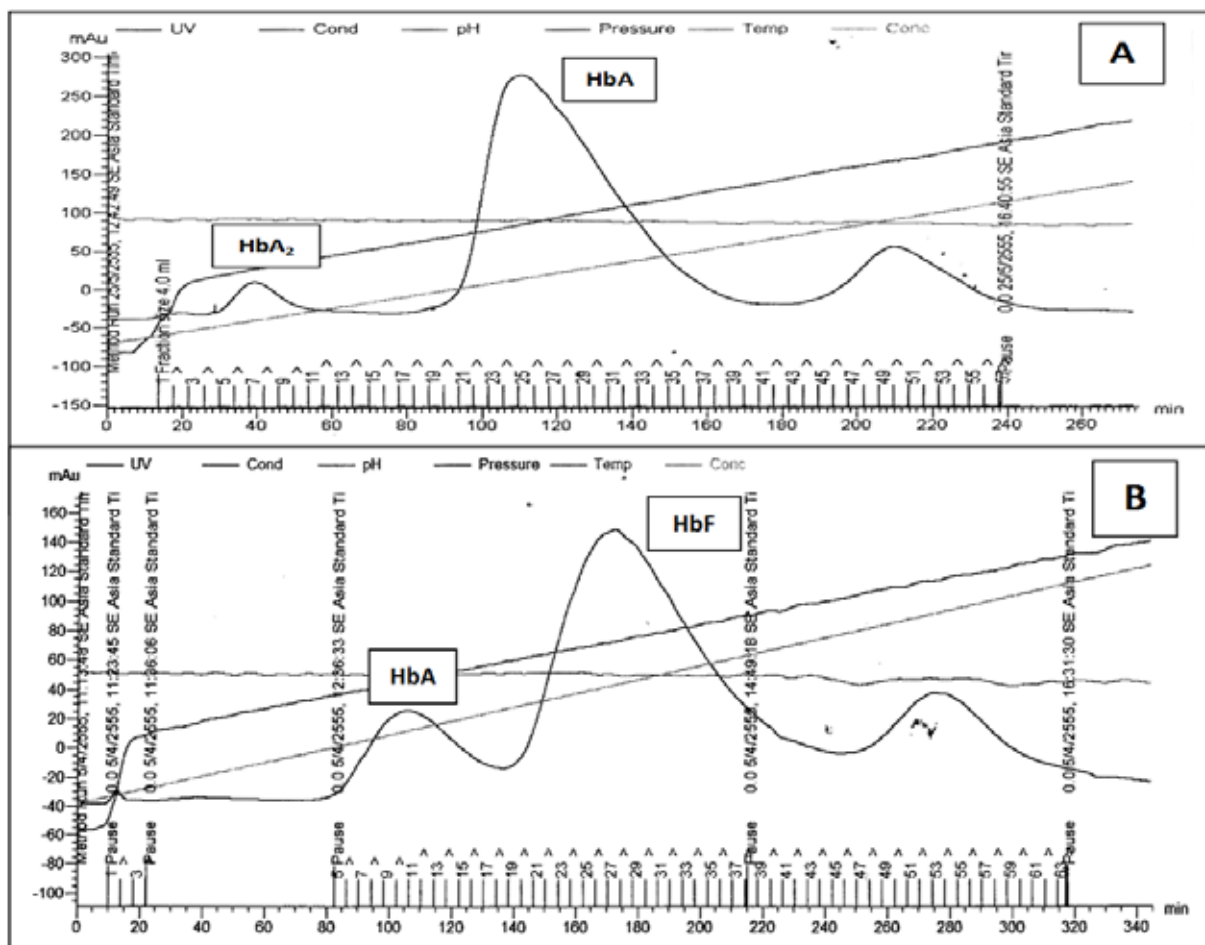


Figure 2 Hemoglobin chromatograms generated by continuous pH gradient of anion-exchange (DEAE-Sepharose) MPLC (EKTA Prime™). (A) Hb chromatogram of A₂A under an increase proportion of THK buffer pH 6.5 from 15-100% in 425 min at 1% per 5 min increasing rate. (B) Hb chromatogram of AF under an increase proportion of THK buffer pH 6.5 from 25-100% in 450 min at 1% per 6 min increasing rate.

Purification of hemoglobin Bart's and Portland I

After CAE for 15 minutes, Hb Bart's and Hb Portland I were clearly separated as shown in Figure 3A and 6.0 mg as well as 2 mg Hb Bart's and Hb Portland,

respectively, were yielded. The purified Hbs Bart's and Portland I were correctly confirmed by the CAE as shown in Figure 3B.

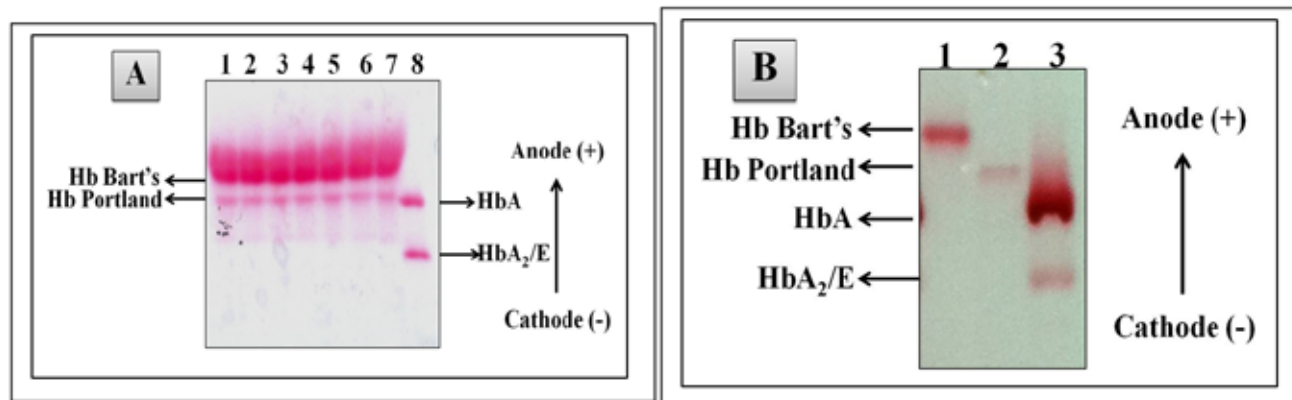


Figure 3 Separation of Hb Bart's and Hb Portland I (Hb Portland in picture) by cellulose acetate electrophoresis (CAE) at alkaline condition. (A) Hb separating pattern after 15-20 min electrophoresis (B) Checking the purity of Hb Bart's and Hb Portland I by the CAE at alkaline condition. Note that single Hb Bart's and Hb Portland I bands are seen indicating the high purity of these hemoglobins.

Discussion

Purified hemoglobins are useful in immunological and hematological studies of hemoglobins. Preparation of purified hemoglobins relies on the amphoteric property of hemoglobin in that its molecular net charge changes when pH of the medium changes, i.e. net charge becomes negative in the medium having pH greater than pI of the hemoglobins.⁸ Based on this fact, anion-exchange liquid chromatography was established to prepare the purified hemoglobins from human blood.⁹ Conventionally, continuous pH or salt gradient is performed to separate hemoglobins in blood lysate. Under this platform, pH gradually drops or salt concentration gradually raises leading to separation of hemoglobins along the length of column. However, this technique requires a long separation time and degradation of unstable hemoglobins such as HbH and HbE is likely to occur. Moreover, as Hb Bart's (γ_4) and Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) have very low pI (6.63 and 6.37, respectively) compared to HbA ($\alpha_2\beta_2$) (pI 6.98), these two hemoglobins take very time to be eluted out of the column.¹⁰ Hb Portland I constitutes smaller amount than Hb Bart's (22.5% vs 77.5%) in blood of Hb Bart's hydrops fetalis which is usually used as a source of these two hemoglobins.¹¹ Thus, clear separation of Hb Bart's and Hb Portland I by the continuous gradient liquid chromatography is difficult to achieve.

The protocols for preparative separation of hemoglobins developed in this study were shown to be effective, less time consuming in preparation of purified Hbs A, A₂, E (with A₂), F, Bart's and Portland I. In the step-wise gradient liquid chromatography, change in proportion of mobile phases was set in order to obtain pH specifically to elute required hemoglobin. After the required hemoglobin was eluted, the proportion of mobile phases was suddenly changed in a way that the remaining hemoglobins were washed out of the column. By doing this, the hemoglobin of interest was obtained in a short separating time compared to the continuous gradient style as demonstrated in this study. However, we could not establish the optimal stepwise gradient protocol for clearly separating Hb Bart's and Hb Portland I. This might be due to the low pI that requires more acidic medium to be eluted. The acidic medium might cause degradation

of these hemoglobin and, hence, resulting in poor separation.

Cellulose acetate electrophoresis (CAE) at alkaline condition has been routinely employed for hemoglobin separation.¹² This technique requires less than 20 minutes to completely separate all types of hemoglobin in blood. Although this technique is designed for the diagnostic purpose, not for preparative goal, we successfully modified the CAE for preparative separation of Hb Bart's and Hb Portland I by applying hemolysate of Hb Bart's hydrops fetalis in all 8 lanes, followed by eluting the cut bands of Hb Bart's and Hb Portland I in PBS. This technique was proven to be effective and obviously less time consuming.

Although the concentrated fractions were shown, by the CAE, to move at the same speed as the known hemoglobins, confirmation, e.g. by amino acid sequencing, was still required to ascertain if these fractions were of the corresponding hemoglobin types. In addition, for Hbs A, A₂, F, these purified hemoglobins should be used as antigen in immunological studies such as for immunization or as the standard for the immunological tests. However, care must be taken when HbE is utilized since the HbE fraction contains HbA₂. Thus, the HbE fractions obtained from this reported protocol should not be used for immunological methodologies, but could rather be utilized as the standard or control material for HbE study.

As these hemoglobin fractions were found to move at the same bands as the known hemoglobins, we thus postulated their uses as the standards and control materials for hemoglobins studies. However, several advanced hemoglobin analysis methodologies are performed presently such as the weak-cation exchange HPLC, the weak-cation exchange LPLC and the capillary zone electrophoresis (CZE). Thus, these purified hemoglobin fractions should be tested against these advanced techniques prior to making their uses in this particular application.

In conclusion, we successfully developed the new fast stepwise pH gradient anion exchange liquid chromatography protocol run in the MPLC system for preparative separation of Hbs A, A₂, E (with A₂), F. We also successfully established the quick and easy cellulose

acetate electrophoresis for preparing a large quantities of Hb Bart's and Hb Portland I. These two techniques could be useful for those working in immunological and hematological studies of hemoglobins.

kindly providing the MPLC machine used in this study. KP was a MS student of Medical Technology program, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Acknowledgements

This study was supported by the NSTDA Research Chair Grant, National Sciences and Technology Development Agency (Thailand). We thanked Biomedical Technology Research Center, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Sciences and Technology Development Agency at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University for

Conflict of interest

None

References

1. Bunn HF, Forget BG, Ranney HM. Human Hemoglobins. Toronto: W.B. Saunders Company; 1977.
2. Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian GD, Grudpan K. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta*. 2005; 65(5): 1149-61.
3. Higgins T, Mack M, Khajuria A. Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. *Clin Biochem*. 2009; 42(7-8): 701-5.
4. Schroder WA, Huisman THJ. The chromatography of hemoglobin. *Clinical and Biochemical Analysis* 9M. New York: Dekker Inc.; 1980.
5. Weatherall DJ, editor. The Thalassemia New York: Churchill Livingstone; 1983.
6. Tayapiwatana C, Kuntaruk S, Tatu T, Chiampanichayakul S, Munkongdee T, Winichagoon P, et al. Simple method for screening of α -thalassaemia 1 carriers. *Int J Hematol*. 2009; 89(5): 559-67.
7. Dacie J, Lewis S. Practical Haematology (8th Edition) Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995.
8. Koepke JA, Thoma JF, Schmidt RM. Identification of human hemoglobins by use of isoelectric focusing in gel. *Clin Chem*. 1975; 21(13): 1953-5.
9. Huisman THJ, Jonxis JHP. The hemoglobinopathies : Techniques of identification. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1977.
10. Randhawa ZI, Jones RT, Lie-Injo LE. Human hemoglobin Portland II ($\zeta_2\beta_2$). Isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. *J Biol Chem*. 1984; 259(11): 7325-30.
11. Li TK, Leung KY, Lam YH, Tang MH, Chan V. Haemoglobin level, proportion of haemoglobin Bart's and haemoglobin Portland in fetuses affected by homozygous α^0 -thalassemia from 12 to 40 weeks' gestation. *Prenat Diagn*. 2010; 30(12-13): 1126-30.
12. The Working Party of the General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 1998; 101(4): 783-92.

ความน่าเชื่อถือของการวัดในผู้ป่วยที่ใช้ประเมินภาวะข้อเข่าเสื่อม

Reliability study of outcome measures in subjects with knee osteoarthritis

■ พิมพ์ชนก องค์กรสันติภาพ อุบล พิรุณसार อาทิตย์ พวงมะลิ*
Pimchanok Ongsantiphap Upon Pirunsan Aatit Paungmali*

ภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Department of Physical Therapy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

* Corresponding author (Email: aatit.p@cmu.ac.th)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Objective: The purpose of this study was to examine the reliability of the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC), visual analog scale (VAS), pressure pain threshold (PPT), Timed Up and Go test (TUG) and Quadriceps & Hamstrings strength in patients with knee osteoarthritis.

Materials and Methods: Test-retest reliability of measurements with 1 day interval between session was determined by an Intraclass-correlation coefficient (ICC), Standard error of measurements (SEMs) and Coefficient of variation (CV) in 20 patients with knee osteoarthritis (age 63.5 ± 9.9 years, weight 62.2 ± 10.11 kg., height 156.6 ± 8.58 cm.)

Results: Intra tester reliability of outcome measures were good to excellent with intraclass correlation coefficient (ICC) of greater than 0.86, Standard error of measurements (SEMs) of less than 0.61% and Coefficient of variation (CV) of less than 9.38%, except the WOMAC (subpart: function) that exceeded 15%.

Conclusion: These measurement outcomes were reliability and could be useful for detecting changes in management of knee osteoarthritis (OA). However, the WOMAC (sub part: function) seemed to be less reliable due to its variation. Therefore, other potential functional outcome measures should be considered to add in for detecting change in the part of function outcome.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 107-114. Doi: 10.14456/jams.2015.8

Keywords: Reliability, knee joint, osteoarthritis, outcome measurement

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความน่าเชื่อถือ ความคลาดเคลื่อน และความแปรปรวนของการวัด ในตัวแปรที่สำคัญและจำเป็นต่อการตรวจประเมินพหุวิทยาการและการตอบสนองต่อการดูแลรักษาภาวะข้อเข่าเสื่อม อันได้แก่ แบบประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis: WOMAC) ระดับความรู้สึกความเจ็บปวด (visual analog scale: VAS) ระดับขีดทนความรู้สึกเจ็บปวดด้วยแรงกด (pressure pain threshold: PPT) ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อควอดริเซ็ปต์และแฮมสตริง (quadriceps & hamstrings strength) และการทดสอบช่วงเวลาในการลุกเดิน (Timed Up and Go test: TUG) สำหรับการนำไปใช้ในทางคลินิกและในงานวิจัย

วิธีการศึกษา: ศึกษาในอาสาสมัครทั้งหมด 20 คน เพศชาย 4 คน เพศหญิง 16 คน (อายุเฉลี่ย 63.5 ± 9.9 ปี น้ำหนัก 62.2 ± 10.11 กิโลกรัม ส่วนสูง 156.6 ± 8.58 เซนติเมตร) ทำการวัดซ้ำโดยผู้วัดเพียงคนเดียว (intra-rater reliability) โดยเว้นระยะวัดซ้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ intraclass-correlation coefficient (ICC), coefficient of variation (CV) และ standard error of measurements (SEMs)

ผลการศึกษา: ความน่าเชื่อถือของการวัดซ้ำโดยผู้วัดคนเดียว อยู่ในเกณฑ์ดีถึงดีเยี่ยม โดยค่า intraclass-correlation coefficient ที่ได้มีค่ามากกว่า 0.86 ส่วนค่า standard error of measurements มีค่าน้อยกว่า 0.61% และค่า coefficient of variation ทุกตัวมีค่าน้อยกว่า 9.38% ยกเว้น ค่า coefficient of variation ของแบบประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (WOMAC) ในส่วนของความสามารถในการทำงาน (function) ซึ่งมีค่าเกิน 15%

สรุปผลการศึกษา: ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ความน่าเชื่อถือของการวัดตัวแปรสำคัญสำหรับภาวะข้อเข่าเสื่อม อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แต่มีเพียงค่า coefficient of variation ในส่วนของด้านความสามารถในการทำงานของร่างกาย (physical function) ที่มีความแปรปรวนสูง ซึ่งอาจจำเป็นต้องมีการเพิ่มเติมตัววัดประเมินความสามารถในการทำงานอื่นๆ เข้ามาประกอบ

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 107-114. Doi: 10.14456/jams.2015.8

คำรหัส: ความน่าเชื่อถือ ข้อเข่า ข้อเสื่อม ตัวแปรสำคัญ

บทนำ

ปัจจุบันผู้สูงอายุมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยธรรมชาติจากสภาวะความเสื่อมลงของระบบอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ มากมาย เช่น มีแนวโน้มในการเป็นโรคข้อต่างๆ เพิ่มขึ้น ข้อเสื่อมเป็นภาวะความผิดปกติทางระบบกล้ามเนื้อและโครงร่างที่พบได้ในทุกเชื้อชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณข้อต่อที่มีแรงกดมากกระทำหรือทำหน้าที่รับน้ำหนัก เช่น ข้อเข่า ปัญหาดังกล่าวพบได้บ่อยเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น^{1,2} จากการศึกษาเกี่ยวกับอุบัติการณ์การเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในอเมริกา ปี 2000 พบว่ามีผู้ที่เป็นภาวะข้อเข่าเสื่อมสูงถึง 43 ล้านราย คิดเป็น 15.28% และคาดว่า ในปี 2020 อาจมีผู้ที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อมสูงถึง 54 ล้านคน คิดเป็น 16.36%³ และผู้ที่มีอายุ 65 ปีขึ้นไปในสหราชอาณาจักร ประมาณ 40% มักได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม⁴ และจากสถิติผู้ป่วยโรคกระดูกและข้อในประเทศไทยพบว่า ปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมกว่า 6 ล้านคน โดยพบมากในกลุ่มผู้สูงอายุที่มีอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป

มากถึงร้อยละ 50 ซึ่งพบข้อเข่าเสื่อมในหญิงอายุมากกว่า 50 ปี ถึงร้อยละ 40 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกๆ ปี⁵ ข้อเข่าเสื่อมมักมีอาการต่างๆ ได้แก่ ปวดข้อ ปวดตึงกล้ามเนื้อรอบข้อ มีเสียงลั่น ขยับข้อลำบาก ช่วงการเคลื่อนไหวของข้อลดลง หรือมีการผิดรูปของข้อต่อ ภาวะเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักในการจำกัดการทำงานและคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุ⁶ ภาวะข้อเข่าเสื่อมมีผลต่อความแข็งแรงของกล้ามเนื้อควอดริเซ็ปต์และแฮมสตริงในการควบคุมการทำงานของข้อเข่า ทำให้ความสามารถในการทรงตัวลดลงและเพิ่มความเสี่ยงในการล้ม⁷⁻⁹ กล้ามเนื้อที่อ่อนแอมักมีความสัมพันธ์กับอาการปวดและความสามารถในการทำงานที่ลดลง^{10,11} ดังนั้นการตรวจเพื่อประเมิน ตลอดจนวินิจฉัยการบำบัดรักษาและฟื้นฟู จึงมีความจำเป็นในการป้องกันไม่ให้เกิดความรุนแรงของพยาธิสภาพที่ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตและการดำรงชีวิตตัวแปรที่นิยมใช้ในการตรวจประเมินภาวะข้อเข่าเสื่อมได้แก่ แบบประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis: WOMAC)

ปีที่ 48 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม 2558

และระดับความรู้สึกความเจ็บปวด (visual analog scale: VAS) ตัวแปรดังกล่าวถือเป็นข้อมูลเชิงอัตวิสัย (subjective outcomes) ทั้งนี้การใช้ตัวแปรเชิงประจักษ์ (objective outcomes) ร่วมประกอบการประเมินการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของข้อเข่า จึงมีความสำคัญทั้งในทางคลินิกและการศึกษาวิจัย จาก การทบทวนวรรณกรรม ผู้วิจัยคิดเห็นว่าตัวแปร เช่น ระดับ ชีตกันความรู้สึกเจ็บปวดด้วยแรงกด (pressure pain threshold: PPT) ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อคอวไทรเซ็ปต์และแฮมสตริง (quadriceps & hamstrings strength) และการทดสอบช่วง เวลาในการลุกเดิน (Timed Up and Go test, TUG) น่าจะมีความสำคัญต่อการตรวจประเมินการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพ และการตอบสนองต่อการบำบัดรักษาของภาวะข้อเข่าเสื่อม จากการศึกษาที่ผ่านมายังมีข้อจำกัดในการศึกษาความน่า เชื่อถือของวิธีการวัดตัวแปรดังกล่าวข้างต้น กล่าวคือยังไม่มี การศึกษาใดที่ยืนยันความน่าเชื่อถือของตัวแปรต่างๆ ทั้งเชิง อัตวิสัยและเชิงประจักษ์ในกลุ่มอาสาสมัครที่มีภาวะข้อเข่า เสื่อมในการศึกษาเดียวกัน ซึ่งมีความจำเป็นในการเทียบเคียง ความน่าเชื่อถือระหว่างตัวแปร นอกจากนี้การศึกษาลูกชิ้นใหญ่ คำนี้ถึงเฉพาะความน่าเชื่อถือแต่ไม่ได้คำนึงถึงความคลาดเคลื่อน และความแปรปรวนของการวัด อันเป็นปัจจัยสำคัญที่ควร ตระหนักถึง ประเด็นความน่าเชื่อถือของการวัด (reliability study) มีความสำคัญต่อการศึกษาวิจัย (research study) และ การติดตามการเปลี่ยนแปลงเชิงคลินิก (clinical change) การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลความน่าเชื่อถือ ของการวัดทั้งในเชิงอัตวิสัยและเชิงประจักษ์สำหรับภาวะ ข้อเข่าเสื่อมเพื่อให้การพิจารณาความน่าเชื่อถือของการวัดใน การเปลี่ยนแปลงของตัวแปรต่างๆ มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความน่าเชื่อถือ ความคลาดเคลื่อน และความแปรปรวนของวิธีการวัด ใน ตัวแปรที่สำคัญและจำเป็นต่อการตรวจประเมินระดับ ความรุนแรงของพยาธิสภาพและการตอบสนองต่อการดูแล รักษาภาวะข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ แบบประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis: WOMAC) ระดับความรู้สึกความเจ็บปวด (visual analog scale: VAS) ระดับชีตกันความรู้สึกเจ็บปวดด้วยแรงกด (pressure pain threshold: PPT) ความแข็งแรงของ กล้ามเนื้อคอวไทรเซ็ปต์และแฮมสตริง (quadriceps & hamstrings strength) และการทดสอบช่วงเวลาในการลุกเดิน (Timed Up and Go test, TUG)

วัสดุและวิธีการ

อาสาสมัคร

ผู้เข้าร่วมการศึกษาประกอบด้วยอาสาสมัครทั้ง เพศชายและเพศหญิงรวมจำนวน 20 คน ประกอบด้วยเพศชาย 4 คน เพศหญิง 16 คน (อายุเฉลี่ย 63.5 ± 9.9 ปี น้ำหนัก 62.2 ± 10.11 กิโลกรัม ส่วนสูง 156.6 ± 8.58 เซนติเมตร) ซึ่งมี ภาวะข้อเข่าเสื่อมเรื้อรัง (เป็นมานานกว่า 3 เดือน) อย่างน้อย 1 ข้าง และมีระดับอาการปวดข้อเข่าขณะพัก (resting pain) ตั้งแต่ระดับ 2 ขึ้นไปโดยใช้การวัดระดับความรู้สึกความเจ็บ ปวด (10 cm. Visual analog scale)

การทดสอบ

การศึกษาคำนำเชื่อถือประกอบไปด้วยเครื่องมือ ดังนี้ แบบประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis: WOMAC) ระดับ ความรู้สึกความเจ็บปวด (visual analog scale: VAS) ระดับ ชีตกันความรู้สึกเจ็บปวดด้วยแรงกด (pressure pain threshold: PPT) การทดสอบช่วงเวลาในการลุกเดิน (Timed Up and Go test, TUG) และความแข็งแรงของกล้ามเนื้อคอวไทรเซ็ปต์ และแฮมสตริง (quadriceps & hamstrings strength) โดย ทำการวัดค่าตัวแปรต่างๆ ในระยะเวลาห่างกัน 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเดียวกันของวัน ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการวิจัยที่ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ผู้วัดเป็นบุคคล เดียวกันตลอดการศึกษา (intra-rater reliability) ตามตัวแปร ต่างๆ ดังนี้

การประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis: WOMAC)

การประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (WOMAC) ฉบับภาษาไทยมีจำนวน 24 ข้อ¹² ประกอบด้วย 3 ด้าน คือ ความเจ็บปวด (pain) ภาวะข้อติดขัด (stiffness) และ ความสามารถในการทำงานของร่างกาย (physical function) โดยด้านที่ 1 คือระดับความเจ็บปวด แบ่งออกเป็น 5 ข้อหลัก ในแต่ละข้อมีระดับคะแนน ตั้งแต่ 0 หมายถึงไม่ปวดเลย ถึง 10 หมายถึง ปวดจนทนไม่ได้ ด้านที่ 2 คือระดับอาการฝืด หรือข้อยึด แบ่งเป็น 2 ข้อหลัก ในแต่ละข้อมีระดับคะแนน ตั้งแต่ 0 หมายถึงไม่ฝืดเลย ถึง 10 หมายถึงมีอาการฝืดมากที่สุด และด้านที่ 3 คือระดับความสามารถในการทำงานของร่างกาย แบ่งเป็น 15 ข้อหลัก ในแต่ละข้อมีระดับคะแนนตั้งแต่ 0 หมายถึง ทำได้ดีมากไม่มีอาการฝืดเลย ถึง 10 หมายถึง ไม่สามารถ ทำกิจกรรมนั้นๆ ได้ โดยผู้ประเมินเป็นผู้สัมภาษณ์ด้วยตนเอง รายบุคคล

ระดับความรู้สึกความเจ็บปวด (Visual analog scale: VAS)

ระดับความรู้สึกความเจ็บปวด ทำการประเมินโดยใช้มาตราวัดระดับความรู้สึกเจ็บปวด (VAS) โดยลักษณะของแบบประเมินเป็นเส้นตรงตามแนวนอนขนาด 10 เซนติเมตร (cm) แบ่งระดับความรุนแรงออกเป็น 0 ถึง 10 โดยระดับ 0 อยู่ทางด้านฝั่งซ้ายมือหมายถึงการที่ไม่มีอาการปวด (no pain) และระดับ 10 อยู่ทางด้านฝั่งขวามือหมายถึงการที่มีอาการปวดมากที่สุด (the worst pain)¹³ โดยให้อาสาสมัครทำเครื่องหมายชี้ระดับความรู้สึกเจ็บปวดโดยเฉลี่ย (average pain) ในช่วงรอบหนึ่งวันที่ผ่านมาลงบนเส้นตามแนวนอนของ VAS scale ทั้งนี้ทำการประเมินผลโดยวัดเป็นหน่วยเซนติเมตร

ระดับขีดกันความรู้สึกเจ็บปวดด้วยแรงกด (pressure pain threshold: PPT)

ระดับขีดกันความรู้สึกเจ็บปวดด้วยแรงกด ใช้เครื่อง pressure algometer (Algometer รุ่น model PTH-AF2, New York, USA) ขนาดของหัววัด 1 ตารางเซนติเมตร (cm²) มีหน่วยวัดเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (Kg/cm²) เป็นเครื่องมือในการวัด โดยทำการวัดทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ประกอบด้วย เอ็นสะบ้า (patellar tendon) เส้นแนวข้อด้านใน (medial joint line) และเอ็นกล้ามเนื้อ (popliteus tendon)^{14,15} ด้วยอัตราความเร็วของแรงกด 40 กิโลปาสกาลต่อวินาที (kPa/s)¹⁶ วัดทั้งหมด 3 ครั้ง โดยมีระยะห่างของการวัดแต่ละครั้ง 30 วินาที ในการวิเคราะห์ผลใช้ค่าเฉลี่ยของทั้งสามครั้ง

การทดสอบช่วงเวลาในการลุกเดิน (Timed Up and Go test: TUG)

การทดสอบช่วงเวลาในการลุกเดิน¹⁷ ประเมินจากช่วงเวลาในหน่วยเป็นวินาทีของการลุกขึ้นยืนจากเก้าอี้และเดินในระยะทาง 3 เมตรด้วยความเร็วที่มากที่สุดจนกลับมานั่งยังเก้าอี้ ณ จุดเริ่มต้น ทำการวัดจำนวนสองครั้ง โดยมีระยะพัก 1 นาที การวัดในแต่ละครั้งอาสาสมัครต้องใส่รองเท้าคู่เดิมในการทดสอบ ในการวิเคราะห์ผลใช้ค่าที่ดีที่สุด

ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ (muscular strength)

ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ใช้การวัดแบบ isometric ของกล้ามเนื้อคอวไดรเชปต์และกล้ามเนื้อแฮมสตริงที่มุมเข่า 60°¹⁸ ซึ่งวัดโดยใช้ dynamometer (รุ่น H500 Hand Kit Dynamometer G200, Canada) ในหน่วยเป็นกิโลกรัม โดยการยึด dynamometer กับ N-K table วัดเป็นจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 นาที ในการวิเคราะห์ผลใช้ค่าที่ดีที่สุด

การวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือ

การวิเคราะห์ผลความน่าเชื่อถือของผู้วัด (intra rater reliability) ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ intra-class correlation coefficients (ICC) ค่าความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) และค่าความคลาดเคลื่อนของการวัด (standard error of measurements, SEMs)^{19,20}

ผลการศึกษา

จากตารางที่ 1 แสดงค่า intra-class correlation coefficients (ICC) ของแต่ละตัวแปรในการตรวจประเมินภาวะข้อเข่าเสื่อม จากการวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือ ผลการศึกษาพบว่า ตัวแปร VAS มีค่า ICC เท่ากับ 0.99 ตัวแปรแบบประเมิน WOMAC ทั้ง 3 ด้าน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.86-0.98 ตัวแปร PPT ของทั้ง 3 ตำแหน่ง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.89-0.99 ตัวแปรความแข็งแรงของกล้ามเนื้อคอวไดรเชปต์และแฮมสตริง มีค่าเท่ากับ 0.99 และตัวแปร TUG มีค่าเท่ากับ 0.99 สำหรับการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (%CV) พบว่า ตัวแปร VAS มีค่า %CV เท่ากับ 1.86% ตัวแปรแบบประเมิน WOMAC ทั้ง 3 ด้าน มีค่าอยู่ระหว่าง 2.02-20.2% ตัวแปร PPT ของทั้ง 3 ตำแหน่ง มีค่าอยู่ระหว่าง 3.38-7.65% ตัวแปรความแข็งแรงของกล้ามเนื้อคอวไดรเชปต์และแฮมสตริง มีค่าอยู่ระหว่าง 2.72-3.73% และตัวแปรของ TUG มีค่าเท่ากับ 1.65% และสำหรับการวิเคราะห์ค่าความคลาดเคลื่อนของการวัด (SEMs) พบว่า ตัวแปร VAS มีค่า SEMs เท่ากับ 0.07 เซนติเมตร ตัวแปรแบบประเมิน WOMAC ทั้ง 3 ด้าน มีค่าอยู่ระหว่าง 0.81-7.03 เซนติเมตร ตัวแปร PPT ของทั้ง 3 ตำแหน่ง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.16 - 0.3 Kg/cm² ตัวแปรความแข็งแรงของกล้ามเนื้อคอวไดรเชปต์และแฮมสตริง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.23-0.61 กิโลกรัม และตัวแปรของ TUG มีค่าเท่ากับ 0.17 วินาที

ตารางที่ 1 Intra-class correlation coefficients (ICC), coefficient of variation (CV) and standard error of measurements (SEMs)

Measurement	ICC	CV (%)	SEMs
VAS (cm.)	0.99	1.86	0.07 (0.53%)
WOMAC-pain (cm.)	0.93	9.38	1.09 (0.11%)
WOMAC-stiffness (cm.)	0.86	2.02	0.81 (0.05%)
WOMAC-function (cm.)	0.98	20.2	7.03 (0.05%)
PPT- patellar tendon (Kg/cm ²)	0.95	5.73	0.36 (0.17%)
PPT- medial joint line (Kg/cm ²)	0.89	7.65	0.3 (0.13%)
PPT-popliteus tendon (Kg/cm ²)	0.99	3.38	0.16 (0.3%)
Strength-knee extension (kg.)	0.99	3.73	0.6 (0.27%)
Strength-knee flexion (kg.)	0.99	2.72	0.23 (0.37%)
TUG (s)	0.99	1.65	0.17 (0.61%)

VAS = Visual analog scale, WOMAC = Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis,

PPT = Pressure pain threshold, TUG = Timed up and go test, s = Second, Kg = kilogram, cm² = Square centimeters, cm = centimeters

วิจารณ์ผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Intra-class correlation coefficients (ICC) ค่าความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) และค่าความคลาดเคลื่อนของการวัด (standard error of measurements, SEMs) ในการประเมินหาความน่าเชื่อถือของอาสาสมัครที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อม เพื่อดูความน่าเชื่อถือของการวัดและการตรวจประเมินสำหรับการนำไปใช้ทั้งในทางคลินิกและในงานวิจัย ผลแสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือในทุกตัวแปร กล่าวคือ ค่า ICC ที่ได้มีค่ามากกว่า 0.80 ซึ่งถือว่าเป็นค่าความน่าเชื่อถือที่ยอมรับได้²⁰ ประกอบกับค่า SEMs ที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยกว่า 5% ในทุกตัวแปร แสดงว่ามีค่าความคลาดเคลื่อนของการวัดน้อย และค่าความแปรปรวนของการวัด (%CV) มีค่าน้อยกว่า 15% ในทุกตัวแปร (ยกเว้นการประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (WOMAC) ในด้านความสามารถในการทำงานของร่างกาย (sub-part: physical function) ที่มีค่าเท่ากับ 20.2%) ซึ่งเป็นเพียงตัวแปรเดียวมีความแปรปรวนของการวัดที่สูง จำเป็นต้องให้ความสำคัญในการวัดตัวแปรนี้เป็นพิเศษ และควรพิจารณาเพิ่มตัวแปรเชิงประจักษ์สำหรับการประเมินผลความสามารถด้านการทำงาน (function) ของข้อเข่าอื่นๆเพิ่มเติม อาทิเช่น การทดสอบลุก-ยืน (sit to stand) หรือการทดสอบขึ้น-ลงบันได (up-down stairs) เป็นต้น²¹

โดยตัวแปรแต่ละตัวมีความน่าเชื่อถือสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา กล่าวคือตัวแปรแบบประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (WOMAC) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Thumboo J. และคณะ²² ซึ่งพบว่าความน่าเชื่อถือในทั้งสามด้านของแบบประเมินอันได้แก่ ด้านความเจ็บปวด ($r=0.87$) ด้านภาวะข้อต่อติดขัด ($r=0.83$) และด้านความสามารถในการทำงานของร่างกาย ($r=0.90$) ในกลุ่มผู้ใหญ่ตอนปลายที่มีภาวะข้อเสื่อมของรยางค์ขาทั้งเพศหญิงและเพศชายชาวสิงคโปร์ มีความน่าเชื่อถือสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่ามีความน่าเชื่อถือ ด้านความเจ็บปวด ($r=0.93$) ด้านภาวะข้อต่อติดขัด ($r=0.86$) และด้านความสามารถในการทำงานของร่างกาย ($r=0.98$) ที่ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีทั้งนี้อาจเนื่องจากอาสาสมัครในทั้งสองการศึกษามีช่วงอายุอยู่ในช่วงอายุเดียวกันและมีอัตราเพศชายต่อเพศหญิงในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม การที่การศึกษาของ Thumboo J. มีแนวโน้มของค่าความน่าเชื่อถือที่น้อยกว่าการศึกษาในครั้งนี้เล็กน้อยนั้นอาจเป็นเพราะ ระยะเวลาระหว่างช่วงของการวัดครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 มีการเว้นระยะเวลายาวนานถึง 1 สัปดาห์และใช้การทำแบบสอบถามผ่านทางโทรศัพท์ แต่ในการศึกษานี้ทำการวัดห่างกันเพียง 24 ชั่วโมง พหุริสภาพและอาการจึงยังคงค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงมาก รวมถึงการสอบถามโดยตรงด้วยตัวบุคคลอาจทำให้ได้คำตอบที่ชัดเจนกว่าการสอบถามทางโทรศัพท์ สำหรับตัวแปรระดับความรู้สึกเจ็บปวด

(VAS) ซึ่งการศึกษานี้ได้ค่าความน่าเชื่อถือสูงถึง 0.99 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hawker G.A. และคณะ²³ ที่หาความน่าเชื่อถือในอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ พบว่ามีความน่าเชื่อถือใกล้เคียงกันคือ ICC=0.94 ทั้งนี้อาจเป็นได้ว่าทั้งสองการศึกษามีระยะเวลาในการวัดใกล้เคียงกัน และมีลักษณะของกลุ่มอาการที่คล้ายคลึงกันจึงทำให้ค่าคะแนนมีความน่าเชื่อถือสูงใกล้เคียงกัน ในส่วนตัวแปรการวัดระดับขีดกันความรู้สึกเจ็บปวดต่อแรงกด (PPT) นั้นพบว่าการศึกษานี้ของ Wyde V. และคณะ¹⁶ ซึ่งศึกษาในอาสาสมัครที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อม จำนวน 50 คน โดยวัดบริเวณตำแหน่งที่มีอาการเจ็บ และทำการวัด 2 ครั้ง ในระยะเวลาห่างกัน 1 สัปดาห์ ได้ค่าความน่าเชื่อถืออยู่ที่ 0.83 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่มีค่าความน่าเชื่อถือในช่วง 0.89-0.99 แต่ค่าที่ได้จากการศึกษาของ Wyde V. มีแนวโน้มน้อยกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ใช้วัดในครั้งที่ 2 ห่างมากกว่า (1 สัปดาห์) ส่วนในการศึกษานี้ใช้ระยะเวลาห่างกันประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สอดคล้องกับวิธีการบำบัดรักษาทางกายภาพบำบัดที่มักใช้เวลาในการรักษาประมาณ 1 ชั่วโมง นอกจากนี้อาจเนื่องจากกลุ่มอาสาสมัครอยู่ในช่วงอายุที่แตกต่างกัน โดยที่การศึกษาของ Wyde V. มีอายุอยู่ในช่วง 71±7.6 ปี ส่วนการศึกษานี้ในครั้งนี้มีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 63.5±9.9 ปี ซึ่งอายุที่มากขึ้นอาจมีผลต่อความไวในการตอบสนองเชิงกลและแรงกด¹⁶ สำหรับตัวแปรการวัดความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ควอดริเซ็ปต์และกล้ามเนื้อแฮมสตริงนั้นพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Franssen M. และคณะ²⁴ ที่ศึกษาความน่าเชื่อถือของความแข็งแรงในท่าเหยียดเข่าของกล้ามเนื้อควอดริเซ็ปต์และความแข็งแรงในท่างอเข่าของกล้ามเนื้อแฮมสตริงในอาสาสมัครข้อเข่าเสื่อม โดยศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครที่มีอายุในช่วง 60-79 ปี ผลการศึกษาพบว่าค่าความน่าเชื่อถือในท่าเหยียดเข่า (knee extension) อยู่ในช่วง 0.79-0.95 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษานี้ที่พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.99 และในท่างอเข่า (knee flexion) มีความน่าเชื่อถือในช่วง 0.81-0.90 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับการศึกษานี้ที่มีค่า 0.99 ซึ่งถือว่าเป็นเกณฑ์ที่ยอมรับได้สำหรับตัวแปรการทดสอบช่วงเวลาในการลุกเดิน จากการศึกษาของ Kennedy D.M. และคณะ²¹ ที่ทำการศึกษาค่าความน่าเชื่อถือ ในอาสาสมัครที่ผ่าตัดข้อเข่าทั้งเพศชายและเพศหญิง (อายุเฉลี่ย 63.7±10.7 ปี ส่วนสูง 1.69±0.09 เซนติเมตร น้ำหนัก 85.5±15.4 กิโลกรัม) จำนวน 81 คน พบว่ามีค่าความน่าเชื่อถืออยู่ที่ 0.75 ซึ่งมีค่าความน่าเชื่อถือน้อยกว่าการศึกษานี้ในครั้งนี้ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากระยะเวลาระหว่างการวัดที่ทิ้งห่างนานกว่า 3 เดือน อาจส่งผลให้ค่าความเชื่อถือลดลงได้เนื่องจากพยาธิสภาพอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปและอีกสาเหตุอาจเกิดจากกลุ่มอาสาสมัครมีน้ำหนักและ BMI สูงกว่า

(BMI = 30.0±4.9) ทำให้ความคล่องตัวในการเดินน้อยกว่าในการศึกษานี้ที่มีน้ำหนักและ BMI น้อยกว่า (BMI = 25.3±2.2) จึงทำให้ความคล่องตัวสูงกว่า ผลของการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของวิธีการวัด โดยมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป ดังนั้นตัวแปรเหล่านี้สามารถนำไปใช้ตรวจประเมินพยาธิสภาพและประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาภาวะข้อเข่าเสื่อมในเชิงคลินิกตลอดจนเชิงการศึกษาวิจัยได้ อย่างไรก็ตาม ค่าความแปรปรวนของการวัดแบบประเมินความเจ็บปวดข้อเข่า (WOMAC) ในด้านความสามารถในการทำงานของร่างกาย (physical function) พบว่ามีความแปรปรวนของการวัดที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นการศึกษานี้ในผู้ที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อมจึงควรวางแผนวิธีการวัดตัวแปรดังกล่าวให้รัดกุมและอาจพิจารณาการวัดในตัวแปรด้านการทำงานของร่างกาย (physical function) เพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้ในการศึกษาในอนาคตอาจพิจารณาเพิ่มเติมตัวแปรในเชิงคุณภาพชีวิต (quality of life) เข้ามาประกอบด้วยเพื่อให้ครอบคลุมในทุกด้านของการประเมินภาวะข้อเข่าเสื่อม

สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สรุปได้ว่า ความน่าเชื่อถือ ความคลาดเคลื่อน และความแปรปรวนของการวัดในตัวแปรสำหรับการตรวจประเมินภาวะข้อเข่าเสื่อมนั้นส่วนใหญ่มีค่าความน่าเชื่อถือค่อนข้างสูง (มากกว่า 0.86) มีค่าความแปรปรวนของการวัดน้อย (น้อยกว่า 9.38%) และมีค่าความคลาดเคลื่อนของการวัดต่ำ (น้อยกว่า 0.61%) ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าการวัดในตัวแปรต่างๆ ดังกล่าวสามารถนำไปใช้เพื่อตรวจประเมินทางคลินิกตลอดจนการศึกษาวิจัยได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณบางส่วนจากทุนบัณฑิตศึกษา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณโรงพยาบาลสมเด็จ พระสังฆราชญาณสังวรเพื่อผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดชลบุรี สำหรับการให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ดำเนินโครงการวิจัย และขอขอบพระคุณอาสาสมัครทุกท่านที่สละเวลาเข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้

1. Guillemin F, Rat AC, Mazieres B, Pouchot J, Fautrel B, Euler-Ziegler L, et al. Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-base survey. *Osteoarthr Cartil* 2011; 19: 1314-22.
2. Nguyen US, Zhang Y, Zhu Y, Niu J, Zhang B, Felson DT. Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data. *Ann Intern Med* 2011; 155: 725-32.
3. Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Suppl* 2000; 60: 6-8.
4. Dawson J, Linsell L, Zondervan K, Rose P, Carr A, Randall T, et al. Impact of persistent hip or knee pain on overall health status in elderly people: A longitudinal population study. *Arthritis Rheum* 2005; 53: 368-74.
5. Thaiarthritis 2549; [cited 2015 Mar 24]. Available from: <http://www.thaiarthritis.org>.
6. Hafez AR, Al-Johani AH, Zakaria AR, Al-Ahaideb A, Buragadda S, Melam GR, et al. Treatment of knee osteoarthritis in relation to hamstring and quadriceps strength. *J Phys Ther Sci* 2013; 25: 1401-5.
7. Slemenda C, Brandt KD, Heilman DK, Mazzucaet S, Braunstein EM, Katz BP, et al. Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee. *Ann Intern Med* 1997; 127: 97-104.
8. Hassan BS, Mockett S and Doherty M. Static postural sway, proprioception, and maximal voluntary quadriceps contraction in patients with knee osteoarthritis and normal control subjects. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 612-18.
9. Sturnieks DL, Tiedemann A, Chapman K, Munro B, Murray SM, Lord SR. Physiological risk factors for falls in older people with lower limb arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31: 2272-79.
10. O'Reilly SC, Jones A, Muir KR, Doherty M. Quadriceps weakness in knee osteoarthritis: the effect on pain and disability. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 588-94.
11. McAlindon TE, Cooper C, Kirwan JR, Dieppe PA. Determinants of disability in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 258-62.
12. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt L. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically-important patient-relevant outcomes following total hip or knee arthroplasty in osteoarthritis. *J Rheumatol* 1988; 1: 95-108.
13. Butler PV. Linear analogue self-assessment and procrustean measurement: a critical review of visual analogue scaling in pain assessment. *J Clin Psychol Med Setting* 1997; 4: 111-29.
14. Skou ST, Nielsen T, Rasmussen S, Simonsen OH, Laursen MB, Nielsen L. Widespread sensitization in patients with chronic pain after revision total knee arthroplasty. *Pain* 2013; 154: 1588-94.
15. Imamura M, Imamura ST, Kazyama H, Targino RA, Hsing WT, Souza L, et al. Impact of nervous system hyperalgesia on pain, disability, and quality of life in patients with knee osteoarthritis: A controlled analysis. *Arthritis Care Res* 2008; 15: 1424-31.
16. Wylde V, Palmer S, Learmonth ID, Dieppe P. Test – retest reliability of quantitative sensory testing in knee osteoarthritis and healthy participants. *Osteoarthr Cartil* 2011; 19: 655-58.
17. Nordin E, Rosendahl E, Lundin-Olsson L. Timed “Up & Go” Test: Reliability in older people dependent in activities of daily living—focus on cognitive state. *Phys Ther* 2006; 86: 646-55.
18. Draper DO, Harris ST, Schulthies S, Durrant E, Knight KL, Ricard M. Hot-Pack and 1-MHz ultrasound treatments have an additive effect on muscle temperature increase. *J Athl Train* 1998; 33: 21-4.

19. Atkinson G, Nevill AM. Statistical methods for assessing measurement error (reliability) in variables relevant to sports medicine. *Sports Med* 1998; 26: 217-38.
20. Portney LG, Watkin MP. *Foundations of Clinical Research Application to Practice*. 2nd New Jersey. Prentice Hall Health: 2000.
21. Kennedy DM, Stratford PW, Wessel J, Gollish JD, Penney D. Assessing stability and change of four performance measures: a longitudinal study evaluating outcome following total hip and knee arthroplasty. *BMC Musculoskelet Disord* 2005; 6: 1-12.
22. Thumboo J, Chew L.-H. and Soh C.-H. Validation of the Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index in Asians with osteoarthritis in Singapore. *Osteoarthr Cartil* 2001; 9: 440-6.
23. Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of Adult Pain : Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care Res* 2011; 63: S240-52.
24. Fransen M, Crosbie J, Edmonds J. Isometric muscle force measurement for clinicians treating patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Care Res* 2003; 49: 29-35.

ระดับ soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) สูง แต่ระดับ soluble FasL (sFasL) ต่ำ ในผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการรุนแรง

High plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII)
but low plasma levels of soluble FasL (sFasL) in patients with
severe pandemic H1N1 2009 influenza infection

จินตนา พวงศรี¹ ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์² เอนก มุ่งอ้อมกลาง³ ประยุทธ์ แก้วมะลิ⁴
Chintana Phawong¹ Triwit Rattanojpong² Anek Mungaomklang³ Prayuth Kaewmalang⁴
สมคิด คงอยู่⁵ โสภณ เอี่ยมศิริถาวร⁶ บุญรัตน์ ทัดนัยไธเรศ⁷
Somkid Kongyu⁵ Sopon Iamsirithaworn^{5,6} Boonrat Tassaneetrithep⁷

¹ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่

²Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai

³ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ

⁴Department of Microbiology, Faculty of Sciences, King Mongkut's University of Technology, Bangkok

⁵โรงพยาบาลนครราชสีมา (โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย 2) จ.นครราชสีมา

⁶Nakhon Ratchasima Hospital, Ministry of Public Health, Nakhon Ratchasima

⁷กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย จ.นครราชสีมา

⁸Department of Medical Technology, Maharaj Nakhon Ratchasima Hospital, Nakhon Ratchasima

⁹สำนักโรคติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี

¹⁰Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Nonthaburi

¹¹สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 กรุงเทพฯ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ

¹²Office of Disease Prevention and Control 1, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Bangkok

¹³สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

¹⁴Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

* Corresponding author (Email: boonrat.tas@mahidol.ac.th)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Background: Inflammatory mediators play an important role in immune responses to viral infections. Data on the plasma levels of inflammatory mediators in pandemic H1N1 2009 influenza virus-infected Thai patients with severe diseases remain very limited.

Objective: To assess plasma levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β , interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), sTNFRII, sFasL and soluble RAGE (sRAGE) in patients with pandemic H1N1 2009 influenza infection.

Methods: Forty-two patients with pandemic H1N1 2009 influenza infection characterized as mild disease (n=21) or severe disease (n=21) were enrolled in this study. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Institute for the Development of Human Research Protection (IHRP), Ministry of Public Health. The study was carried out in Nakhon Ratchasima province during August 2009 to November 2010. Plasma levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ and TNF- α were measured using Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad). Plasma levels of sTNFRII, sFasL and sRAGE were determined by sandwiched enzyme-linked immunosorbent assay (R&D).

Result: Plasma levels of sTNFRII in pandemic H1N1 2009 influenza-infected patients with severe diseases (median (IQR) (pg/mL); 7,525 (6,470-9,630); n=11) were significantly higher than those with mild diseases (median (IQR) (pg/mL); 3,692 (2,655-4,128); n=21) ($p=0.004$). In addition, plasma levels of sFasL in pandemic H1N1 2009 influenza virus-infected patients with severe disease (median (IQR) (pg/mL); 39 (10-78); n=21) were significantly lower than those with mild disease (median (IQR) (pg/mL); 10 (10-25); n=11) ($p=0.003$). However, the plasma levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ , TNF- α , and sRAGE did not show any significant difference between the severe pandemic H1N1 2009 influenza virus infection and mild pandemic H1N1 2009 influenza virus infection.

Conclusion: The finding showed that higher plasma sTNFRII and lower plasma sFasL levels in patients with severe pandemic 2009 influenza virus infection might determine dysregulation of host immune response and could be used as prognostic markers of disease severity.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 115-126. Doi: 10.14456/jams.2015.12

Keywords: Severe pandemic H1N1 2009 influenza, cytokine, chemokine, sTNFRII, sFasL

บทคัดย่อ

บทนำ: สารสื่อกลางการอักเสบมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อไวรัส การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการรุนแรงมีสารสื่อกลางการอักเสบในระดับสูง แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อมูลค่อนข้างจำกัดในผู้ป่วยไทยที่เป็นไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการรุนแรง

วัตถุประสงค์: เพื่อหาระดับ IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ , TNF- α , sTNFRII, sFasL และ sRAGE ในพลาสมาของผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009

วัสดุและวิธีการวิจัย: ทำการศึกษาในผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่จังหวัดนครราชสีมาในเดือน สิงหาคม 2552-พฤศจิกายน 2553 จำนวน 42 ราย ประกอบด้วย ผู้ป่วยที่อาการไม่รุนแรง 21 ราย ที่อาการรุนแรง 21 ราย ดำเนินการวิเคราะห์ระดับ IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ , TNF- α ในพลาสมา โดยใช้วิธี Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad) และระดับ sTNFRII, sFasL, sRAGE ในพลาสมา โดยวิธี sandwiched enzyme-linked immunosorbent assay (R&D)

ผลการศึกษา: ระดับ sTNFRII ในพลาสมาจากผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการรุนแรง (median (IQR) (pg/mL); 7,525 (6,470-9,630); n = 11) มีค่าสูงกว่าระดับ sTNFRII ในพลาสมาจากผู้ป่วยที่อาการไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IQR) (pg/mL); 3,692 (2,655-4,128); n = 21) ($p=0.0049$) นอกจากนี้ระดับ sFasL ในพลาสมาจากผู้ป่วยที่อาการรุนแรง (median (IQR) (pg/mL); 39 (10-78); n = 21) มีค่าต่ำกว่าระดับ sFasL จากผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการไม่รุนแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (median (IQR) (pg/mL); 10 (10-25); n = 11) ($p=0.0035$) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาไม่พบความแตกต่างของระดับ IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α และ sRAGE ในพลาสมาจากผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มนี้

สรุปผลการศึกษา: ระดับ sTNFRII ที่เพิ่มสูงขึ้น และ/หรือ ระดับ sFasL ที่ลดต่ำลงในพลาสมาผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการรุนแรง อาจบ่งบอกความผิดปกติในการรักษาสสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน และอาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการพยากรณ์ความรุนแรงของโรค

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 115-126. Doi: 10.14456/jams.2015.12

คำรหัส: ผู้ป่วยไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (H1N1) 2009 ที่อาการรุนแรง ไซโตไคน์ คีโมไคน์ sTNFRII, sFasL

Introduction

The pandemic H1N1 2009 (pdmH1N1 2009) influenza A virus has emerged from North America since March 2009. Subsequently, it has rapidly spread to over 214 countries worldwide. Globally over 414,000 cases of the pdmH1N1 2009 virus infections were confirmed in 2010 resulting in at least 18,114 deaths.¹ In Thailand during 2009-2010, the pdmH1N1 2009 virus was responsible for 47,411 laboratory-confirmed cases and 347 deaths.² Most of pdmH1N1 2009 virus infections cause mild and self-limited diseases. However, some patients with pdmH1N1 2009 virus infection may develop severe respiratory tract complications and deaths. Previous pathogenesis studies on pdmH1N1 2009 virus infection³ revealed that virological factors, cytokine storms, and pathological changes contributed to the pathogenesis of pdmH1N1 2009 virus infection.⁴

Cytokines have been shown to play role in both immunoprotection and immunopathology in several viral infections including influenza A.⁵⁻¹⁹ Influenza A virus infection can induce robust cytokine production (hypercytokinemia or cytokine storm). This results in hyperactivation of innate immune responses during early stage of infection, and lung tissue damage. *In vitro* experiments demonstrated that influenza A infection excessively stimulated TLR/cytokine signaling, and up-regulated suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 in BEAS-2B human pulmonary epithelial cells.⁵ Seasonal influenza A H1N1 (sH1N1) significantly increased gene expression of TLR3, TLR9, IL-6, TNF- α and IFN- β in human pharyngeal epithelial cell line (Hep-2).⁶ H5N1 virus induced the expression of CXCL10, IL-6, CCL2, and CCL5 in human lung A549 epithelial cells.⁷ Studies in mice models demonstrated pulmonary viral replication, pulmonary pathological lesion, and overwhelmed inflammatory innate immune responses in pdmH1N1 2009 virus-infected susceptible mice.⁸⁻¹² In human, Th1 and Th17 hypercytokinemia during early stage of infection were associated with severe disease of influenza infection.¹³⁻¹⁷ The elevated plasma levels of IL-17 were observed in influenza A-infected patients with acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS)¹⁴ whereas the increased plasma levels of IL-1 β ,

IL-6, IL-12 and IFN- γ were observed in influenza A-infected patients with pneumonia.^{18,19} The plasma levels of IL-8, IL-9, IL-17, IL-6, TNF- α , IL-15 and IL-12p70 were also significantly increased in patients with severe pandemic influenza infection.¹³

Recent studies demonstrated that TNF and TNF receptor family were not only involved in the immunopathogenesis but also in the control of influenza A infection. TNF had an effect on enhanced recruitment of inflammatory cells and induction of tissue damage in the lungs. These lead to severe respiratory complications such as pneumonia, acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Administration of anti-TNF antibody in mice was shown to decrease pulmonary infiltration, and lung injury. It also prolonged survival of mice with lung disease caused by influenza virus.²⁰⁻²¹ Mice genetically deficient in TNFR I with influenza A virus infection were demonstrated to have the reduction in pulmonary viral infiltration and disease mortality.²²⁻²³ Previous clinical studies showed the increased plasma levels of TNF- α and soluble TNFRI (sTNFRI) in patients with severe and fatal influenza A infection.^{13,24} However, little is known about the role of sTNFRII in clinical outcome of pdmH1N1 2009 virus infections.

Receptor for advanced glycation end-products (RAGE), a multi-ligand cell-surface protein and NF-kappa B activator, is involved in inflammatory responses of acute and chronic diseases. The engagement of RAGE with their ligands (such as advanced glycation end products (AGEs), toxic AGEs (TAGE), High-mobility group box-1 (HMGB1), damage-associated molecular patterns (DAMPs)) induces inflammatory responses, resulting in devastating of the diseases. Soluble RAGE (sRAGE) derived from receptor ectodomain shedding, and endogenous secretory (es) RAGE act as decoy receptors to counteract RAGE-mediated pathogenesis. Several studies demonstrated that the decreased level of sRAGE is related with hyperactivation of ligand-AGE axis. The increased HMGB1, and attenuated lung pathology from *Staphylococcus aureus* infection were demonstrated in mice genetically deficient in RAGE.²⁵ Patients with lung infection had elevated levels of alveolar sRAGE. However, patients with severe lung dysfunction had elevated levels of both plasma and alveolar sRAGE.²⁶

The elevated levels of serum sRAGE were also observed in children with severe bronchiolitis.²⁷ Patients with septic shock showed a positive statistically significant correlation between sRAGE with IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 and interferon-gamma-induced-protein 10 (IP-10), while patients with severe sepsis and septic shock showed positive correlation between plasma sRAGE with IFN- γ .²⁸

FasL, belongs to TNF and TNF receptor family, plays a crucial role in participating the Fas-mediated (extrinsic) apoptosis pathway of virus infected cells.²⁹ Soluble FasL (sFasL), which shed from the membrane-bound molecules by metalloproteinase, acts as a functional regulator of membrane-bound FasL.³⁰ Evidence for the role of Fas-mediated apoptotic mechanisms in influenza A infection come from the cell culture experiments,³¹⁻³² animal models,³³ and human studies.³⁴ Influenza A-infected HeLa cells expressed both Fas and FasL on the cell surfaces and induced apoptosis.³¹ While A549-infected with pandemic influenza A (H1N1) virus upregulated FasL expression and modulate Fas signaling pathway, thereby enhancing viral replication.³⁵ Mice infected with the 1918 pandemic H1N1 influenza A virus revealed the expression of FasL/Fas associated genes in the lung is related with the mortality of the infected mammalian host.³⁶ Inhibition of Fas and FasL signaling also decreased the mortality of mice lethally infected with influenza A virus.³⁷

Despite the 2009 H1N1 influenza outbreak in Thailand during 2009-2010 with high disease burden, less is known about the immunopathogenesis of severe pdmH1N1 2009 influenza diseases in this setting. In this study, we investigated the plasma levels of inflammatory markers in patients with pdmH1N1 2009 influenza infection.

Materials and Methods

Study site

The study subjects were recruited from individuals infected with the pdmH1N1 2009 virus in Nakhon Ratchasima province during August 2009 to November 2010.

Study subjects

Forty two patients diagnosed pdmH1N1 2009 virus infection (age range 21-85 years) with mild (n=21) and severe disease (n=21) were enrolled in this study

during September 2010 to October 2010 from the outpatient department and critical care units, Maharaj Hospital, Nakhon Ratsima province, Thailand. Inclusion criteria for the severe influenza group were ≥ 18 years old, both genders, infected with pdmH1N1 2009 influenza virus confirmed by real-time RT-PCR and having pneumonia or acute respiratory distress syndromes. Inclusion criteria for the mild influenza group included ≥ 18 years old, both genders and infected with pdmH1N1 2009 influenza virus confirmed by real-time RT-PCR, having no respiratory insufficiency. Exclusion criteria were < 18 years old, not documented as pdmH1N1 2009 influenza virus infection by real-time RT-PCR, receiving immunosuppressive drugs and refusing to sign the informed consent or cooperate with the specimen collection. The demographic data and clinical characteristics, including age, gender, underlying diseases, symptoms, days since onset, length of stay, death, were recorded. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Institute for the Development of Human Research Protection (IHRP), Ministry of Public Health.

Specimen collection

Throat swabs from patients with pdm H1N1 2009 influenza were collected for diagnosis pdm H1N1 2009 influenza virus infection at the day of enrollment. Blood samples were collected and sera/plasma samples were stored at -20 °C until used.

Determination of cytokines

Plasma levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, MCP-1, MIP-1 β , G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α were determined using the Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol. Plasma levels of sTNFRII, sFasL, sRAGE were determined by using sandwiched enzyme-linked immunosorbent assay (R&D).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software, Inc., Sandiego, CA). Differences among patient groups were tested by Chi-square test and/or Mann-Whitney *U* test.

Results

The demographical and clinical characteristics of the study subjects

The demographical and clinical characteristics of the patients are shown (Table 1). Forty two patients with pdm H1N1 2009 influenza virus infection, who developed mild disease (n=21) or severe disease (n=21), were enrolled in this study. The median ages were 33 (range 20 to 85 years) for the mild disease group and 58 (range 16 to 77 years) for the severe disease group. The most common underlying diseases and significantly increased in the severe disease group were type 2 diabetes(33.33%) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (23.81%). The most common manifestations in both groups were

cough (95.24%), fever (57.14%), headache (57.14%), myalgia (54.76%), and sore throat (50%). The symptoms that were significantly present in the severe group were dyspnea (66.67%). The most common complications seen in the severe influenza group included acute respiratory failure (76.19%), pneumonia (71.43%), acute respiratory distress syndrome (52.38%), acute renal failure (28.57%) and death (33.33%). In the severe group, the median of duration of symptom onset and hospital admission were 6 (ranged 2 to 37 days) and the median of length of hospital stay of the severe influenza group were 10.5 days (ranged 4 to 106 days). In the severe group, mortality of 33.3% (7 deaths) was observed.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients

Characteristics	All patients with pdm H1N1 2009 influenza infection (n=42)	Patients with pdm H1N1 2009 influenza infection		p-value
		Mild Influenza (n=21)	Severe influenza (n=21)	
Age (years)	40(16 - 85)	33 (20 - 85)	58 (16 - 77)	0.007
Gender ratio (M/F)	22/20	8/13	14/7	0.0638
Underlying diseases				
COPD	5/42	0/21	5/21	0.0172
Type 2 Diabetes	8/42	1/21	7/21	0.0184
Hypertension	9/42	2/21	7/21	0.0601
Chronic lung disease	2/42	0/21	2/21	0.1473
Presenting symptoms				
Fever > 38°C	24/42	10/21	16/21	0.0566
Rhinorrhea	22/42	17/21	5/21	0.0002
Sore throat	21/42	17/21	4/21	< 0.0001
Cough	40/42	21/21	19/21	0.1473
Dyspnea	17/42	3/21	14/21	0.0005
Myalgia	23/42	19/21	4/21	< 0.0001
Headache	24/42	19/21	5/21	< 0.0001

Statistical significance was determined by Chi-square test ($p < 0.05$)

Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients. (continued)

Characteristics	All patients with pdm H1N1 2009 influenza infection (n=42)	Patients with pdm H1N1 2009 influenza infection		<i>p</i> -value
		Mild Influenza (n=21)	Severe influenza (n=21)	
Complications				
Bronchitis	3/42	3/21	0/21	0.0794
Acute respiratory failure	15/42	0/21	16/21	< 0.0001
Pneumonia	17/42	2/21	15/21	< 0.0001
ARDS	11/42	0/21	11/21	0.0001
Acute renal failure	6/42	0/21	6/21	0.0082
Days since onset (day); median (range)	2 (2-38)	4 (0-5)	6 (2-37)	0.0016
Length of stay (day); median (range)	7 (0-106)	0 (0-6)	10.5 (4-106)	< 0.0001

Statistical significance was determined by Chi-square test ($p < 0.05$)

Plasma cytokines/chemokines and inflammatory mediators in patients with pdm H1N1 2009 influenza virus infection

In order to determine the plasma cytokines/chemokines and inflammatory mediators in severe and mild patients with pdm H1N1 2009 influenza virus infection, plasma levels of sTNFRII in patients with severe pandemic H1N1 2009 influenza (median (IQR) (pg/mL); 7,525 (6,470-9,630); $n=11$) were significantly higher than those with mild disease (median (IQR) (pg/mL); 3,692

(2,655-4,128); $n=21$) ($p=0.0049$) (Table 2, Figure 1). While, plasma levels of sFasL in patients with mild pdmH1N1 2009 influenza (median (IQR) (pg/mL); 39(10-78); $n=21$) were significantly higher than those with severe disease (median (IQR) (pg/mL); 10(10-25); $n=11$) ($p=0.0035$) (Table 2, Figure 1). However, levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α and sRAGE did not show any significant difference among these patients.

Table 2. Plasma levels of IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-6, sRAGE, sFasL and sTNFRII at the day of enrollment of patients with pandemic H1N1 2009 influenza

Cytokine	Patients with pandemic 2009 H1N1 influenza		<i>p</i> -value
	Mild disease	Severe disease	
IFN- γ			
Median (pg/mL)	369.5	350	0.8785
(IQR)	(175.1 - 561.4)	(232 - 507.7)	
Sample size	21	7	

Statistical significance was determined by The Mann-Whitney U test ($p < 0.05$). IQR, interquartile range

Table 2. Plasma levels of IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-6, sRAGE, sFasL and sTNFRII at the day of enrollment of patients with pandemic H1N1 2009 influenza. (continued)

Cytokine	Patients with pandemic 2009 H1N1 influenza		p-value
	Mild disease	Severe disease	
TNF- α			
Median (pg/mL)	79.09	45.99	0.3359
(IQR)	(33.43 - 128.3)	(30.51 - 67.97)	
Sample size	21	6	
IL-17			
Median (pg/mL)	23.72	21.19	0.4825
(IQR)	(9.69-50.54)	(7.18-26.37)	
Sample size	20	6	
IL-6			
Median (pg/mL)	14.93	33.13	0.1392
(IQR)	(7.11-33.49)	(9.24-14.3)	
Sample size	21	11	
sRAGE			
Median (pg/mL)	922	1,436	0.4633
(IQR)	(614.3-1406)	(447-9,519)	
Sample size	21	11	
sFasL			
Median (pg/mL)	39	10	0.0035
(IQR)	(10-17)	(10-25)	
Sample size	21	11	
sTNFRII			
Median (pg/mL)	3,692	7,525	0.0049
(IQR)	(2,655-4,128)	(6,470-9,630)	
Sample size	21	11	

Statistical significance was determined by The Mann-Whitney U test ($p < 0.05$). IQR, interquartile range

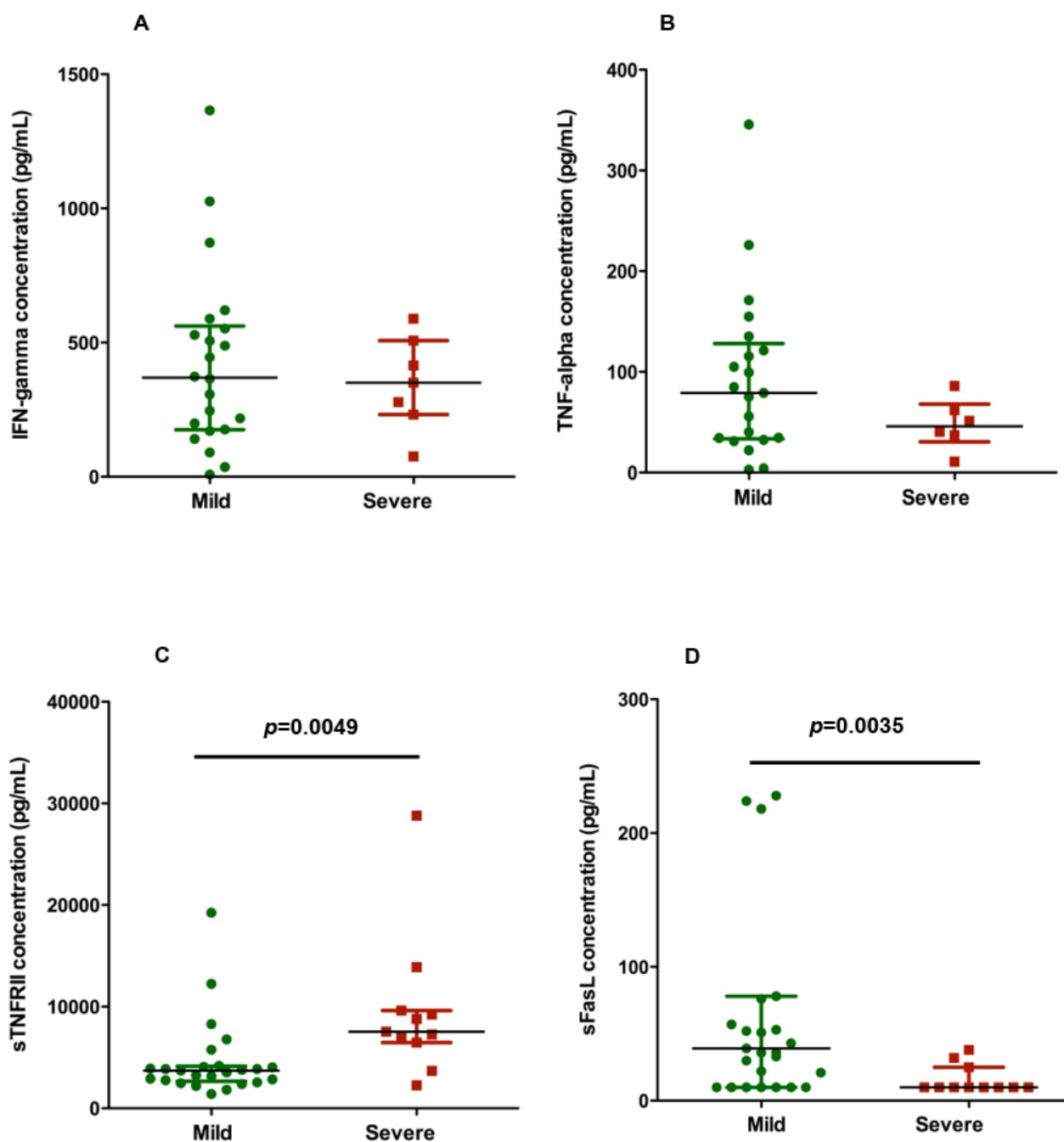


Figure 1 Plasma levels of IFN- γ , TNF- α , sTNFRII and sFasL at the day of enrollment in patients with mild and severe pandemic H1N1 2009 influenza. The Mann-Whitney U test was used to compare the levels: (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) sTNFRII, (D) sFasL. Data presented as median, interquartile range (IQR). Mild, Mild pandemic H1N1 2009 influenza; Severe, Severe pandemic H1N1 2009 influenza.

Discussion

In this study, we presented the cytokine, chemokine and plasma sTNFRII and sFasL responses of patients with pdmH1N1 2009 virus infection. The result demonstrated that significantly higher plasma levels of sTNFRII were found in patients with severe pdmH1N1 2009 influenza compared to those in patients with mild disease. The finding was consistent with the previous study showing that signaling via TNF receptor enhanced influenza disease severity²³ and human studies in HIV,³⁸ adenovirus,³⁹ RSV,³⁹ coronavirus⁴⁰ and dengue⁴¹ infections that demonstrated elevated serum levels of sTNFRII were associated with severe clinical outcomes, supporting the important role of receptors and ligands of the TNF family in determining influenza disease severity. In addition, in this study, significantly decreased in plasma levels of sFasL were observed in patients with severe disease compared to those of mild disease. Comparable to previous *in vitro* study in the influenza-infected HeLa cells³¹ and influenza-infected human mononuclear cells⁴² that upregulation of Fas (CD95), FasL (CD95L) and apoptosis were observed during influenza infection. The mechanism underlying the contribution of elevated plasma sFasL in mild influenza clinical outcomes could be possibly involved with manipulation of Fas-mediated apoptosis signaling by high amount of plasma sFasL antagonizing the effect of membrane-bound Fas during acute influenza infection⁴³⁻⁴⁴ and then protect the apoptosis. Moreover, in this study, there were high percentages of patients aged ≥ 50 years in the severe group. However, stratified analysis according to age group could not be performed due to the small sample size of patients aged ≥ 50 years. It is likely that elderly patients with severe influenza may have an increase in apoptosis and impair immune responses to influenza virus infection, leading to disease severity.⁴⁵

Soluble RAGE, a decoy receptor for several ligands including advanced glycation end products (AGEs), toxic AGEs (TAGE), High-mobility group box-1 (HMGB1), damage-associated molecular patterns (DAMPs), has been reported as a severity predictor of community acquired pneumonia⁴⁶. In this study, there was no significant difference of sRAGE in patients with severe influenza compared to those of mild influenza.

Hypercytokinemia has been reported in immunopathogenesis of severe influenza. Previous studies reported an elevated T-helper 17 (IL-8, IL-9, IL-17, IL-6) and T-helper 1 (TNF- α , IL-15, IL-12p70)¹⁵ and immunosuppressive cytokines (IL-10 and IL-1ra)⁴⁷ in adults with severe pdmH1N1 2009 influenza. Another group in Taiwan demonstrated increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-12, and IFN- γ in pediatric patients with influenza A H1N1 virus infection with pulmonary complications.¹⁹ In this study, no significant differences of plasma levels of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α were observed between the mild and severe disease groups. The results were inconsistent with the previous studies in younger adults from Spain¹³ and in children from China^{14,16}, Taiwan¹⁹, Japan⁴⁸ that demonstrated Th1 and Th17 hypercytokinemia in patients with severe influenza. A possible underlying cause of this controversy may be related to the age-related decrease in immune response following influenza infection.⁴⁵ Other possibilities may be due to the transient, temporal and spatial nature of cytokine production and the short plasma half-life of the cytokine/chemokine. In addition, the difference of study design and study subjects, mixed phenotypes of severe influenza, patients with variable symptom onset, the small number of patients with severe disease, the course of disease at the sample collection and the pharmaceutical/non-pharmaceutical interventions may be the limitation and confounding factors in this study. Further investigation in larger and well-defined cohort is recommended to explore the role of cytokine/chemokine, inflammatory mediators in influenza patients with severe respiratory complications.

Conclusion

The present results revealed that increased plasma levels of sTNFRII and decreased sFasL in patients with severe 2009 pandemic influenza might determine dysregulation of immune responses, such as an excessive activation of the role receptors and ligands of the TNF family, modulation of Fas/FasL, and could predict the clinical outcomes and disease severity. Further studies in cellular, molecular and genetic basis

underlying the dysregulation of cytokine pathway and related processes during influenza infection may provide insight into the development of novel therapeutics strategies against severe influenza.

Acknowledgements

This study was supported by the NSTDA Research Chair Grant, National Sciences and Technology

Development Agency (Thailand). We thanked Biomedical Technology Research Center, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Sciences and Technology Development Agency at the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University for

References

1. World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009 - update 102. [cited 2015 May 5]. Available from: http://www.who.int/csr/don/2010_05_28/en/.
2. Iamsrithaworn S, Akarasewi P, Yingyong T, Suthaachana S, Pittayawonganon C, Ungchusak K. Three Waves of the 2009 H1N1 Influenza Pandemic in Thailand. *Siriraj Med J*. 2011; 63: 64–7.
3. Peiris JS, Hui KP, Yen HL. Host response to influenza virus: protection versus immunopathology. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22: 475-81.
4. Short KR, Kroeze EJ, Fouchier RA, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14: 57-69.
5. Pothlichet J, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway. *J Immunol*. 2008; 180: 2034-8.
6. Han Y, Bo ZJ, Xu MY, Sun N, Liu DH. The Protective Role of TLR3 and TLR9 Ligands in Human Pharyngeal Epithelial Cells Infected with Influenza A Virus. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014; 18: 225-31.
7. Michaelis M, Geiler J, Naczek P, Sithisarn P, Leutz A, Doerr HW, et al. Glycyrrhizin exerts antioxidative effects in H5N1 influenza A virus-infected cells and inhibits virus replication and pro-inflammatory gene expression. *PLoS One*. 2011; 6: e19705.
8. Lv J, Wang D, Hua YH, Pei SJ, Wang J, Hu WW, et al. Pulmonary immune responses to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in mice. *BMC Infect Dis*. 2014; 14: 197.
9. Srivastava B, Bazejewska P, Hessmann M, Bruder D, Geffers R, Mauer S, et al. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS One*. 2009; 4: e4857.
10. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*. 2006; 12: 1203-7.
11. Peiris JS, Cheung CY, Leung CY, Nicholls JM. Innate immune responses to influenza A H5N1: friend or foe? *Trends Immunol*. 2009; 30: 574-84.
12. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012; 76: 16-32.
13. Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramirez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2009; 13: R201.

14. Li C, Yang P, Sun Y, Li T, Wang C, Wang Z, et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Cell Res*. 2012; 22: 528-38.
15. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2010; 14: R167.
16. Yu X, Zhang X, Zhao B, Wang J, Zhu Z, et al. Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6. *PLoS One*. 2011; 6: e28680.
17. Kawashima H, Go S, Kashiwagi Y, Morishima Y, Miura T, Ushio M, et al. Cytokine profiles of suction pulmonary secretions from children infected with pandemic influenza A(H1N1) 2009. *Crit Care*. 2010; 14: 411.
18. Estella A. Cytokine levels in bronchoalveolar lavage and serum in 3 patients with 2009 Influenza A(H1N1)v severe pneumonia. *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5: 540-3.
19. Wang SM, Liao YT, Hu YS, Ho TS, Shen CF, Wang JR, et al. Immunophenotype expressions and cytokine profiles of influenza A H1N1 virus infection in pediatric patients in 2009. *Dis Markers*. 2014; 2014: 195453.
20. Peper RL, Van Campen H. Tumor necrosis factor as a mediator of inflammation in influenza A viral pneumonia. *Microb Pathog*. 1995; 19: 175-83.
21. Hussell T, Pennycook A, Openshaw PJ. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol*. 2001; 31: 2566-73.
22. Szretter KJ, Gangappa S, Lu X, Smith C, Shieh WJ, Zaki SR, et al. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice. *J Virol*. 2007; 81: 2736-44.
23. Belisle SE, Tisoncik JR, Korth MJ, Carter VS, Proll SC, Swayne DE, et al. Genomic profiling of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor and interleukin-1 receptor knockout mice reveals a link between TNF-alpha signaling and increased severity of 1918 pandemic influenza virus infection. *J Virol*. 2010; 84: 12576-88.
24. Sato M, Hosoya M, Wright PF. Differences in serum cytokine levels between influenza virus A and B infections in children. *Cytokine*. 2009; 47: 65-8.
25. Achouiti A, van der Meer AJ, Florquin S, Yang H, Tracey KJ, van 't Veer C, et al. High-mobility group box 1 and the receptor for advanced glycation end products contribute to lung injury during *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Crit Care*. 2013; 17: R296.
26. Mauri T, Masson S, Pradella A, Bellani G, Coppadoro A, Bombino M, et al. Elevated plasma and alveolar levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts are associated with severity of lung dysfunction in ARDS patients. *Tohoku J Exp Med*. 2010; 222: 105-12.
27. García-Salido A1, Oñoro G, Melen GJ, Gómez-Piña V, Serrano-González A, Ramírez-Orellana M, et al. Serum sRAGE as a potential biomarker for pediatric bronchiolitis: a pilot study. *Lung*. 2015; 193: 19-23.
28. Hamasaki MY, Barbeiro HV, de Souza HP, Machado MC, da Silva FP. sRAGE in septic shock: a potential biomarker of mortality. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2014; 26: 392-6.
29. Fujikura D, Chiba S, Muramatsu D, Kazumata M, Nakayama Y, Kawai T, et al. Type-I interferon is critical for FasL expression on lung cells to determine the severity of influenza. *PLoS One*. 2013; 8: e55321.
30. Knox PG, Milner AE, Green NK, Eliopoulos AG, Young LS. Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand. *J Immunol*. 2003; 170: 677-85.

31. Fujimoto I, Takizawa T, Ohba Y, Nakanishi Y. Co-expression of Fas and Fas-ligand on the surface of influenza virus-infected cells. *Cell Death Differ.* 1998; 5: 426-31.
32. Wang X, Tan J, Zhao J, Ye Z, Hewlett I. Highly pathogenic avian influenza A virus (H5N1) can be transmitted in ferrets by transfusion. *MC Infect Dis.* 2014; 14: 192.
33. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, Carter V, Perwitasari O, Thomas MJ, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature.* 2006; 443: 578-81.
34. Matute-Bello G, Liles WC, Steinberg KP, Kiener PA, Mongovin S, Chi EY, et al. Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J Immunol.* 1999; 163: 2217-25.
35. Wang X, Tan J, Zoueva O, Zhao J, Ye Z, Hewlett I. Novel pandemic influenza A (H1N1) virus infection modulates apoptotic pathways that impact its replication in A549 cells. *Microbes Infect.* 2014; 16: 178-86.
36. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, Carter V, Perwitasari O, Thomas MJ, et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature.* 2006; 443: 578-81.
37. Fujikura D, Chiba S, Muramatsu D, Kazumata M, Nakayama Y, Kawai T, et al. . Type-I interferon is critical for FasL expression on lung cells to determine the severity of influenza. *PLoS One.* 2013; 8: e55321.
38. Nichols JE, Niles JA, Roberts NJ Jr. Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. *J Virol.* 2001 Jul; 75(13): 5921-9.
39. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* 1997 Dec 15; 186(12): 2045-50.
40. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* 1998; 4: 31-6.
41. Hober D1, Benyoucef S, Bocket L, Chieux V, Lion G, Mouton Y, et al. Soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in HIV-infected patients: relationship with the plasma level of HIV-1 RNA. *Immunol Lett.* 1999; 67: 91-4.
42. Fernández JA, Tapia L, Palomino MA, Larrañaga C, Peña M, Jaramillo H. Plasma interferon-gamma, interleukin-10 and soluble markers of immune activation in infants with primary adenovirus (ADV) and respiratory syncytial virus (RSV) infection. *Eur Cytokine Netw.* 2005; 16: 35-40.
43. Hooper LC, Chin MS, Detrick B, Hooks JJ. Retinal degeneration in experimental coronavirus retinopathy (ECOR) is associated with increased TNF-alpha, soluble TNFR2 and altered TNF-alpha signaling. *J Neuroimmunol.* 2005; 166: 65-74.
44. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis.* 1999; 179: 755-62.
45. Liu WM, van der Zeijst BA, Boog CJ, Soethout EC. Aging and impaired immunity to influenza viruses: implications for vaccine development. *Hum Vaccin.* 2011; 7: 94-8.
46. Narvaez-Rivera RM, Rendon A, Salinas-Carmona MC, Rosas-Taraco AG. Soluble RAGE as a severity marker in community acquired pneumonia associated sepsis. *BMC Infect Dis.* 2012; 12: 15.
47. Bermejo-Martin JF, Martin-Loeches I, Rello J, Antón A, Almansa R, Xu L, et al. Host adaptive immunity deficiency in severe pandemic influenza. *Crit Care.* 2010; 14: R167.
48. Kawashima H, Go S, Kashiwagi Y, Morishima Y, Miura T, Ushio M, et al. Cytokine profiles of suction pulmonary secretions from children infected with pandemic influenza A(H1N1) 2009. *Crit Care.* 2010; 14: 411.

ผลการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์ และความเครียดของเด็กกำพร้า มูลนิธิห่วงใยเด็กกำพร้า จังหวัดเชียงใหม่

The effects of using a guidance activities package to develop life skills for coping with emotion and stress of orphan in the Care Corner Orphanage Foundation, Chiang Mai Province

ยุพาพรรณ ศิริอ้าย¹ สุขอรุณ วงษ์ทิม² นิธิพัฒน์ เมฆขจร³
Yupapan Sirai¹ Sukaroon Wongtim² Nitipat Mekkhachorn³

สาขาวิชาศึกษาศาสตร์ แขนงวิชาการแนะแนวและการปรึกษาเชิงจิตวิทยา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
Master of Education Program in Guidance and Psychological Counseling, Sukhothai Thammathirat Open University

* Corresponding author (Email:yjaruruk@gmail.com)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Objective: The objectives of this research were (1) to compare life skills for coping with emotion and stress of the experimental group of orphans before and after using a guidance activities package; (2) to compare the post-outcomes between the experimental and control group of orphans; and (3) to study the satisfaction of the experimental group of orphans after using the guidance.

Materials and methods: The research samples consisted of 16 purposively selected orphans living in the Care Corner Orphanage Foundation, San Patong District, Chiang Mai Province. The experimental and the control group of orphans were randomly divided (eight orphans per group). The experimental group used a guidance activities package-life skills for coping with emotion and stress. Whereas the control group orphans received traditional guidance activities. The experiment covered 10 sessions each of which lasted for 60 minutes. A life skills assessment scale (emotional and stress coping) was employed tested with reliability coefficient of 0.67. The other materials included the guidance activities package-life skills for coping with emotion and stress; the traditional guidance activities; and the satisfaction questionnaires for the guidance activities package. Statistical analysis was conducted including percentage, mean, Wilcoxon Matched Pairs Signed Ranks Test, and Mann-Whitney U Test.

Results: The findings revealed that (1) The post-scores of the life skills for coping with emotion and stress significantly increased ($p < 0.05$) in the experimental group; (2) The post-scores of life skills for coping with emotion and stress were higher in the experimental group than the others; and (3) The experimental group were satisfied with the guidance activities package.

Conclusions: This study demonstrated the benefit of using the guidance activities package to improve life skills for coping with emotion and stress in the orphans at The Care Corner Orphanage Foundation, Chiang Mai

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 127-135. Doi: 10.14456/jams.2015.7

Keywords: Guidance activities, life skills, orphan

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) เปรียบเทียบทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ากลุ่มทดลอง ก่อนและหลังการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว (2) เปรียบเทียบทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ากลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมหลังการทดลอง และ (3) ศึกษาความพึงพอใจของเด็กกำพร้าต่อชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด

วัสดุและวิธีการ: กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเด็กกำพร้าที่อาศัยอยู่ในมูลนิธิห้วยไคร้เด็กกำพร้า อำเภอสนป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 16 คน ได้มาโดยการเลือกแบบเจาะจง จากนั้นสุ่มอย่างง่ายเพื่อแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 8 คน กลุ่มทดลองใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับการแนะแนวปกติ ดำเนินการทดลองจำนวน 10 ครั้ง ครั้งละ 60 นาที เครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ แบบวัดทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด ซึ่งมีค่าความเที่ยงเท่ากับ 0.67 ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด การแนะแนวปกติ และแบบวัดความพึงพอใจต่อชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย การทดสอบวิลคอกซัน และการทดสอบแมนนิตนีย์

ผลการศึกษา: ผลการวิจัยพบว่า (1) เด็กกำพร้ากลุ่มทดลองมีคะแนนทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดสูงขึ้นภายหลังการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (2) เด็กกำพร้ากลุ่มทดลองที่ใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวมีคะแนนทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดสูงขึ้นมากกว่าของกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และ (3) เด็กกำพร้ากลุ่มทดลองมีความพึงพอใจต่อชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด

สรุปผลการศึกษา: การใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว สามารถพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ามูลนิธิห้วยไคร้เด็กกำพร้า จังหวัดเชียงใหม่ได้

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 127-135. Doi: 10.14456/jams.2015.7

คำรหัส: กิจกรรมแนะแนว ทักษะชีวิต เด็กกำพร้า

บทนำ

เนื่องจากสภาพการเปลี่ยนแปลงของสังคมปัจจุบัน ซึ่งเป็นยุคของความเร็วและความล้ำสมัยของเทคโนโลยี การสื่อสาร ซึ่งจากสภาพสังคมที่เปลี่ยนแปลงอย่างมาก ได้ส่งผลกระทบต่อเด็กวัยเรียน ทั้งการดำเนินชีวิตท่ามกลางกระแสเทคโนโลยีที่เปลี่ยนแปลง ตลอดจนการเผชิญสิ่งยั่วยุหรือตัวแบบที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ทำให้เด็กและเยาวชนเกิดปัญหาด้านการปรับตัว ปัญหาด้านอารมณ์และจิตใจ ปัญหาสุขภาพ ปัญหาความรุนแรง ปัญหาเด็กติดเกม ปัญหายาเสพติด ปัญหาทางเพศ เป็นต้น การปรับตัวและปัญหาสุขภาพจิตด้านพฤติกรรมและอารมณ์ของวัยรุ่นทำให้เกิดความเครียดและนำไปสู่ความคิดฆ่าตัวตาย ความเครียดทำให้มีผลเสียต่อสุขภาพกายและจิตใจและก่อให้เกิดความสูญเสียที่รุนแรงมากขึ้น ประเทศไทยในปี พ.ศ. 2552 พบว่าวัยรุ่นช่วงอายุ 10-19 ปี ร้อยละ 7.66 เป็นโรคทางจิตเวช และกลุ่มที่พบมากที่สุด คือ กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับปัญหาด้านพฤติกรรมและอารมณ์ มีร้อยละ 17.92¹

จากผลการวิจัยติดตามสภาวะการเด็กและเยาวชนในรอบปี 2555 ดร.อมรวิชช์ นาครทรรพ ที่ปรึกษาสถาบันรามจิตติ ในโครงการพัฒนาเครือข่ายการจัดการเชิงพื้นที่เพื่อการวิเคราะห์สภาวะการณ์และขับเคลื่อนการพัฒนาคุณภาพชีวิตเยาวชน (ไซล์ดวอर्थ) โดยการสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.) กล่าวว่า เด็กไทยกว่า 1 ใน 3 ที่ยังขาดทักษะชีวิต ทั้งจากครอบครัว โรงเรียนและชุมชน อยากเห็นทุกฝ่ายเข้าร่วมกันผลักดันการสอนทักษะชีวิตเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันให้เด็กตั้งแต่เล็กอย่างจริงจัง²

ในการจัดการเรียนรู้ที่มีประสิทธิภาพ ให้ผู้เรียนมีทักษะชีวิต เป็นเกราะป้องกันในการที่จะทำให้เด็กและเยาวชนรอดพ้นจากความคิดของสื่อเทคโนโลยี และตั้งรับต่อการก้าวรุกทางสังคมอย่างรู้เท่าทัน การพัฒนาทักษะชีวิตในหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐานพุทธศักราช 2551 เป็นกระบวนการเรียนรู้ที่มุ่งให้ผู้เรียนพัฒนาตนเอง ในด้านความรู้ทักษะและเจตคติ ในการเห็นคุณค่าในตนเองและผู้อื่น การคิดวิเคราะห์ตัดสินใจ ปีที่ 48 ฉบับที่ 2 พฤษภาคม 2558

และแก้ไขปัญหา การจัดการกับอารมณ์และความเครียด และการสร้างสัมพันธภาพที่ดีกับผู้อื่น เพื่อการปรับตัว การป้องกันตนเองในสถานการณ์ต่าง ๆ จัดการกับชีวิตตนเองได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับเป้าหมายของหลักสูตรแกนกลางการศึกษาขั้นพื้นฐาน พุทธศักราช 2551 ที่กำหนดให้ทักษะชีวิตเป็นสมรรถนะสำคัญที่ผู้เรียนทุกคนพึงได้รับการพัฒนา โดยสถานศึกษาต้องจัดการศึกษาให้ผู้เรียนมีคุณภาพตามตัวชี้วัดมาตรฐานการเรียนรู้ทั้ง 8 สาระการเรียนรู้ และคุณลักษณะอันพึงประสงค์ตามเจตนารมณ์ของหลักสูตร³ การแนะแนวเป็นเรื่องสำคัญยิ่งในระบบการศึกษา เป็นเครื่องมือที่จะแก้ปัญหาของนักเรียน โดยการช่วยให้นักเรียนรู้จักและเข้าใจตนเอง รู้จักคิดตัดสินใจด้วยตนเอง มีทักษะในการตัดสินใจ ดังนั้นการพัฒนาทักษะชีวิตให้เกิดขึ้นในตัวผู้เรียน จึงควรคำนึงถึงผู้เรียนเป็นสำคัญเพื่อให้ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้ที่ดี ซึ่งแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจไปใช้เพื่อให้บรรลุเป้าหมายดังกล่าวข้างต้น คือ การใช้กิจกรรมแนะแนว เนื่องจากกิจกรรมแนะแนว เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง ในการนำมาใช้เพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการตระหนักรู้ในตนเอง ความคิดวิเคราะห์ การตัดสินใจ และการแก้ปัญหา การจัดการกับอารมณ์และการสร้างสัมพันธภาพที่ดีต่อผู้อื่นของนักเรียน และเป็นการส่งเสริมพัฒนาผู้เรียน ให้พัฒนาตนเองอย่างเต็มตามศักยภาพ⁴

จากการที่ผู้วิจัยได้สัมภาษณ์เจ้าหน้าที่ผู้ดูแล มูลนิธิห่วงใยเด็กกำพร้า อำเภอสนป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า เด็กที่อาศัยอยู่ที่มูลนิธิฯ เป็นเด็กที่มาจากหลายชนเผ่า เช่น เผ่าม้ง เผ่าลีซอ และเผ่า อาข่า และอาศัยรวมกับเด็กพื้นราบปะปนกัน และปัญหาที่เกิดขึ้นกับเด็กและวัยรุ่นส่วนใหญ่ ได้แก่ ปัญหาทางด้านอารมณ์และพฤติกรรม การขาดความรัก ความอบอุ่น ปัญหาความก้าวร้าว ปัญหาซึมเศร้า โดยเฉพาะในวัยรุ่น ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งพัฒนาการทางด้านร่างกายและจิตใจทำให้พบปัญหาในวัยนี้มากที่สุด และจากบทความเรื่อง ทักษะชีวิต สิ่งสำคัญที่วัยรุ่นต้องสร้าง⁵ แพทย์หญิง ปรภาณี เมืองน้อย กุมารแพทย์-จิตแพทย์เด็กและวัยรุ่น โรงพยาบาลเด็ก กล่าวว่า สำหรับทักษะชีวิตของวัยรุ่นยุคนี้ สิ่งที่เป็นปัญหามากที่สุด เป็นเรื่องทักษะที่เกี่ยวกับสังคม เช่น การสร้างสัมพันธภาพกับคนอื่น การจัดการกับความโกรธซึ่งมีความสำคัญมาก นอกจากนี้ก็มีเรื่องทักษะการตัดสินใจ และการวางแผนชีวิต เรื่องพวกนี้มีผลต่อการปรับตัวในสังคม และการใช้ชีวิตในอนาคต ปัจจุบันข่าวปัญหายูธรุ่นต่างๆ ที่เกิดขึ้นนั้น ส่วนมากมีสาเหตุมาจากการขาดทักษะชีวิต โดยเฉพาะเรื่องการควบคุมอารมณ์ ทักษะเรื่องการตัดสินใจ การคิด และการยับยั้งตัวเอง ทักษะชีวิตทั้งหมดที่กล่าวมานั้นเป็นสิ่งที่ต้องฝึกฝน หากวัยรุ่นทำได้พวกเขาจะมีความสุขกับการใช้ชีวิตมากขึ้น

จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า เด็กกำพร้าวัยรุ่น ควรได้รับการส่งเสริมและพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด ซึ่งเป็นทักษะที่จะช่วยให้เด็กกำพร้ามีความเข้าใจและรู้เท่าทันภาวะอารมณ์ของบุคคล ทั้งของตนเองและผู้อื่น รู้สาเหตุของความเครียด รู้วิธีการควบคุมอารมณ์และความเครียด รู้วิธีผ่อนคลาย หลีกเลี้ยงและปรับเปลี่ยนพฤติกรรมที่ก่อให้เกิดอารมณ์ที่ไม่พึงประสงค์ไปในทางที่ดีได้ และกิจกรรมแนะแนวเป็นเครื่องมือหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการกับอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้าได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด ให้กับกลุ่มเด็กกำพร้าวัยรุ่นที่อาศัยอยู่ในมูลนิธิเด็กกำพร้า อำเภอสนป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อให้บังเกิดผลตามสภาพที่พึงประสงค์ โดยการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ากลุ่มทดลอง ก่อนและหลังการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว เพื่อเปรียบเทียบทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ากลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมหลังการทดลองและเพื่อศึกษาความพึงพอใจของเด็กกำพร้าต่อการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด โดยมีสมมติฐานการวิจัย คือ เด็กกำพร้าที่ได้รับชุดกิจกรรมแนะแนวมีคะแนนทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดสูงขึ้นกว่าก่อนการทดลอง เด็กกำพร้ากลุ่มทดลองที่ได้รับกิจกรรมแนะแนวมีคะแนนทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดสูงกว่าเด็กกำพร้ากลุ่มควบคุมที่ได้รับการแนะแนวปกติ และความพึงพอใจที่มีต่อชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดอยู่ในระดับมาก

วัสดุและวิธีการ

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย คือเด็กกำพร้าที่อาศัยอยู่ที่มูลนิธิห่วงใยเด็กกำพร้า อำเภอสนป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 35 คน และกลุ่มตัวอย่าง คือเด็กกำพร้าที่อาศัยอยู่ที่มูลนิธิห่วงใยเด็กกำพร้า อำเภอสนป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่จำนวน 16 คน ที่ได้มาจากการเลือกแบบเจาะจง จากนั้นจึงสุ่มอย่างง่ายแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กลุ่มละ 8 คน

2. ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษา

ตัวแปรอิสระ คือ วิธีการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด

ตัวแปรตาม คือ ทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด

3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่

3.1 แบบวัดทักษะชีวิตด้านการจัดการกับอารมณ์และความเครียด ที่ผู้วิจัยสร้างขึ้น ตามองค์ประกอบทักษะชีวิตระดับมัธยมศึกษา ในองค์ประกอบด้านการจัดการกับอารมณ์และความเครียด ของสำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน กระทรวงศึกษาธิการ จำนวน 24 ข้อ แบ่งออกเป็น 4 ด้านคือ ด้านที่ 1 ประเมินและรู้เท่าทันสภาวะอารมณ์ที่เกิดขึ้นกับตนเอง จำนวน 7 ข้อ

ด้านที่ 2 จัดการความขัดแย้งต่างๆ ได้ด้วยวิธีที่เหมาะสม จำนวน 5 ข้อ

ด้านที่ 3 คลายเครียดด้วยวิธีการที่สร้างสรรค์ จำนวน 4 ข้อ

ด้านที่ 4 รู้จักสร้างความสุขให้กับตนเองและผู้อื่น จำนวน 8 ข้อ

การตรวจสอบความตรงตามเนื้อหาโดยผู้เชี่ยวชาญ จำนวน 5 ท่าน พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง (IOC : Index of item Objective Congruence) เท่ากับ 0.60-1.00 ค่าอำนาจจำแนก และความเชื่อมั่นของเครื่องมือ โดยใช้สูตรสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แอลฟาของครอนบาค (Cronbach's Alpha Coefficient) ได้ค่าเท่ากับ 0.67

3.2 กิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด จำนวน 10 กิจกรรม ผู้วิจัยได้สร้างกิจกรรมขึ้น โดยอิงตามพฤติกรรมทักษะชีวิตที่คาดหวังและตัวชี้วัด ตามองค์ประกอบทักษะชีวิตระดับมัธยมศึกษา ในองค์ประกอบด้านการจัดการกับอารมณ์และความเครียด ของสำนักวิชาการและมาตรฐานการศึกษา สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน กระทรวงศึกษาธิการ³ และปรับปรุงกิจกรรมตามคู่มือการจัดกิจกรรมเพื่อส่งเสริมทักษะชีวิตสำหรับเด็ก ของกรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข⁴ และคู่มือการจัดกิจกรรมเพื่อสอนทักษะชีวิตสำหรับเยาวชนของสำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม⁵ การตรวจสอบความตรงตามเนื้อหาโดยผู้เชี่ยวชาญ จำนวน 5 ท่าน พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง (IOC : Index of item Objective Congruence) เท่ากับ 0.80-1.00

3.3 แบบวัดความพึงพอใจในกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด ซึ่งได้ปรับปรุงมาจาก แบบสำรวจความคิดเห็นของนักเรียนที่ใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวโดยใช้กิจกรรมกลุ่ม เพื่อเสริมสร้างวุฒิภาวะทางอาชีพของสุพัตรา ถนอมรัตน์⁶ ในการศึกษาวิจัยผลการพัฒนาชุดกิจกรรมแนะแนวโดยใช้กิจกรรมกลุ่มเพื่อเสริมสร้างวุฒิภาวะทางอาชีพของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนเบญจมานูสรณ์ จังหวัดจันทบุรี จำนวน 10 ข้อ

การตรวจสอบความตรงตามเนื้อหาโดยผู้เชี่ยวชาญ จำนวน 5 ท่าน พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง (IOC: Index of item Objective Congruence) เท่ากับ 0.60-1.00

4. การเก็บรวบรวมข้อมูล ผู้วิจัยได้ดำเนินการเป็นขั้นตอนตามลำดับ ดังนี้

4.1 ประสานงานกับเจ้าหน้าที่มูลนิธิห่วงใยเด็กกำพร้า เพื่อบริหาร กำหนดช่วงระยะเวลา วันที่ทำการเก็บรวบรวมข้อมูล

4.2 จัดเตรียมแบบสอบถามวัดทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด ให้เพียงพอกับจำนวนนักเรียนที่เป็นกลุ่มตัวอย่าง จากนั้นนำแบบสอบถามไปเก็บรวบรวมข้อมูล ก่อนการทดลองกับเด็กกำพร้ากลุ่มตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 18 คน

4.3 จัดกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดให้กับเด็กกำพร้ากลุ่มทดลอง จำนวน 9 คน โดยการจัดกิจกรรมแนะแนวทั้งหมด 10 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 ปฐมนิเทศ และให้กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมทำแบบวัดทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์ และความเครียดก่อนจัดกิจกรรมแนะแนว

ครั้งที่ 2 กิจกรรม เรียนรู้อารมณ์

ครั้งที่ 3 กิจกรรม อารมณ์จัดการได้

ครั้งที่ 4 กิจกรรม เรียนรู้ความขัดแย้ง

ครั้งที่ 5 กิจกรรม ความสันติ

ครั้งที่ 6 กิจกรรม เรียนรู้ความเครียด

ครั้งที่ 7 กิจกรรม คลายเครียดกันเถอะ

ครั้งที่ 8 กิจกรรม สร้างสุขได้ด้วยตัวเรา

ครั้งที่ 9 กิจกรรม การคิดเชิงบวก

ครั้งที่ 10 ปักฉันทิเทศ และให้กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมทำแบบวัดทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์ และความเครียดและทำแบบวัดความพึงพอใจในกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดหลังจัดกิจกรรมแนะแนว

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ส่วนที่ 1 การเปรียบเทียบคะแนน ทักษะชีวิตด้านการจัดการกับอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้า ก่อนการทดลองและหลังการทดลอง และเปรียบเทียบคะแนน ทักษะชีวิตด้านการจัดการกับอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ากลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม สถิติที่ใช้ได้แก่ การทดสอบวิลคอกชันและการทดสอบแมนนิตนีย์

ส่วนที่ 2 การวัดความพึงพอใจในกิจกรรมแนะแนว เพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ ค่าเฉลี่ยและ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษา

1. การเปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้าก่อนการทดลอง ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม พบว่า

ก่อนการทดลอง เด็กกำพร้าทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม มีคะแนนทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Comparison of the difference score for coping with emotions and stress among the experimental group orphans and control group orphans before using a guidance activities package.

Sample	n	Median	Q.D.	The Mann-Whitney U Test	p-value
Experiment group	8	3.29	0.54	0.00	1.00
Control group	8	3.25	0.34		

2. การเปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนน ทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้าก่อนและหลัง การใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว พบว่า ภายหลัง

การใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว เด็กกำพร้ามีคะแนนจากแบบวัดทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 Comparison of the difference score for coping with emotions and stress of the experimental group orphans before and after using a guidance activities package.

Experiment group	n	Median	Q.D.	The Wilcoxon matched Pairs signed ranks test	p-value
Before	8	3.29	0.54	-2.52	0.01*
After	8	3.77	0.71		

* $p < 0.05$

3. การเปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนน ทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้าภายหลังการทดลอง ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม พบว่า ภายหลังจากการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว คะแนนทักษะชีวิต

ด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ากลุ่มทดลองสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 Comparison of the difference score for life skills for coping with emotion and stress among the experimental group orphans and the control group orphans after using a guidance activity package.

Sample	n	Median	Q.D.	The Mann-Whitney U Test	p-value
Experiment group	8	3.77	0.71	-2.32	0.02 *
Control group	8	3.21	0.21		

* $p < 0.05$

4. การศึกษาความพึงพอใจของเด็กกำพร้าต่อการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด พบว่า ความพึงพอใจของเด็กกำพร้าที่มีต่อการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียด มีค่าเฉลี่ยอยู่ในระดับมากทุกหัวข้อ โดยมีค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) เท่ากับ 4.23 และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.71

วิจารณ์ผลการศึกษา

2.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ภายหลังการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว เด็กกำพร้ามีทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดสูงขึ้นกว่าก่อนการจัดกิจกรรมแนะแนวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานข้อที่ 1 ทั้งนี้เนื่องจากชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดที่ผู้วิจัยสร้างขึ้น ได้ดำเนินการสร้างอย่างถูกต้องตามเป้าหมาย และเป็นไปตามหลักการพัฒนากิจกรรมแนะแนว ได้แก่ การกำหนดวัตถุประสงค์การจัดกิจกรรมในแต่ละครั้ง จากนั้น จึงกำหนดเนื้อหาสาระการเรียนรู้ให้ตรงตามวัตถุประสงค์ในการจัดกิจกรรม การกำหนดขอบข่ายและขั้นตอนของกิจกรรมประกอบด้วย ขั้นนำเข้าสู่กิจกรรม ขั้นดำเนินกิจกรรม ขั้นสรุปกิจกรรม และขั้นประเมินผล โดยสอดคล้องกับคำกล่าวของคันทิงกิสและเดอโบลท์⁹ กล่าวว่า ปัจจัยของการพัฒนาการจัดกิจกรรมขึ้นอยู่กับหลายส่วน เช่น การสนับสนุนจากหน่วยงานที่สังกัด ความร่วมมือขององค์กรต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง แต่หัวใจสำคัญอยู่ที่ตัวของผู้จัดกิจกรรมเองที่จะต้องศึกษา ทำความเข้าใจงานของตนให้กระจ่าง ว่าต้องทำอะไร ทำใ้ใคร ทำอย่างไร ทำแล้วได้อะไร แล้วนำความรู้ ความเข้าใจเหล่านั้นมาเป็นแนวทางในการพัฒนากิจกรรมแนวทางในการจัดกิจกรรมแนะแนวให้ได้ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

ผู้วิจัยยังได้เน้นการจัดกิจกรรมที่มุ่งให้เด็กกำพร้าสามารถนำผลการเรียนรู้จากกิจกรรมไปใช้ประโยชน์ โดยใช้แนวทางการเรียนรู้แบบมีส่วนร่วม (participatory learning) ที่เน้นการเรียนรู้เชิงประสบการณ์ (experiential learning) และการเรียนรู้ด้วยกระบวนการกลุ่ม (group process learning) ตามวงจรการเรียนรู้ (four phases of the learning cycle) คือ “แลกเปลี่ยนประสบการณ์ สะท้อนกลับการรับรู้ สรุปสาระสู่ชีวิตและคิดและนำไปปฏิบัติ”⁹ และได้เลือกใช้เครื่องมือและสื่อประกอบกิจกรรมแนะแนว ในการสร้างความสนใจ กระตุ้นการมีส่วนร่วม ส่งเสริมการคิด สนับสนุนการแก้ปัญหา สร้างความประทับใจ ฯลฯ ให้ตรงกับวัตถุประสงค์ของกิจกรรมแต่ละครั้งและตรงกับวัยของผู้ร่วมกิจกรรมที่เป็นวัยรุ่น และประเมินคุณภาพกิจกรรมแนะแนวแต่ละครั้งโดยการสังเกตและการสอบถามหลังจากการทำกิจกรรม เพื่อนำมาปรับปรุงกิจกรรมในครั้งถัดไป จากกระบวนการเหล่านี้ทำให้เด็กกำพร้าเกิดความรู้ ความเข้าใจ และสามารถพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดให้เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งผลการวิจัยมีความสอดคล้องกับการวิจัยของ สิริวรรณ มณีโชติ¹⁰ เรื่องการพัฒนาชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างทักษะชีวิตของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 ผลการวิจัยพบว่า ทักษะชีวิตของนักเรียนหลังการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างทักษะชีวิตของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 สูงกว่าก่อนใช้ชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างทักษะชีวิตของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ สนิท วงศ์ธิดา¹¹ เรื่องการพัฒนาชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างความฉลาดทางอารมณ์ของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 2 โรงเรียนแม่สายประสิทธิ์ศาสตร์ จังหวัดเชียงราย พบว่า ภายหลังจากการใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว นักเรียนมีความฉลาดทางอารมณ์เพิ่มขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 และงานวิจัยของ กาญจนา สุพรรณคง¹² ได้ศึกษาผลของกิจกรรมแนะแนวเพื่อเสริมสร้างความฉลาดทางอารมณ์ของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนอัสสัมชัญลำปาง ผลการวิจัยพบว่าหลังการทำกิจกรรมแนะแนว นักเรียนมีระดับความฉลาดทางอารมณ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทั้ง 3 ด้าน คือ เก่ง ดี และสุข

2.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า เด็กกำพร้ากลุ่มทดลอง ที่ได้รับชุดกิจกรรมแนะแนวมีคะแนนทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดสูงกว่าเด็กกำพร้ากลุ่มควบคุมที่ได้รับการแนะแนวแบบปกติ หลังการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานข้อที่ 2 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การที่กลุ่มทดลองได้เข้าร่วมกิจกรรมเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดทั้งหมด 10 ครั้ง เป็นเวลาดิตต่อกัน 4 สัปดาห์ และในการเข้าร่วมกิจกรรม เด็กมีความเต็มใจต่อการเข้าร่วมทำกิจกรรม มีโอกาสทำกิจกรรมที่หลากหลาย สมาชิกมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันอย่างเต็มที่ และได้ลงมือปฏิบัติกิจกรรมต่างๆ ด้วยตนเอง ได้ร่วมกันคิด วิเคราะห์ และอภิปรายแลกเปลี่ยนประสบการณ์ และความคิดเห็นระหว่างสมาชิกภายในกลุ่ม เพื่อนำไปสู่การสรุปที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของกิจกรรมในแต่ละครั้ง จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้กลุ่มทดลองได้รับประสบการณ์ ความรู้ ความเข้าใจ เกี่ยวกับตนเองและผู้อื่น มีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการกับอารมณ์และความเครียดได้มากขึ้นโดยสอดคล้องกับคำกล่าวของ สมร ทองดี และปราณี รามสูตร⁹ กล่าวว่า การจัดกิจกรรมแนะแนวเป็นกลุ่ม ผู้แนะแนวควรพิจารณาเลือกให้เหมาะสม และสอดคล้องกับสถานการณ์ ได้แก่ผู้รับบริการ เต็มใจหรือไม่มีปัญหาใดจนเป็นอุปสรรคต่อการทำกิจกรรมเป็นกลุ่มผู้รับบริการมีความพร้อมในการแสดงตนหรือในการทำกิจกรรมร่วมกับผู้อื่น และมีแนวโน้มปรับตัวได้ดี หรือเรียนรู้การปรับตัวได้ในการทำกิจกรรมกลุ่มร่วมกับผู้อื่น และมุ่งเสริมสร้างพัฒนาหรือแก้ปัญหาเกี่ยวกับทักษะสังคมไปพร้อมๆ กับเป้าหมายอื่นของการจัดกิจกรรมแนะแนวในครั้งนั้นด้วย เช่น ทักษะการแสดงการยอมรับความมีวินัย ความมีน้ำใจ การสื่อสารเชิงบวก ความสามัคคี ความเป็นผู้นำ ผู้ตาม การปรับตัว การตระหนักในความแตกต่างระหว่างบุคคล เป็นต้น และยังสอดคล้องกับคำกล่าวของ พนม ลิ้มอารีย์¹³ ได้กล่าวถึงประโยชน์ของกิจกรรมกลุ่ม มีใจความว่า กลุ่มเป็นที่ช่วยฝึกทักษะในการคิดพิจารณาและแก้ปัญหาต่างๆ โดยแลกเปลี่ยนประสบการณ์ทัศนคติความคิดเห็นการให้กำลังใจซึ่งกันและกัน นอกจากนี้เป็นการสะท้อนให้สมาชิกได้พิจารณาเห็นแนวทางแก้ไข ปรับปรุงตนเอง ซึ่งผลการวิจัยมีความสอดคล้องกับการวิจัยของ ณัฐพงศ์ สิงห์สาทร และ

จุฬารัตน์ โสตะ¹⁴ ได้ศึกษาผลของโปรแกรมส่งเสริมสุขภาพจิตโดยประยุกต์ทักษะชีวิตร่วมกับกระบวนการกลุ่มในนักเรียนระดับมัธยมศึกษา ผลการศึกษาพบว่า หลังการทดลอง คะแนนความรู้เกี่ยวกับสุขภาพจิตและการป้องกันปัญหาสุขภาพจิต คะแนนทักษะชีวิตทุกด้านและคะแนนการปฏิบัติตัวในการป้องกันปัญหาสุขภาพจิตของกลุ่มที่ได้รับโปรแกรมส่งเสริมสุขภาพจิตด้วยทักษะชีวิตร่วมกับกระบวนการกลุ่มสูงกว่ากลุ่มเปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสอดคล้องกับผลการวิจัยของ วราภรณ์ ชมพูนาน และพรณี บัญชรหัตถกิจ¹ ได้ศึกษาผลของโปรแกรมการพัฒนาทักษะชีวิตในการส่งเสริมพฤติกรรมจัดการความเครียดของนักศึกษาหลักสูตรประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูงเวชกิจฉุกเฉิน วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดขอนแก่น ผลการศึกษาพบว่าจากผลการศึกษาตัวแปร 8 ตัว พบว่าความรู้ในการจัดการความเครียด ทักษะชีวิตด้านความคิดสร้างสรรค์และคิดอย่างมีวิจารณญาณ ความตระหนักรู้ในตนเองและความเห็นใจผู้อื่น ความภูมิใจในตนเองและความรับผิดชอบต่อสังคม การสื่อสารและการสร้างสัมพันธภาพ การตัดสินใจและแก้ปัญหาการจัดการกับอารมณ์และความเครียดและระดับความเครียดภายหลังการทดลอง พบว่า กลุ่มทดลองมีคะแนนทักษะชีวิตทั้ง 8 ตัวแปร สูงกว่าก่อนทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ของกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม พบว่า กลุ่มทดลองมีคะแนนความสามารถด้านทักษะชีวิตทุกตัวแปรสูงกว่ากลุ่มเปรียบเทียบ และระดับความเครียดของกลุ่มทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสอดคล้องกับผลการวิจัยของ อรุณญา วันกิง¹⁵ ได้ศึกษาผลของกิจกรรมกลุ่มเพื่อพัฒนาความเจตียวฉลาดทางอารมณ์ด้านการจัดการอารมณ์ของตนเอง ของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 2 โรงเรียนบุรีรัมย์พิทยาคม จังหวัดบุรีรัมย์ ผลการวิจัยพบว่า นักเรียนมีความเจตียวฉลาดทางอารมณ์ด้านการจัดการอารมณ์ของตนเอง หลังจากที่ได้เข้าร่วมกิจกรรมกลุ่มเพื่อพัฒนาความเจตียวฉลาดทางอารมณ์ด้านการจัดการอารมณ์ของตนเองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และนักเรียนที่ได้เข้าร่วมกิจกรรมกลุ่มเพื่อพัฒนาความเจตียวฉลาดทางอารมณ์ด้านการจัดการอารมณ์ของตนเองสูงกว่านักเรียนที่ไม่ได้เข้าร่วมกิจกรรมกลุ่มเพื่อพัฒนาความเจตียวฉลาดทางอารมณ์ ด้านการจัดการอารมณ์ของตนเองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

2.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า เด็กกำพร้ามีความพึงพอใจต่อชุดกิจกรรมแนะแนวเพื่อพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดอยู่ในระดับมาก ซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานข้อที่ 3 ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกลุ่มทดลองเป็นวัยรุ่น

ซึ่งธรรมชาติตามวัยจะให้ความสำคัญกับการมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับผู้อื่น ต้องการการยอมรับ มีพลังมากทั้งด้านร่างกาย ความคิดและปัญญา สนใจความแปลกใหม่^๑ และผู้วิจัยได้เน้นแนวทางการจัดกิจกรรมแบบกลุ่ม เพื่อส่งเสริมปฏิสัมพันธ์ต่อกัน ทั้งกิจกรรมระหว่างเพศเดียวกัน หรือต่างเพศ มุ่งเน้นกิจกรรมที่มีการแลกเปลี่ยนความคิดเห็น ทำให้เกิดด้านการยอมรับกัน และส่งเสริมกิจกรรมประเภทที่ได้แสดงออกที่ให้เด็กได้ลงมือปฏิบัติให้ได้มากที่สุด และผู้วิจัยได้ใช้สื่อเกม เพลง คลิปวิดีโอ กระบวนการกลุ่มฯ เข้าประกอบในการจัดกิจกรรม ทำให้เด็กกำพร้าได้ประสบการณ์และสามารถนำผลการเรียนรู้จากกิจกรรมไปใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันได้ ซึ่งสอดคล้องกับ

งานวิจัยของ สุพัตรา ถนอมรัตน์^๑ ได้ศึกษาความคิดเห็นของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 ที่มีต่อชุดกิจกรรมแนะแนวโดยใช้กิจกรรมกลุ่มเพื่อเสริมสร้างวุฒิภาวะทางอาชีพ มีค่าเฉลี่ยอยู่ในระดับความเหมาะสมมากที่สุด

สรุปผลการศึกษา

การใช้ชุดกิจกรรมแนะแนว สามารถพัฒนาทักษะชีวิตด้านการจัดการอารมณ์และความเครียดของเด็กกำพร้ามูลนิธิห่วงใยเด็กกำพร้า จังหวัดเชียงใหม่ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Chompoopan W, Banchonhattakit P. Effects of development program of life skills on stress management behavior promotion among the emergency medical technician students of Sirindhorn College of Public Health, Khon Kaen.Srinagarind Medical Journal 2012; 27(3): 302-9 (in Thai)
2. Thailand News. Worried about Thai children in year 2012, lack of life skills, alcohol and tobacco dependence. Online; 2555,27 December : <http://www.mcot-web.mcot.net/9ent/site/view/id/50dbe7a5150ba08f5700021d>. (in Thai)
3. Bureau of Academic Affairs and Educationnal Standards.Guidelines for the development of life skills (draft). 2551: 1-16. (in Thai)
4. Jarujit E. The effects of the guidance activities package to develop life skill for Mattayom sukso 2 students. Yothinburana School;2553.<http://www.krupunmai.com/blog-id522.html>. (in Thai)
5. Matichon.Report on the situation .Children “orphaned - AIDS” in Thailand. Matichon: Online. 2549,12 November): <http://www.teenpath.net/content.asp?ID=1708#.VK-HKtKsUo8>. (in Thai)
6. Sukmark K. Training Manual for enhancing life skills for children. 2nd edition Bangkok, Department of Mental Health; 2541. (in Thai)
7. Office of the narcotics control board. Life Skills for Youth : A Drug Abuse Prevention Training Manual. Nonthaburi; 2549. (in Thai)
8. Tanomrat S, Sabaiying W, Wihoktoe P. The effects of development of the guidance activities package based on group activities to enhance vocational MathayomSukso III Students of Benjamasorn School, Chanthaburi Province. The 2nd STOU Graduate Research Conference, Sukhothai Thammathirat Open University : 1-9. (in Thai)
9. Thongdee S,Ramsuit P. Scope to develop guidance activities In:Development of guidance and psychological counseling and instruments. unit 9 :Sukhothai Thammathirat Open University.Nonthaburi: 11-27. (in Thai)
10. Maneechort S. Development of guidance activities package to enhance life skills of Mathayom Sukso 3 students, Thasalaprasitsukso schools.Thasala District. Nakhon Si Thammarat Province.<https://www.gotoknow.org/posts/413825>. (in Thai)
11. Wongthida S. Development of guidance activities package to enhance emotional intelligence of Mathayom sukso 2 students, Maesaiprasitsart schools science, Chiang Rai Province. Sukhothai Thammathirat Open University; 2546 : http://www.dric.nrct.go.th/bookdetail.php?book_id=181661. (in Thai)

12. Suphankong K. Using guidance activities to enhance emotional quetients of Mathayom suksa 3 students, Assumption College Lampang.(Thesis Chiangmai): Chiangmai University; 2550. (in Thai)
13. Nokchareon S. Using group activities to develop life skills to cope with emotion of youths in Ban Bueng Juvenile Training Center, Chon Buri Province. (Thesis Chiangmai):Chiangmai University; 2551. (in Thai)
14. Singsatorn N, Sota C. Preliminary report : Mental health promotion program by life skills among secondary school students.Journal of Mental Health of Thailand.2012; 20(3): 174-83. (in Thai)
15. Wanking A. The effects of guidance activities to develop emotional intelligence, emotional self-management of Mattayom suksa 2 students.Burirampittayakom school. Buriram province. Thesis Srinakharinwirot University; 2546. (in Thai)

การตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^*A , FY^*B และ FY^*X ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

Detection of FY^*A , FY^*B and FY^*X genotypes in Duffy blood group system by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

■ พูนทรัพย์ ผลาจรศักดิ์^{1*} ลักษมี จรัสศรี² พียดา คงเทศน์³
Poonsub Palacajornsuk^{1*} Laksamee Jamrassri² Phiyada Kongtes³

¹ แผนกวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹ Division of Transfusion Sciences, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

² ห้องปฏิบัติการชันสูตร โรงพยาบาลคลองขลุง จังหวัดกำแพงเพชร

² Laboratory Public Health, Klong Klung Hospital

³ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และรังสีวิทยา โรงพยาบาลพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก

³ Medical and Radical Laboratory, Promphiram Hospital

* Corresponding author (E-mail: poonsub@yahoo.com)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Research problems: Serology method is the most commonly used for Duffy blood group phenotyping. This method is simple, convenient and inexpensive. However, mutation of FY^* gene at position C265T can cause a weak expression of Fy^b antigen and may not be detected by anti- Fy^b which lead to false negative by serology testing. The objective of this study is to detect FY^*A , FY^*B and FY^*X genotypes in Duffy blood group system by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP).

Materials and methods: Ninety seven samples were tused for phenotyping of Fy^a and Fy^b by serology method and the DNA was extracted for detect FY^*A and FY^*B genotype by PCR-SSP.

Results: Phenotyping of 97 samples showed that 78 samples (80.41%) were $Fy(a+b-)$ and 19 samples (19.59%) were $Fy(a+b)$. Seventy-eight DNA samples of $Fy(a+b-)$ were then detected for FY^*X genotype at position C265T by PCR-SSP. The results showed no C265T mutation in all tested samples. The comparison results between serology and PCR-SSP methods were concordant.

Conclusions: PCR-SSP can be as alternative method to detect FY^*A , FY^*B and FY^*X genotype in Duffy blood group system for selecting suitable blood to the patient who has anti- Fy^a and/or anti- Fy^b in order to prevent adverse effects of transfusion reaction and investigate for the cause of hemolytic disease of the newborn.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 136-143. Doi: 10.14456/jams.2015.11

Keywords: Genotype, FY^*A , FY^*B , FY^*X , Duffy, PCR-SSP

บทคัดย่อ

ที่มาของปัญหาวิจัย: การตรวจหาฟีโนไทป์ของ Fy^a และ Fy^b ในหมู่เลือดระบบ Duffy นิยมใช้วิธีทางซีโรโลยี ข้อดี คือ ง่าย สะดวก และประหยัด แต่หากจีโนไทป์เป็น FY^X ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน Duffy ที่ตำแหน่ง C265T ทำให้มีการแสดงออกอย่างอ่อนของแอนติเจน Fy^b อาจตรวจไม่พบโดยใช้ anti- Fy^b การตรวจทางซีโรโลยีอาจพบความแรงของปฏิกิริยาต่ำทำให้อ่านเป็นผลลบได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^A , FY^B และ FY^X ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

วัสดุและวิธีการ: นำตัวอย่างเลือด จำนวน 97 ราย มาตรวจหาฟีโนไทป์ของแอนติเจน Fy^a และ Fy^b ด้วยวิธีซีโรโลยี ตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^A , FY^B และ FY^X ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

ผลการศึกษา: พบ $Fy(a+b-)$ จำนวน 78 ราย (80.41%) และ $Fy(a+b+)$ จำนวน 19 ราย (19.59%) สกัด DNA จากตัวอย่างเลือด เพื่อนำไปตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^A และ FY^B ด้วยวิธี PCR-SSP พบว่าการตรวจหาฟีโนไทป์ของแอนติเจน Fy^a และ Fy^b ด้วยวิธีซีโรโลยีให้ผลสอดคล้องกับการตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^A และ FY^B นำ DNA ที่มีฟีโนไทป์ $Fy(a+b-)$ มาตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^X ไม่พบการกลายพันธุ์ของจีโนไทป์ที่ตำแหน่งนี้

สรุปผลการศึกษา: ดังนั้นวิธี PCR-SSP สามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^A , FY^B และ FY^X ในหมู่เลือดระบบ Duffy และมีประโยชน์ในการช่วยเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยที่มี anti- Fy^a และ/หรือ anti- Fy^b เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์หลังจากได้รับเลือด และช่วยหาสาเหตุของภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในเด็กแรกคลอดได้

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 136-143. Doi: 10.14456/jams.2015.11

คำรหัส: จีโนไทป์, FY^A , FY^B , FY^X , Duffy, PCR-SSP

บทนำ

แอนติเจน Fy^a และ Fy^b ของหมู่เลือดระบบ Duffy มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ co-dominant สามารถตรวจพบ phenotypes ได้ 4 แบบ คือ $Fy(a-b+)$, $Fy(a+b-)$, $Fy(a-b-)$ และ $Fy(a+b+)$ ความถี่ของ phenotype ในหมู่เลือดระบบ Duffy แตกต่างกันไปในประเทศแต่ละประเทศ ในประชากรไทยพบ $Fy(a+b-)$ มากที่สุด รองลงมาพบ $Fy(a+b+)$ ส่วน $Fy(a-b+)$ พบน้อย และ $Fy(a-b-)$ พบน้อยมาก¹⁻⁶

แอนติเจนของหมู่เลือดระบบ Duffy เป็น glycoprotein และทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ของเชื้อมาลาเรีย ชนิด *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium knowlesi* โดยแอนติเจน Duffy ทำหน้าที่เป็นตัวรับโปรตีนที่ยึดเกาะบนผิวเซลล์ของเชื้อในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง คือ ระยะ merozoite โปรตีนที่ใช้ในการยึดเกาะเรียกว่า merozoite ligand บริเวณส่วนปลายของเชื้อ เรียกว่า apical end ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วน คือ microneme และ rhoptry ที่มีความจำเพาะต่อการเข้าจับกับ glycoprotein ชนิดต่าง ๆ⁷ ดังนั้นคนที่มี phenotype เป็น $Fy(a-b-)$ ซึ่งไม่มีแอนติเจน Duffy จึงไม่พบการติดเชื้อ ประชากรในแอฟริกาตะวันตกส่วนใหญ่เป็น $Fy(a-b-)$ ⁸⁻¹⁰ หากนำเม็ดเลือดแดงที่มี

แอนติเจนของหมู่เลือด Duffy ไป treat ด้วย proteolytic enzyme พบว่า receptor ของ Fy^a และ Fy^b จะถูกกำจัดออกไปทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้^{1, 2}

ยีนที่กำหนดการสร้างแอนติเจนของหมู่เลือดระบบ Duffy มี 4 alleles อยู่บน exon ที่ 2 ของโครโมโซมที่ 1 (1q22-q23) ยีน FY^A และ FY^B มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันที่ตำแหน่ง 125G>A และมีกรดอะมิโนแตกต่างกัน คือ Gly42Asp โดย FY^A กำหนดการสร้างแอนติเจน Fy^a ($Fy(a+)$) และ FY^B กำหนดการสร้างแอนติเจน Fy^b ($Fy(b+)$) สำหรับ FY^FY มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันที่ตำแหน่ง -33T>C ที่ GATA-1 binding motif ของ FY^A และ FY^B ผู้มียีนแบบ FY^FY ไม่สามารถสร้างแอนติเจน Fy^a และ Fy^b ($Fy(a-b-)$) ส่วน FY^X มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 265C>T และมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเป็น Arg89Cys ยีน FY^X สร้างแอนติเจน Fy^b ได้ปริมาณน้อย เมื่อนำเลือดของคนที่มียีนไทป์เป็น FY^X มาทำปฏิกิริยากับ Anti- Fy^b จะไม่พบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง^{1-2, 11-12}

แอนติบอดีของหมู่เลือดระบบ Duffy เป็นชนิด immune type (IgG) สามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 37 °C

จากการถูกกระตุ้นโดยเม็ดเลือดแดงจากการรับเลือดหรือเคยตั้งครรภ์ แม้ว่าแอนติบอดีในระบบนี้ไม่ตรึงคอมพลีเมนต์ แต่มีความสำคัญทางคลินิก เพราะส่งผลให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย และมีอายุสั้นกว่าปกติหลังจากได้รับเลือด (hemolytic transfusion reaction, HTR) และ/หรือเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในเด็กแรกคลอดได้ (hemolytic disease of the newborn, HDN) ดังนั้นหากพบแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยจำเป็นต้องนำเลือดที่ไม่มีแอนติเจนที่ตรงกับแอนติบอดีที่พบไปให้แก่ผู้ป่วย¹⁻²

การตรวจหา Fy^a และ Fy^b แอนติเจน ใช้วิธีทางซีโรโลยี โดยนำเม็ดเลือดแดงมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะและอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง วิธีนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจน้อย แต่มีข้อจำกัดคือ แอนติบอดีที่ใช้ต้องมีความจำเพาะ ความแรง และความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม จึงสามารถเห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจนได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นหากแอนติเจนของหมู่เลือดบนผิวของเม็ดเลือดแดงมีปริมาณน้อย อาจทำให้ตรวจไม่พบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและเกิดความผิดพลาดในการอ่านและแปลผลได้¹³ ปัจจุบันมีการศึกษาลำดับเบสของยีนหมู่เลือดระบบ Duffy^{1-2,14} และมีการนำเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์มาตรวจหายีนของหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย¹⁵⁻¹⁹ และสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหายีนของหมู่เลือดระบบ Duffy¹⁰⁻²⁵ เพื่อช่วยแก้ปัญหาในกรณีที่มีแอนติเจนปริมาณน้อยและไม่สามารถตรวจพบโดยวิธีทางซีโรโลยีได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่มิมีจีโนทัยป์ FY^* ซึ่งมีการสร้างแอนติเจน Fy^b ได้ปริมาณน้อย เมื่อปฏิกิริยากับ anti- Fy^b อาจเกิดการผิดพลาดในการอ่านและแปลผลได้²⁶⁻²⁹ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาจีโนทัยป์ของ FY^*A , FY^*B และ FY^*X ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP)

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือด ปริมาตร 2.5 mL โดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งจำนวน 97 ราย จากนักศึกษาสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 3 และ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามเอกสารเลขที่ 078E/55

2. การตรวจหาฟีโนทัยป์ของ Fy^a และ Fy^b โดยใช้วิธีซีโรโลยี

เตรียมตัวอย่างเลือดเป็น 5% red cell suspension หยด anti- Fy^a และ anti- Fy^b (Bio-Rad, Dreieich, Germany) อย่างละ 1 หยด ลงในแต่ละหลอดทดลอง ขนาด 12x75 mm จากนั้นหยด 5% red cell suspension ของตัวอย่างเลือดลงในหลอด anti- Fy^a และ anti- Fy^b หลอดละ 1 หยด เขย่าส่วนผสมของเซลล์และซีรัมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นอ่านผลและบันทึกผล จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ปั่นอ่านผลและบันทึกผล ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 % จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 45 วินาที ที่ 3,500 rpm เทน้ำเกลือออกให้หมดแล้วเติมน้ำยา anti-human globulins 1 หยด (National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Thailand) ปั่นอ่านผลทันที หากไม่มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงให้ยืนยันผลโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกผล หลอดที่อ่านผลปฏิกิริยาเป็นผลลบให้เติม IgG-sensitized red cells 1 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นอ่านผลและบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง

3. การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 5 นาที ใช้ transfer pipette ขนาด 1 mL ดูดเก็บส่วน buffy coat ใส่ในหลอดทดลองขนาด 12x75 mm เติม RBC-lysing reagent จำนวน 3 mL ผสมให้เข้ากันนาน 3 นาที แล้วปั่น 3,500 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทั้งหมดจากนั้นผสมโดยใช้ vortex mixer เพื่อให้ pellet กระจาย ทำซ้ำ อีก 2 ครั้ง จากนั้นเติม RBC-lysing reagent จำนวน 1 mL ผสมให้ pellet กระจายแล้วดูดใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL นำไปปั่นที่ 5,000 rpm นาน 2 นาที จะได้ pellet ที่มีขนาดประมาณ 25 μ L เติม proteinase K 12 μ L, ddH₂O 300 μ L, 10% SDS 105 μ L, เติม 7.5 M guanidine HCl 105 μ L ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วอุ่นใน dry block heater ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 10 นาที ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่าทำให้เกิดฟอง นำไปอุ่นอีกครั้ง อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสจำนวน 500 μ L ใส่หลอดทดลองขนาด 12x75 mm เติม absolute ethanol จำนวน 1 mL ดูดส่วนของ DNA มาใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL จำนวน 800 μ L นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม 80% ethanol จำนวน 500 μ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเปิดฝา microcentrifuge tube แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 1 นาที ละลาย DNA ด้วย ddH₂O จำนวน 100 μ L incubate ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 นาที ผสมให้เข้ากันแล้วนำ DNA ไปตรวจสอบคุณภาพ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis สดท้ายวัดและคำนวณความเข้มข้นและ

ความบริสุทธิ์ของ DNA โดยเครื่อง UV spectrophotometer เก็บรักษา DNA ที่ได้เก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อรอการทดสอบ ขั้นตอนต่อไป

4. การตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY*A*, *FY*B* และ *FY*X* ใน หมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี PCR-SSP

นำ DNA จำนวน 97 ตัวอย่างมาตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY*A* และ *FY*B* โดยทำ PCR 2 หลอดต่อ DNA 1 ราย หลอดที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ FYA-FW และ FYAB-RV ที่จำเพาะต่อจีโนทัยป์ของ *FY*A* ส่วนหลอดที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ FYB-FW และ FYAB-RV ที่จำเพาะต่อจีโนทัยป์ของ *FY*B* แต่ละหลอดใส่ HGH5580F และ HGH5967R (human growth hormone gene) เป็น internal control primers และใช้ *FY*A* และ *FY*B* เป็น positive control และ negative control ตามลำดับควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

สำหรับการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY*X* นำ DNA จำนวน 78 ราย ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดที่มีฟีโนทัยป์ Fy(a+b+) มาทำ PCR 1 หลอดต่อ DNA 1 ราย โดยใช้ไพรเมอร์ FYB-FW และ FYX-RV จำเพาะต่อจีโนทัยป์ของ *FY*X* โดยใช้ HGH5580F และ HGH5967R เป็น internal control primers โดยมี *FY*X* positive control และ negative control ควบคู่ไปด้วย เตรียมส่วนผสมของน้ำยาต่างๆ ในการทำ PCR ปริมาตร 10 µL ประกอบด้วย DNA template 200 ng, dNTPs 0.2 mM (Invitrogen, Brazil), MgCl₂ 1.5 mM (Invitrogen, Brazil), 1X buffer (Invitrogen, Brazil), Taq polymerase 0.25 U (Invitrogen, Brazil), ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FY*A*, *FY*B* หรือ *FY*X* 25 ng (Bio Basic Inc., Bangkok, Thailand) และ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน human growth hormone 12.5 ng (Bio Basic Inc., Bangkok, Thailand) (ตารางที่ 1) จากนั้นผสมให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Gene Amp PCR System 9600, Roche Diagnostic systems, Connecticut, USA)

Table 1. Primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')
FYA-FW	CCTTCCCAGATGGAGACTATGG
FYB-FW	CCTTCCCAGATGGAGACTATGA
FYX-RV	CAGGGCAGAGCTGCCAGCA
FYAB-RV	TAGCTTCCCAACCATCTTA
HGH5580F	TGCCTTCCCAACCATTCCTTA
HGH5967R	CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC

สภาวะในการทำ PCR ของการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY*A* และ *FY*B* ประกอบด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 °C, 1 นาที จำนวน 1 รอบ denature ที่อุณหภูมิ 95 °C, 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 66.2 °C, 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C, 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C, 30 วินาที จำนวน 1 รอบ สำหรับสภาวะในการทำ PCR ของการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY*X* ทำเช่นเดียวกัน ยกเว้น ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 67 °C จากนั้นนำ PCR product ไปตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis แยกผ่านด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 volts นาน 40 นาที จากนั้นย้อมแผ่น gel ด้วย ethidium bromide นาน 5 นาที และวิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยเปรียบเทียบ PCR product ที่ได้กับ DNA marker ขนาด 100 bp DNA ladder (Fermentas, Utah, USA)

ผลการศึกษา

1. ผลการตรวจหาฟีโนทัยป์ของ *Fy^a* และ *Fy^b* ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธีซีโรโลยี

จากผลการตรวจหาฟีโนทัยป์ของ *Fy^a* และ *Fy^b* ในหมู่เลือดระบบ Duffy จำนวน 97 ราย ตรวจพบ Fy(a+b-) จำนวน 78 ราย (ร้อยละ 80.41) และ Fy(a+b+) จำนวน 19 ราย (ร้อยละ 19.59)

2. ผลการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY*A* และ *FY*B* ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี PCR-SSP

ในการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY*A* และ *FY*B* ในหมู่เลือดระบบ Duffy ต้องมี PCR product ของ internal control ขึ้นที่ตำแหน่ง 434 bp ทุกสาย จึงสามารถแปลผลได้ นอกจากนี้ PCR product ของ หลอด *FY*A* และ *FY*B* positive control ต้องมี specific PCR product ขนาด 216 bp และ PCR product ของ หลอด *FY*A* และ *FY*B* negative control ต้องไม่มี specific PCR product ขนาด 216 bp จึงสามารถแปลผลของตัวอย่าง DNA ที่ใช้ทดสอบได้ ดังแสดงในรูปที่ 1 จากผลการตรวจ DNA ของตัวอย่างเลือด จำนวน 97 ราย พบจีโนทัยป์ แบบ *FY*A/FY*B* จำนวน 78 ราย (ร้อยละ 18.41) และแบบ *FY*A/FY*B* จำนวน 19 ราย (ร้อยละ 19.59)

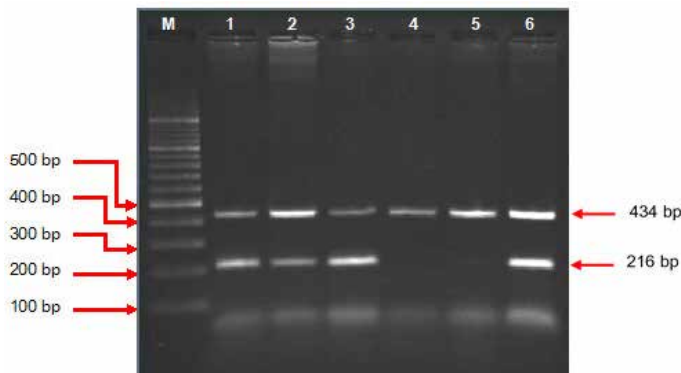


Figure 1. Gel electrophoresis of FY^*A and FY^*B genotyping by PCR-SSP. Lane M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1-2: FY^*A/FY^*B genotype, Lane 3-4: FY^*A/FY^*A genotype, Lane 5-6: FY^*B/FY^*B genotype

3. ผลการเปรียบเทียบการตรวจหาฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ของระบบหมู่เลือด Duffy

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจฟีโนไทป์ด้วยวิธีซีโรโลยี และผลการตรวจจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-SSP พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

Table 2. Comparison of the results for the detection of phenotype and genotype in Duffy blood group system

Phenotypes	Genotypes	Number(%)
Fy (a+b-)	FY^*A/FY^*A	78 (80.41)
Fy (a+b+)	FY^*A/FY^*B	19 (19.59)
Total		97 (100)

4. ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^*X ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี PCR-SSP

การตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^*X หมู่เลือดระบบ Duffy จะแปลผลได้ ต้องมี PCR product ของ internal control ขึ้นที่ตำแหน่ง 434 bp และ PCR product ของ หลอด FY^*X positive control ต้องมี specific PCR product ขนาด 180 bp และตรวจไม่พบ PCR product ในหลอด FY^*X negative control ดังแสดงในรูปที่ 2 จากผลการตรวจ DNA ของตัวอย่างเลือดที่มีฟีโนไทป์ Fy(a+b-) จำนวน 78 ราย ไม่พบจีโนไทป์ของ FY^*X

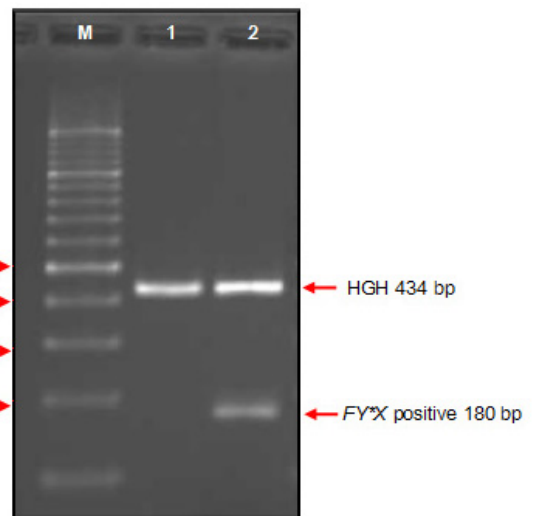


Figure 2. Gel electrophoresis of FY^*X genotyping at position C265T by PCR-SSP.

Lane M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1: None FY^*X genotype, Lane 2: FY^*X genotype

วิจารณ์ผลการศึกษา

การตรวจหาฟีโนไทป์ของ Fy^a และ Fy^b ด้วยวิธีซีโรโลยี พบ $Fy(a+b-)$ และ $Fy(a+b+)$ ประมาณ ร้อยละ 80 และร้อยละ 20 ตามลำดับ ซึ่งมีความถี่ใกล้เคียงกับที่มีการศึกษาในประชากรไทย สำหรับประชากรในประเทศแถบเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น และจีน มีความถี่ของ $Fy(a+b-)$ มาก รองลงมา คือ $Fy(a+b+)$, $Fy(a-b+)$ และ $Fy(a-b-)$ ตามลำดับ แตกต่างกับประชากรในประเทศทางแถบยุโรปมีความถี่ของ $Fy(a+b+)$ มาก รองลงมา คือ $Fy(a-b+)$, $Fy(a+b-)$ และ $Fy(a-b-)$ ตามลำดับ ส่วนประชากรในประเทศแอฟริกามีความถี่ของ $Fy(a-b-)$ มาก รองลงมา คือ $Fy(a-b+)$, $Fy(a+b-)$ และ $Fy(a+b+)$ ตามลำดับ¹⁻⁶ แอนติบอดีของระบบหมู่เลือดนี้เป็นชนิด IgG ไม่ตรึงคอมพลีเมนต์ และมีความสำคัญทางคลินิก จากการรายงานชนิดของแอนติบอดีต่อหมู่เลือดผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย³⁰ พบความถี่ของแอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบ Duffy ร้อยละ 2.7 และพบ anti- Fy^b มากกว่า anti- Fy^a หากพบแอนติบอดีชนิดใดในซีรัมของผู้ป่วยจำเป็นต้องจัดหาเลือดที่ไม่ใช่แอนติเจนที่ตรงกับแอนติบอดีที่พบไปให้แก่ผู้ป่วย¹⁻²

เมื่อนำผลการตรวจหาฟีโนไทป์ของ Fy^a และ Fy^b ด้วยวิธีซีโรโลยีมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจหาจีโนไทป์ของ FY^*A , FY^*B และ FY^*X ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี PCR-SSP พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นการตรวจจีโนไทป์ของ FY^*A , FY^*B และ FY^*X ในหมู่เลือด Duffy ด้วยวิธี PCR-SSP จึงสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาจีโนไทป์ได้^{5, 14-22}

นอกจากวิธี PCR-SSP แล้วยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์ โดยใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจหายีนในหมู่เลือดนี้เช่นกัน เช่น วิธี PCR-RFLP, real-time PCR หรือ multiplex SNaPShot เป็นต้น¹⁵⁻²⁵ แม้ว่าวิธีการต่างๆ เหล่านี้จะใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีทางซีโรโลยี แต่สามารถนำมาใช้แก้ปัญหาในกรณีที่มีแอนติเจนปริมาณน้อยๆ ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางซีโรโลยี²⁶⁻²⁹ การตรวจหายีนของหมู่เลือดระบบ Duffy มีประโยชน์ในการเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย ในกรณีที่ผู้ป่วยมี anti-Fy^a และ/หรือ anti-Fy^b ต้องเลือกเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีนั้นๆ ให้แก่ผู้ป่วยเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาจากการรับเลือด^{1, 2, 31-35}

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักศึกษาสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเลือด รวมถึงขอขอบคุณ Marion E Reid และ Kim Hue Royce จาก Immunochemistry Laboratory, New York Blood Centre, New York, USA ที่เอื้อเฟื้อ DNA ของ Fy^a, Fy^b และ Fy^X positive control ใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Meny GM. The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*. 2010; 26: 51-6.
2. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML: Blood Group Antigen Facts Book, 3rd ed. San Diego, Academic Press, 2012.
3. Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Metaseta P, Pongsataporn S. Further study of Rh, Kell, Duffy, P, MN, Lewis and Gerbiech blood groups of the Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1979; 10: 209-11.
4. Shimizu Y, Kimura M, Settheetham-Ishida W, Duangchang P, Ishida T. Serotyping of Duffy blood group in several Thai ethnic groups. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997; 28: 32-5.
5. Peng CT, Tsai CH, Lee HH, Lin CL, Wang NM, Chang JG. Molecular analysis of Duffy, Yt and Colton blood groups in Taiwanese, Filipinos and Thais. *Kaohsiung J Med Sci*. 2000; 16: 63-7.
6. Nathalang O, Kuvanont S, Punyaprasiddhi P, Tasaniyanonda C, Sriphaisal T. A preliminary study of the distribution of blood group systems in Thai blood donors determined by the gel test. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2001; 32: 204-7.
7. Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Paujalon O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2013; 81: 27-76.
8. Chitnis CE, Dhaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med*. 1996; 184: 1531-6.
9. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*. 1997; 89: 3077-91.
10. Zimmermann PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, et al. Emergence of Fy^a(null) in a *Plasmodium vivax* endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 13973-7.
11. Murphy MT, Templeton LJ, Fleming J, Ferguson M, Peterkin M, Fraser RH. Comparison of Fy(b) status as determined serologically and genetically. *Transf Med*. 1997; 7: 135-41.

12. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, et al. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the *Fy(b)* allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol.* 1998; 103: 1184-91.
13. Garatty G. Where are we, and where are we going, with DNA-based approaches in immunohematology? Is serology finished? *Transfusion.* 2007; 47(suppl): 1S-2S.
14. Human Genome Variation Society: Blood Group Antigen Gene Mutation Database. NCBI, dbRBC. [cited 2015 Jan 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmute/home>.
15. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the *Fy^a/Fy^b* blood group polymorphism. *Human Genet.* 1995; 95: 407-10.
16. Reid ME. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion.* 2007; 47(Suppl): 10S-16S.
17. Hashmi G. Red blood cell antigen phenotype by DNA analysis. *Transfusion.* 2007; 47(Suppl): 40S-6S.
18. Sellami MH, Kaabi H, Mibouni B, Dridi A, Mojaat N, Boukef MK, et al. Duffy blood group system genotyping in an urban Tunisian population. *Ann Hum Biol.* 2008; 35: 406–5.
19. Malgomgíe W, Neumeister B. Recent and future trends in blood group typing. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393: 1443-51.
20. Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion.* 1998; 38: 168-73.
21. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion.* 2000; 40: 310-20.
22. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion.* 2007; 47(Suppl): 28S-31S.
23. Prager M. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique. *Transfusion.* 2007; 47(1 Suppl): 54S-9S.
24. Palacajornsuk P, Halter C, Isakova V, Tarnawski M, Farmar J, Reid ME, et al. Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method. *Transfusion.* 2009; 49: 740-9.
25. Reid ME. Applications and experience with PCR-based assays to predict blood group antigens. *Transfus Med Hemother.* 2009; 36: 168-78.
26. Tournamille C., Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in *Fy^x* individuals. *Blood.* 1998; 92: 2147-56.
27. Ansart-Pirenne H, Martin-Blanc S, Le Pennec PY, Rouger P, Cartron JP, Tournamille C. *FY^x* real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis associated with a complete one-step real-time *FY* genotyping. *Vox Sang.* 2007; 92: 142–7.
28. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, et al. *Br Haematol.* The *Fy^x* phenotype is associated with a missense mutation in the *Fy^b* allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. 1998; 103: 1184–91.

29. Gassner C, Kraus RL, Dovic T, Kilga-Nogler S, Utz I, Mueller TH, Schunter F, Schoenitzer D. Fy^x is associated with two missense point mutations in its gene and can be detected by PCR-SSP. *Immunohematology*. 2000; 16: 61-7.
30. ภาวิณี คุปต์วิฑู, มรกต เอ็มทิพย์, ดวงพร สังข์นุ่น, ฐรยา โอวาทกา, วิมล มานะกุล, สุดาวรรณ ลิ้มธรรมาภรณ์ และคณะ. แอนติบอดีของหมู่เลือดชนิดต่างๆ ในผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*. 2553; 20: 255-62.
31. Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fy(a) and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. *Transfus Med*. 1997; 7: 301-4.
32. Olteanu H, Gerber D, Partridge K, Sarode R. Acute hemolytic transfusion reaction secondary to anti-Fy3. *Immunohematology*. 2005; 21: 48-52.
33. Koelewijn JM, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonse GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion*. 2008; 48: 941-52.
34. Cotorruelo C¹, Biondi C, Racca L, Borrás SG, Racca A. Duffy genotyping facilitates transfusion therapy. *Clin Exp Med*. 2009; 9: 249-51.
35. Guelsin GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, et al. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. *J Clin Lab Anal*. 2010; 24: 311-6.

ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ภูมิปัญญาชาวบ้าน ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิล เซลล์เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด

Effects of folk wisdom boiled Herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.)
Skeels, and pandanus *amaryllifolius* on neutrophil, red blood cell, and platelet functions

■ สุภาพร ขำจันทร์¹ ปาริยา ไบอุบล¹ หนึ่งฤทัย นิลศรี^{2*}
Supaporn Khamchun¹ Pareeya Baiubol¹ Nungruthai Nilsri^{2*}

¹สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

¹School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

²Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok Province

* Corresponding author (Email: nungruthai.ni@gmail.com)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Introduction: Hematopoietic cells consist of red blood cells, white blood cells and platelets. Blood cells play the major roles in oxygen transportation, immune system, and hemostasis, respectively. An imbalance of cell function may lead to many diseases such as hemolytic anemia, immunodeficiency, and thrombosis. Folk wisdom boiled herbs, the traditional medicine from Ban Tontakean, Maejai District, Phayao Province, Thailand, have been used for nourishment and hypertension treatments to study the effect on the hematologic system for pharmacological properties.

Objectives: To study the effects of folk wisdom boiled herb, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* on neutrophil, red blood cell, and platelet functions.

Materials and methods: Boiled herb extracts of *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* was used at the final concentrations of 100, 200 and 400 µg/mL. The oxidative stress levels in red blood cells, phagocytic function of neutrophils and platelet function were determined using malondialdehyde assay, phagocytic assay, and platelet aggregation assay, respectively.

Results: All concentrations of boiled herb extracts could significantly inhibited collagen-activated platelet aggregation at $p<0.05$ when compared to the control. The boiled herb extract (200 and 400 µg/mL) showed significantly increased phagocytic function ($p<0.05$). However, level of oxidative stress slightly decrease (not significant when compared to the control) after boiled herb extract treatment.

Conclusions: Folk wisdom boiled herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* extract could enhance phagocytic cell function and inhibit platelet aggregation.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 144-153. Doi: 10.14456/jams.2015.10

Keywords: Folk wisdom boiled herb, hematopoietic cells, oxidative stress, phagocytosis, platelet aggregation

บทคัดย่อ

บทนำ: เซลล์ในระบบโลหิตวิทยา ประกอบไปด้วย เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ซึ่งทำหน้าที่หลักในการขนส่งออกซิเจน เป็นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และทำหน้าที่ในกระบวนการห้ามเลือด ตามลำดับ หากเกิดการเสียสมดุลในกระบวนการทำงานของเซลล์ทั้งสามชนิดนี้ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ได้ เช่น ภาวะโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย ภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน ยาหม้อสมุนไพรตำรับบ้านตันตะเคียน อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา เป็นยาแผนโบราณที่ใช้ในการบำรุงร่างกายและรักษาโรคความดันโลหิตสูง ได้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ทางระบบโลหิตวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้น

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิล เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด

วัสดุและวิธีการ: ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL ต่อการเกิดอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดง ร้อยละการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล และร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ด้วยวิธีการวิเคราะห์มัลลาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ดูการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic function) และการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ตามลำดับ

ผลการศึกษา: สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพรในทุกๆ ความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL นั้น มีฤทธิ์เพิ่มการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิลในการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ยังส่งผลให้ระดับของอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงลดลง แต่เป็นการลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุปผลการศึกษา: สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพรภูมิปัญญาชาวบ้าน มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 144-153. Doi: 10.14456/jams.2015.10

คำรหัส : ยาหม้อสมุนไพร เซลล์ในระบบโลหิตวิทยา อนุมูลอิสระ ฟาโทซัยโทซิส การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

บทนำ

ภูมิปัญญาชาวบ้าน เป็นความรู้อันเกิดจากประสบการณ์ในการประดิษฐ์ คิดค้น จนกระทั่งกลายเป็นผลผลิตที่เป็นวัตถุและเป็นเรื่องของจิตใจที่มีประโยชน์ต่อการดำรงชีวิต มีการถ่ายทอดสืบต่อกันมาจากบรรพบุรุษ จนถึงรุ่นปัจจุบัน ภูมิปัญญาชาวบ้านเกี่ยวกับตำรับยาพื้นบ้านซึ่งเป็นการแพทย์ทางเลือกที่พบได้โดยทั่วไป คือ การทำน้ำต้มจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ หรือที่เรียกกันว่า ยาหม้อมีมากมายหลายขนานตามแต่ละพื้นที่ที่มีการสืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่นมาเป็นเวลานาน ชุมชนบ้านตันตะเคียน ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา มีการนำภูมิปัญญาพื้นบ้านแบบยาหม้อมาใช้ในชุมชน โดยการนำส่วนผสมของสมุนไพรหลายชนิดประกอบด้วย ใบและก้านของมะยม รากและต้นของลูกใต้ใบ รากและต้นของเตยหอม ต้มรวมกัน มีความเชื่อว่ายาต้มสมุนไพรนี้ช่วยในการบำรุงร่างกาย และรักษาโรคความดันโลหิตสูง มีการศึกษาที่ทราบในเบื้องต้นว่า มะยม

(*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) มีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และลดการอักเสบได้ ส่วนลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schum&Thorn) ใช้เป็นยาขับปัสสาวะชะลอการเกิดนิ่ว และช่วยลดไข้³ นอกจากนี้ เตยหอม (*Pandanus amaryllifolius*) มีฤทธิ์ป้องกันการติดเชื้อไวรัส และต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้^{4,5} แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์งานยืนยันทางวิทยาศาสตร์ว่าสมุนไพรดังกล่าวส่งผลอย่างไรต่อเซลล์ที่ทำงานในระบบไหลเวียนโลหิต ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาผลของน้ำต้มยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ภูมิปัญญาชาวบ้านต่อการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิล เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด โดยการศึกษาฤทธิ์ด้านการเกิดสารอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดง ผลของยาหม้อต่อการกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมของเซลล์นิวโทรฟิล และศึกษาฤทธิ์ด้านการทำงานของเกล็ดเลือด เพื่อยับยั้งการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองได้ หากยาหม้อสมุนไพรมีฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้น

จะเป็นการช่วยยืนยันสรรพคุณทางยาเบื้องต้นของยาหม้อที่มีอยู่ในชุมชน ช่วยเพิ่มคุณค่ารวมทั้งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของสมุนไพร รวมถึงทำให้เกิดความตระหนักในชุมชนถึงการอนุรักษ์ภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีอยู่ และร่วมกันเผยแพร่ภูมิปัญญาดังกล่าวสู่ชุมชนอื่น อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการนำภูมิปัญญาที่ชุมชนมาใช้เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและบำบัดรักษาโรค นอกจากนี้หากยาหม้อสมุนไพรมีสรรพคุณทางยาจริง จะทำให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำดื่มยาหม้อสมุนไพรให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถรับประทานได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น ส่งเสริมให้เป็นสินค้าประจำชุมชนศรีถ้อย ทำให้เกิดรายได้ของชุมชนอีกทางหนึ่ง และอาจมีการพัฒนาจนถึงขั้นจดทะเบียนสิทธิบัตรภูมิปัญญาสมุนไพรพื้นบ้านของชุมชนศรีถ้อยในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การคัดเลือกอาสาสมัคร

คัดเลือกอาสาสมัครจำนวน 10 ราย ที่มีสุขภาพแข็งแรง มีปริมาณของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดอยู่ในช่วงปกติ ไม่อยู่ในระหว่างการเป็นไข้ และไม่รับประทานยาหรืออาหารที่ส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด เช่น ยาแอสไพริน เป็นต้น โดยงานวิจัยผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ที่รับรอง 51/2013 และมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่รับรอง 5602010002 และ 5602010014

2. การเตรียมสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม

เตรียมสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพรตำรับบ้านต้นตะเคียน ตำบลดศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา ซึ่งประกอบไปด้วย รากและต้นของลูกใต้ใบ ใบและก้านของมะยม และรากและต้นของเตยหอม ในสัดส่วน 1:1:1 (โดยน้ำหนักส่วนละ 50 gm) โดยนำพืชทั้งหมดมาล้างให้แห้งในที่ร่ม สกัดสารด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของสมุนไพร 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลากรองด้วยผ้าขาวบางและปั่นตกตะกอนที่ 1,500xg นาน 10 นาที จากนั้นทำให้เป็นผงโดยเครื่อง Lyophilizer เก็บสารสกัดที่อยู่ในรูปผงไว้ในขวดสีชาปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาทดสอบ สารสกัดที่ใช้ทดสอบเตรียมโดยละลายสารสกัดด้วย phosphate buffer saline (PBS) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้น (stock) เท่ากับ 1 mg/mL

3. การเตรียมเซลล์สำหรับทดสอบ

3.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง

เจาะเลือดจากอาสาสมัคร ใส่ลงในสารกันเลือดแข็งชนิด sodium citrate ที่ความเข้มข้น 3.2% ในอัตราส่วน 9:1 นับและปรับปริมาณของเม็ดเลือดแดงให้อยู่ในช่วง $4.5-5.0 \times 10^6$ cells/ μ L ด้วยเครื่อง automated hematological analyzer (KX-21N, Sysmex, Japan)

3.2 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล

เตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วยวิธี Ficoll-Hypaque gradient centrifugation และวิธี dextran sedimentation ความเข้มข้น 6% โดยเจาะเลือดอาสาสมัคร ใส่ลงในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนดูดใส่ลงในน้ำยา Ficoll-Hypaque นำไปปั่นที่ความเร็ว 400 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที กรบเวลาดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติม dextran ความเข้มข้น 6% ในอัตราส่วน dextran:เลือด เท่ากับ 3:2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งเฉียง 45 องศา เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสด้านบนมาปั่นที่ความเร็ว 300xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วจึงเติม NH_4Cl ความเข้มข้น 0.83% ปริมาตร 1 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่เตรียมได้ไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ trypan blue exclusion ความเข้มข้น 0.2% และคำนวณร้อยละของการมีชีวิต (% cell viability) และปรับจำนวนของเซลล์นิวโทรฟิลให้เท่ากับ 5×10^6 cells/mL

3.3 การเตรียมเกล็ดเลือด

เจาะเลือดจากอาสาสมัคร ใส่ลงในสารกันเลือดแข็งชนิด sodium citrate ที่ความเข้มข้น 3.2% ในอัตราส่วน 9:1 นำเลือดไปปั่นที่ความเร็ว 140xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 22 °C เก็บส่วนบนซึ่งเป็น platelet rich plasma (PRP) หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นเกล็ดเลือดด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2×10^8 platelets/mL และปั่นเลือดที่ 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนบนเป็น platelet poor plasma (PPP)

4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อเซลล์นิวโทรฟิล

เพื่อเป็นการทดสอบว่าสารสกัดในแต่ละความเข้มข้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์นิวโทรฟิล ทำการศึกษาโดยนำเซลล์นิวโทรฟิลที่เตรียมได้ 5×10^6 cells/mL ปริมาตร 100 μ L ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 μ g/mL เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการผสมกับ trypan blue ความเข้มข้น 0.2% ในอัตราส่วน 1:1 นับและคำนวณร้อยละของการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์นิวโทรฟิล

5. การวัดปริมาณแลคเตทไฮโดรจีเนส (Lactase dehydrogenase; LDH)

เพื่อเป็นการทดสอบว่าสารสกัดที่นำมาทดสอบในแต่ละความเข้มข้นไม่มีผลในการทำลายเกล็ดเลือด โดยนำเกล็ดเลือด 2×10^8 platelets/mL ปริมาตร 500 μ L ทำปฏิกิริยากับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 μ g/mL ปริมาตร 250 μ L บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนไปตรวจวัดปริมาณแลคเตทไฮโดรจีเนส ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas 6000 โดยใช้สาร triton X-100 ผสมกับเกล็ดเลือดเป็น positive control

6. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธี malondialdehyde⁶

นำเม็ดเลือดแดงที่เตรียมได้ ปริมาตร 2 mL ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 μ g/mL ปริมาตร 100 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการปั่นแยกพลาสมา ที่ความเร็วรอบ 1,500xg เป็นเวลา 15 นาที นำพลาสมา ปริมาตร 250 μ L ผสมกับ butylatedhydroxytoluene ความเข้มข้น 0.2% ปริมาตร 25 μ L และ H_2PO_4 ความเข้มข้น 0.44 M ปริมาตร 750 μ L ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม thiobarbituric acid ความเข้มข้น 0.6% ปริมาตร 250 μ L แล้วนำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะเติม n-butanol ปริมาตร 2 mL และนำไปปั่นที่ 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกและนำชั้นของ n-butanol ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm หาค่าความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ด้วยวิธี phagocytic function⁷

นำเซลล์นิวโทรฟิล 5×10^6 cells/mL ปริมาตร 100 μ L มาทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 μ g/mL ปริมาตร 100 μ L บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมน้ำเชื้อ *E. coli* ที่มีฟลาสมิต pTriEx-4-GFP (ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน GFP) ปริมาณ 10 MOI และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 2 นาที และดูดส่วนใสด้านบนทิ้งอีกครั้ง เติมน้ำ bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 50 μ L เตรียมสเมียร์และนำไปตรวจดูเซลล์ภายใต้

กล้องฟลูออเรสเซนซ์ คำนวณร้อยละของเซลล์ที่เรืองแสงจากการจับกินเชื้อ *E. coli* (% phagocytosis index) ดังนี้

$$\% \text{ Phagocytosis index} = \frac{\text{เซลล์นิวโทรฟิลที่เรืองแสงจากการจับกินเชื้อ } E. coli \times 100}{\text{เซลล์นิวโทรฟิล 200 เซลล์}}$$

และคำนวณอัตราการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในการจับกินเชื้อ *E. coli* (increasing ratio) ดังนี้

$$\text{Increasing ratio} = \frac{\% \text{ Phagocytosis index ของตัวอย่างทดสอบ}}{\% \text{ Phagocytosis index ของ vehicle control}}$$

8. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ด้วยวิธี microplate assay⁸

นำเกล็ดเลือด 2×10^8 platelets/mL ปริมาตร 200 μ L ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 μ g/mL ปริมาตร 100 μ L โดยใช้ยาแอสไพริน (Edwards; England) ความเข้มข้น 81 mg/mL เป็น positive control ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา ดูดเกล็ดเลือดที่ทำปฏิกิริยาแล้วปริมาตร 75 μ L เติมนลงในไมโครเพลท เติมน้ำสารกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิดคอลลาเจน (Helena laboratories; USA) ความเข้มข้น 20 μ g/mL ปริมาตร 10 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครไทดเตอร์เพลท (PerkinElmer; USA) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ในนาฬิกาที่ 0 และ 20 คำนวณร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ดังนี้

$$\% \text{ Aggregation} = \frac{\text{OD (plt0)} - \text{OD (plt20)}}{\text{OD (vehicle0)} - \text{OD (PPP)}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้การวิเคราะห์ผลการทดลองที่อยู่ในรูปร้อยละ รายงานค่าเป็น mean $\pm$ SD และทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย Mann-Whitney Test โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป SPSS version 14.0 เปรียบเทียบข้อมูลกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำสารสกัดลงไป ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อเซลล์นิวโทรฟิล

ผลการทดสอบพบเซลล์นิวโทรฟิลมีการมีชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อผสมเซลล์กับสารสกัดในทุกะดับความเข้มข้น (100, 200 และ 400 μ g/mL) และพบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์นิวโทรฟิลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 1)

Table 1. The percentage of neutrophil viability after boiled herb extract treatment

Test	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	% cell viability (mean $\pm$ SD)
Cell control	-	92.87 $\pm$ 4.34
Boil herb extract	100	89.75 $\pm$ 3.42
	200	88.09 $\pm$ 3.12
	400	88.31 $\pm$ 6.14

2. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อเกล็ดเลือด
 การทดสอบพบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนสในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบในทุกความเข้มข้น ไม่มี
 ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบนี้ไม่มีฤทธิ์ทำลายเกล็ดเลือด (ตารางที่ 2)

Table 2. Effects of folk wisdom boiled herb extract on platelets by lactase dehydrogenase release assay

Test	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Lactase dehydrogenase (U/L) (mean $\pm$ SD)
Vehicle control	-	58.0 $\pm$ 2.0
Positive control	-	315.0 $\pm$ 10.0
Boil herb extract	100	55.5 $\pm$ 7.5
	200	55.0 $\pm$ 7.0
	400	53.5 $\pm$ 5.5

3. ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เม็ดเลือดแดง
 จากผลการศึกษาปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเม็ดเลือดแดงเมื่อผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ พบว่ามีระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์เท่ากับ 2.03 $\pm$ 0.64, 2.11 $\pm$ 0.67 และ 2.14 $\pm$ 0.62 μM ตามลำดับ ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเลือดมีแนวโน้มที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (2.20 $\pm$ 0.64 μM) แต่เป็นการลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 3)

Table 3. Effects of folk wisdom boiled herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* on hematopoietic cells are demonstrated by malondialdehyde level, the percent of phagocytosis index, and platelet aggregation.

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Malondialdehyde level (μM) (mean $\pm$ SD)*	The percentage of phagocytosis index (mean $\pm$ SD)*	The percentage of platelet aggregation (mean $\pm$ SD)*
Vehicle control	0	2.20 $\pm$ 0.64	29.9 $\pm$ 7.4	27.13 $\pm$ 5.85
Boil herb extract	100	2.03 $\pm$ 0.64	36.7 $\pm$ 17.5	14.89 $\pm$ 8.99
	200	2.20 $\pm$ 0.67	42.8 $\pm$ 14.2	16.12 $\pm$ 9.87
	400	2.14 $\pm$ 0.62	42.2 $\pm$ 14.7	16.98 $\pm$ 9.15

* Samples were tested in triplicate and 3 time-independent experiments.

4. ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด นิวโทรฟิล

หากสารสกัดมีฤทธิ์ในการเพิ่มการทำหน้าที่ของ เซลล์นิวโทรฟิล จะทำให้ร้อยละของเซลล์ที่จับกินสิ่งแปลกปลอม ในที่นี้คือเชื้อ *E. coli* มีค่าเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 1) จากผลการทดสอบ พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL มี ร้อยละของเซลล์ที่จับกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 36.7 ± 17.5 ,

42.8 ± 14.2 และ 42.2 ± 14.7 ตามลำดับ โดยกลุ่มควบคุมมีค่า เท่ากับร้อยละ 29.9 ± 7.4 และเมื่อคำนวณเป็นอัตราการเพิ่มขึ้น ของเซลล์ในการจับกินเชื้อ *E. coli* (increasing ratio) พบว่ามีค่า เท่ากับ 1.22 ± 0.58 , 1.43 ± 0.47 และ 1.41 ± 0.49 ตามลำดับ ซึ่ง สารสกัดที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL นั้น ออกฤทธิ์เพิ่ม การทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิลในการจับกินสิ่งแปลกปลอม ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 2)

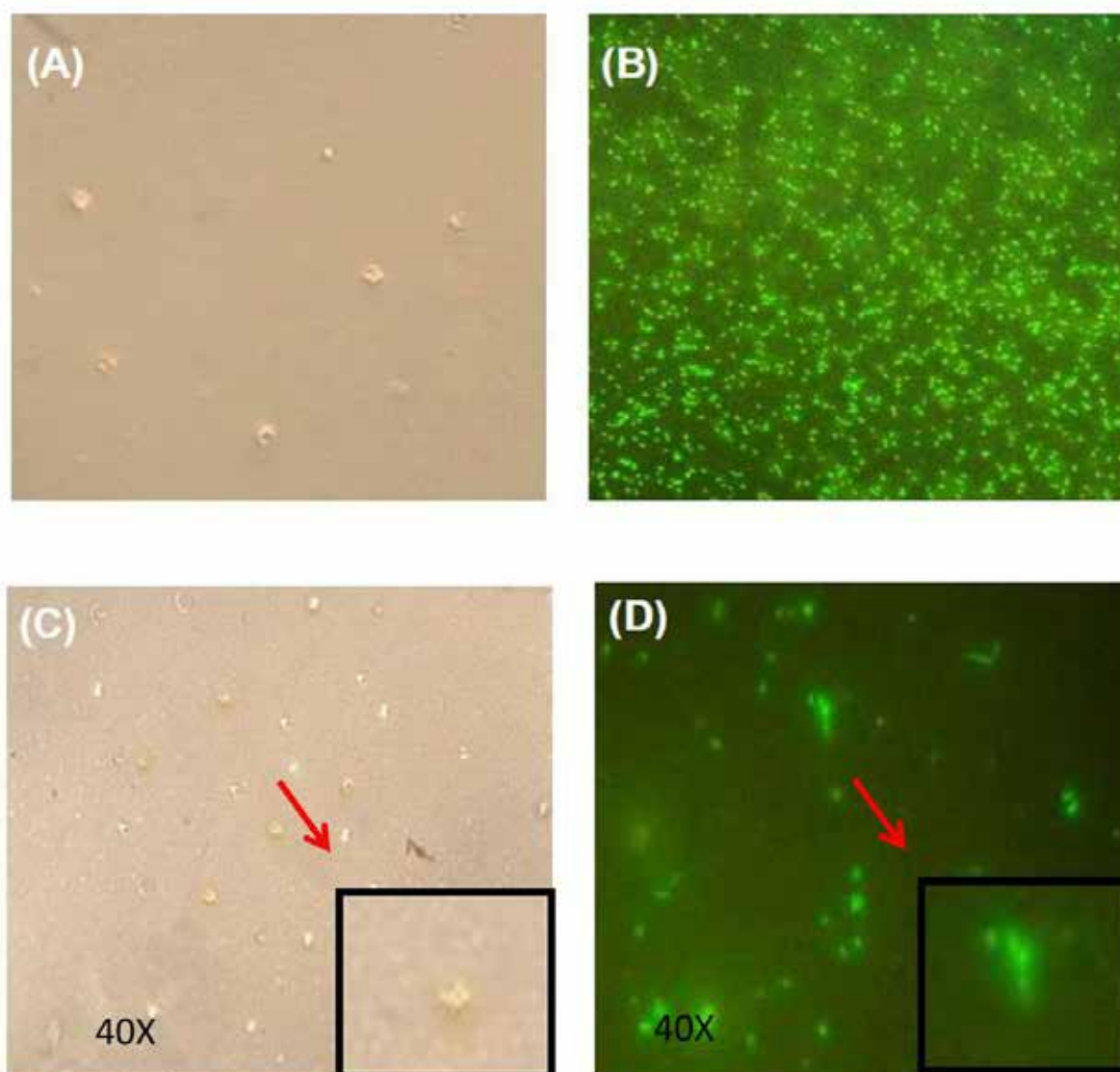


Figure 1 Determination of phagocytic function of neutrophil using fluorescence microscope (A) Neutrophil in bright field microscope, (B) *E. coli* in fluorescence microscope, (C) and (D) the phagocytic function of neutrophil in bright field microscope and fluorescence microscope (40X), respectively.

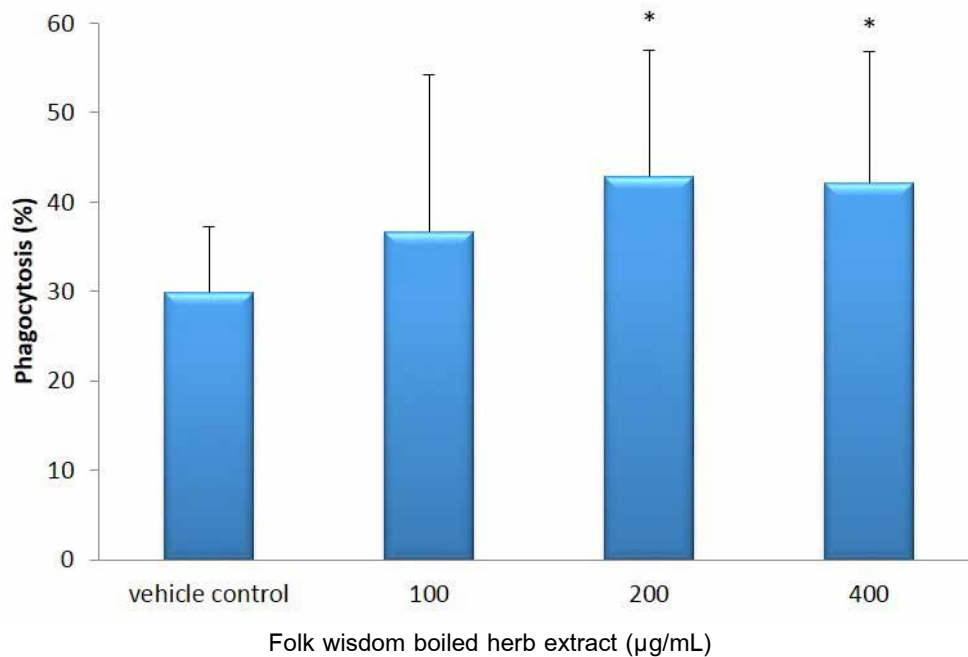


Figure 2 Effects of folk wisdom boiled herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* on phagocytic function of neutrophil. Data are shown as mean±SD (n=10). Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control ($p<0.05$).

5. ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

เมื่อทำการผสมเกล็ดเลือดกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL พบว่าร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมีค่าเท่ากับ 14.89 ± 8.99 , 16.12 ± 9.87 และ 16.98 ± 9.15 ตามลำดับ สารสกัดทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่ม

ของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเท่ากับ 27.13 ± 5.85 และพบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้น มีค่าการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่มากกว่าแอสไพริน ซึ่งเป็น positive control (ร้อยละ 19.88 ± 6.70) (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 3)

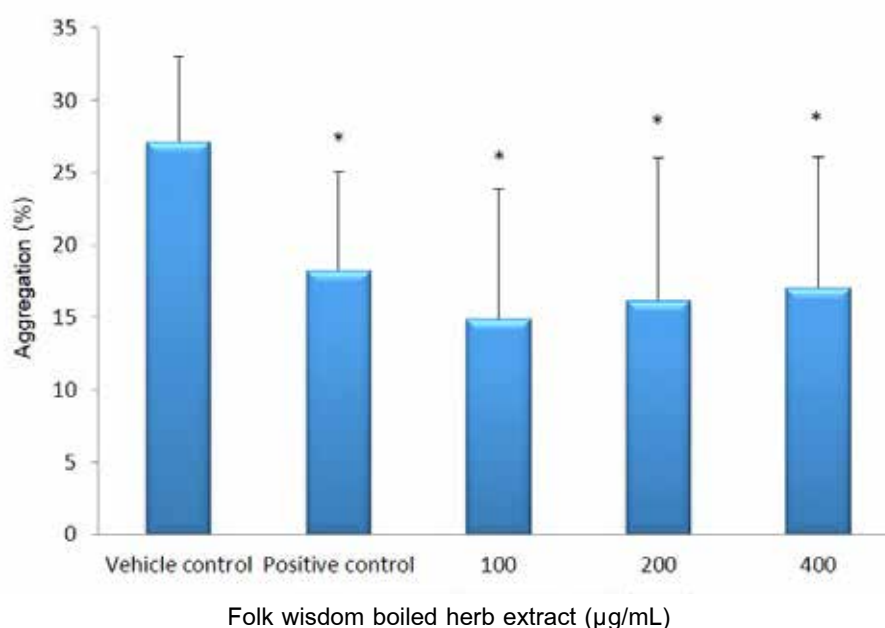


Figure 3 Effects of folk wisdom boiled herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* on platelet aggregation. Data are shown as mean±SD (n=10). Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control ($p<0.05$).

สารสกัดจากน้ำต้มยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม เป็นยาแผนโบราณที่ยังมีการนำมาใช้เพื่อบำรุงร่างกาย ในชุมชนบ้านต้นตะเคียน ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา พบว่ามีผลยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเม็ดเลือดแดงในการกำจัดอนุมูลอิสระ (ไดอัลดีไฮด์) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดน้ำต้มยาหม้อสมุนไพรมีปริมาณน้อย หรืออาจเกิดจากกระบวนการเตรียมสารสกัดจากการต้มสมุนไพรด้วยความร้อนทำให้มีการสูญเสียสารสำคัญ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลและสลายตัวได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 70 °C ขึ้นไป⁹ และเตยหอมที่นำมาใช้เตรียมยาหม้อสมุนไพรในครั้งนี้มีสารแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ด้วยเช่นกัน¹⁰ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ลดลงน่าจะเป็นผลจากความร้อนที่ใช้ในการต้มน้ำสมุนไพร อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า สารสกัดมีแนวโน้มช่วยลดสารอนุมูลอิสระชนิดไดอัลดีไฮด์นี้ จึงนับเป็นข้อดีของสารสกัดโดยเฉพาะหากบริโภคอย่างต่อเนื่องน่าจะมีผลต่อการลดอนุมูลอิสระได้เพิ่มมากขึ้น

ผลการทดสอบสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดพบว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยคอลลาเจนได้ และเนื่องจาก ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม มีสารควอร์ซีติน (quercetin) เป็นองค์ประกอบร่วมอยู่ด้วย¹¹⁻¹³ และงานวิจัยของ Kobzar และคณะ¹⁴ ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารควอร์ซีตินที่ได้จากการสกัดจากพืชยืนยันว่ามีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) ของเกล็ดเลือด ส่งผลให้กรดอะราชิโนอิก (arachidonic acid) ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นสาร thromboxane เอทู (Thromboxane A₂) เกล็ดเลือดจึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มกัน ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากสารสกัดยาหม้อสมุนไพรที่นำมาทดสอบนี้ น่าจะเป็นผลมาจากสารควอร์ซีตินที่พบในลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม

ในภาวะปกติของร่างกาย หากไม่เกิดพยาธิสภาพบริเวณหลอดเลือด เกล็ดเลือดที่ล่องลอยอยู่ในกระแสเลือดจะอยู่ในระยะพัก (resting platelet) และไม่เกิดการทำงานในกระบวนการห้ามเลือด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง¹⁵ โรคธาลัสซีเมีย¹⁶ โรคเบาหวาน¹⁷ และภาวะเมตาบอลิกซินโดรม¹⁸ มีการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด

มากผิดปกติในร่างกาย เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated platelet) นี้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) ในบริเวณหลอดเลือดที่สำคัญ เช่น หลอดเลือดสมอง และหลอดเลือดหัวใจ ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้⁹ ดังนั้นการที่สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้นั้น น่าจะเป็นประโยชน์ในการป้องกันการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันได้

จากการศึกษาสารที่มีอยู่ในลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย²⁰⁻²² สารฟลาโวนอยด์มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การหลั่งสารไซโตไคน์ (cytokine) ที่เกิดขึ้นจากการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน²³ แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ยังไม่ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโทรฟิล ผลการศึกษาการทำงานของเซลล์นิวโทรฟิลในครั้งนี้เป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากสารสกัดที่มีความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL ช่วยเพิ่มความสามารถของเซลล์นิวโทรฟิลในการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงควรแยกสารสกัดหยาบนี้ให้เป็นสารบริสุทธิ์ ด้วยวิธี liquid chromatography และศึกษากลไกการทำหน้าที่ของเซลล์ต่อไป จากผลการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นและเป็นประโยชน์ในการนำยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ภูมิปัญญาชาวบ้านไปประยุกต์ใช้และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ของชุมชนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และอำนวยความสะดวกจิวเคราะห์ในครั้งนี้ และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย

1. Nilesch KJ, Santram L, Avijeet J, Alok N, Abhay KS. Effect of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels fruit on carbon tetrachloride-induced acute oxidative damage in livers of rats and mice. J Chin Integr Med. 2011; 9: 49-56.
2. Johnson M, Alias A. Somoclonal variation studies on *Phyllanthus amarus* schum & Thonn. Int J Biochem. 2007; 5(4): 240-5.
3. Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Mehrotra BN, Ray C. Screening of Indian plants for biological activity: part I. Indain J Exp Biol .1968; 6: 232-47.
4. Ooi LS, Sun SS, Ooi VE. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(8): 1440-6.
5. Nor FM, Mohamed S, Idris NA, Ismail R. Antioxidative properties of *Pandanus amaryllifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. Food Chem. 2008; 110(2): 319-27.
6. Chirico S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. Methods Enzymol. 1994; 233: 314-8.
7. Wardle EN. Assessment of neutrophil function-II. Laboratory tests of neutrophil function. Postgrad Med J. 1986; 62(734): 1089-92.
8. Bednar B, Condra C, Gould RJ, Connolly TM. Platelet aggregation monitored in a 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists. Thromb Res. 1995; 77(5): 453-63.
9. Amic D, Davidovic D, Beslo D and Trinajstic N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Croat Chem Acta. 2003; 76: 55-61.
10. Jimtaisong A, Krisdaphong P. Antioxidant activity of *Pandanus amaryllifolius* leaf and root extract and its application in topical emulsion. Trop J Pharm Res. 2013; 12(3): 425-31.
11. Jain NK, Singhai AK. Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats. Asian Pac J Trop Med. 2011; 4(6): 470-4.
12. Nor FM, Mohamed S, Idris NA, Ismail R. Antioxidative properties of *Pandanus amaryllifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. Food Chem. 2008; 110(2): 319-27.
13. Harikumar K, Kuttan R. An extract of *Phyllanthus amarus* protects mouse chromosomes and intestine from radiation induced damages. J Radiat Res. 2007; 48: 469-76.
14. Kobzar G, Mardla V, Samel N. Effects of α -tocopherol, l-arginine, and quercetin on aggregation of human platelets. Nutr Res. 2005; 25(6): 569-75.
15. Furie B, Furie BC. Cancer-associated thrombosis. Blood Cell Mol Dis. 2006; 36(2): 177-81.
16. Setiabudy R, Wahidiat PA, Setiawan L. Platelet aggregation and activation in thalassemia major patients in Indonesia. Clin Appl Thromb Hemost. 2008; 14(3): 346-51.
17. Lopez E, Bernal-Ero A, Hernandez-Cruz JM, Salido GM, Redondo PC, Rosado JA. Immunophilins are Involved in the Altered Platelet Aggregation Observed in patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Curr Med Chem. 2013; 20(14): 1912-21.
18. Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. Thromb Res. 2008; 122(6): 727-35.

19. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2482-94.
20. Antara S, Amla B. The study of in vitro and in vivo antioxidant activity and total phenolic content of *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn: A medicinally important plant. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013; 5(3): 942-7.
21. Tapas, AR, Sakarkar, DM, Kakde, RB. Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res*. 2008; 7: 1089-99.
22. Jain NK, Singhai AK. Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats. *Asian Pac J Trop Med*. 2011; 4: 470-4.
23. Middleton E Jr. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol*. 1992; 43(6): 1167-79.

“สนามฝึกทักษะรถนั่งคนพิการ” “Wheelchair skill training circuit”

■ ณรงค์รัตน์ สวัสดิทานนท์
Narongrat Sawattikanon

ภาควิชาเวชศาสตร์ฟื้นฟู คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Rehabilitation Medicine Department, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

* Corresponding author (Email: thisisnarita@hotmail.com)

Received April 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

The Wheelchair Skills Program (WSP) version 3.2 has been used worldwide due to its comprehensive instructions on the setting, training, and the evidence of its efficacy from the literatures. However, the WSP v.3.2 program including 18 skill trainings, occupies a relatively large space which could disturb patients who undertakes other rehabilitation interventions. Therefore, the idea of designing the WSP training circuit that situated in the garden was emerged. This wheelchair skill training circuit has been taken place in the garden for coziness and relaxation. The aim was to design the wheelchair training circuit that meets the standard requirements, user-friendly, and safe. Inexpensive and durable local materials such as cement concrete with wire mate was used. Besides, this circuit can also be used for walking training so that it could help promote functional mobility of other disabled patients returning to the community.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 154-159. Doi: 10.14456/jams.2015.9

Keywords: Wheelchair skill program, wheelchair skill training circuit, disabled patients

บทคัดย่อ

แบบฝึกโปรแกรมทักษะรถนั่งคนพิการ Wheelchair Skills Program (WSP) version 3.2 ถูกใช้อย่างแพร่หลายเพราะมีคำอธิบายการฝึกอย่างละเอียดและนำอุปกรณ์ที่นำมาใช้ทดสอบ และมีงานวิจัยแสดงผลการฝึกที่มีประสิทธิภาพ แต่จากการฝึกทักษะรถนั่งคนพิการให้ผู้ป่วย พบว่าต้องมีพื้นที่จัดวางอุปกรณ์ในการสอน 18 กลุ่มทักษะ ทำให้ไม่สะดวกต่อการใช้งานของพื้นที่ในการบำบัดฟื้นฟูสภาพอย่างอื่น ๆ จึงเกิดแนวคิดที่ต้องการสร้างสนามฝึกทักษะรถนั่งคนพิการขึ้นโดยใช้พื้นที่ร่วมกับสวนหย่อม มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบและสร้างสนามฝึกให้มีความสะดวกในการใช้งาน ปลอดภัยในการฝึก และมีมาตรฐาน วัสดุเป็นคอนกรีตเสริมลวดเหล็กซึ่งหาได้ง่ายมีราคาถูก และมีความแข็งแรงทนทาน สนามฝึกแห่งนี้สามารถใช้ฝึกสอนทักษะการเดิน จึงน่าจะมีประโยชน์ในการฟื้นฟูสภาพผู้ป่วยและคนพิการกลับสู่สังคมได้ดีขึ้น

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 154-159. Doi: 10.14456/jams.2015.9

คำรหัส: โปรแกรมทักษะรถนั่งคนพิการ สนามฝึกทักษะรถนั่งคนพิการ คนพิการ

การสอนผู้ป่วยอัมพาตใช้รถนั่งคนพิการจะทำเมื่อผู้ป่วยไม่สามารถเดินเองได้โดยอิสระและปลอดภัย หรือใช้พลังงานและเวลาในการเดินมากไม่สามารถเดินในระยะไกลนอกบ้านได้ ผู้ป่วยที่มารับการฟื้นฟูสภาพที่ภาควิชาเวชศาสตร์ฟื้นฟู คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยอัมพาตไขสันหลัง โดยเฉพาะผู้ป่วยอัมพาตครึ่งล่าง (paraplegia) ที่สามารถกลับไปดำเนินชีวิตประจำวันได้เองโดยอิสระ แต่ไม่สามารถเดินได้ จำเป็นต้องใช้รถนั่งคนพิการเคลื่อนที่ไปยังสถานที่ต่างๆ ในชุมชนที่มีสิ่งอำนวยความสะดวกสำหรับรถนั่งคนพิการ เช่น ทางลาดชัน 1 : 12 มีความยาวแต่ละช่วงไม่เกิน 6 เมตร หากเกินต้องจัดให้มีพื้นราบกว้าง 1.5 เมตร สำหรับจอดพัก ห้องสุขา ณ จุดขึ้นรถนั่งรถกำหนดความสูงระหว่าง 0.45-0.50 เมตร และมีพื้นที่ว่างเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ต่ำกว่า 1.5 เมตร สำหรับรถนั่งคนพิการหมุนเลี้ยวกลับได้ เป็นต้น เมื่อนักกายภาพบำบัดตั้งเป้าหมายในการฝึกโปรแกรมทักษะรถนั่งคนพิการแล้วแบบฝึกโปรแกรมทักษะรถนั่งคนพิการ (Wheelchair Skills Program, WSP) version 3.2 จะถูกนำมาใช้ WSP เป็นแบบฝึกที่อ้างอิงจาก Kirby¹ มีบริบทเชื่อมโยงกับสิ่งอำนวยความสะดวกสำหรับรถนั่งคนพิการในประเทศไทย เช่น การขึ้นขึ้นลงทางลาดชัน การเลี้ยวในพื้นที่แคบ การย้ายตัวแบบฝึกนี้มีลักษณะเด่นคือ ประกอบด้วยแบบทดสอบทักษะรถนั่งคนพิการ (Wheelchair Skills Test, WST) จำนวน 57 ข้อ แบบสอบถามเกี่ยวกับวิธีการปฏิบัติทักษะรถนั่งคนพิการ (questionnaire version of the WST, WST-Q) และวิธีการฝึกทักษะรถนั่งคนพิการ (Wheelchair Skills Training Program, WSTP) ทั้งนี้การใช้อุปกรณ์ในการทดสอบและการฝึกต้องเป็นไปตามมาตรฐานที่แนะนำในแบบฝึกและมีคำอธิบายการฝึกแต่ละกลุ่มทักษะอย่างละเอียดโดยคำนึงถึงความปลอดภัยในการฝึกซึ่งต้องใช้ spotter strap² เพื่อป้องกันรถนั่งคนพิการหงายหลังขณะทำการฝึกและทดสอบ ผลการทำวิจัยเรื่องการศึกษาความพร้อมทักษะการใช้รถนั่งคนพิการสำหรับผู้ป่วยอัมพาตครึ่งล่าง³ คณะผู้ทำวิจัยสร้างอุปกรณ์การฝึกและทดสอบทักษะการใช้รถนั่งคนพิการ โดยใช้วัสดุทำจากไม้เนื้อแข็งที่สร้างได้ง่ายแต่ไม่สะดวกเนื่องจากสิ้นเปลืองเวลาในการติดตั้งอุปกรณ์และถอดเก็บ ประกอบกับสถานที่ต้องใช้ร่วมกับการฝึกอื่นๆ เช่น การเดินและการฝึกทรงตัว ในห้องออกกำลังกายพื้นที่ขนาด 12x12 เมตร ผู้วิจัยจึงดัดแปลงพื้นที่บริเวณอาคารเวชศาสตร์ฟื้นฟู พื้นที่ขนาด 7x26 เมตร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบอุปกรณ์การฝึกและทดสอบทักษะรถนั่งคนพิการให้มีความสะดวกในการใช้งาน ปลอดภัยในการฝึก และมีมาตรฐาน โดยใช้วัสดุคอนกรีตเสริมลวดเหล็กยกพื้นสูงจากพื้นดิน 10 เซนติเมตร พื้นมีความหยาบไม่ขัดมัน

บริเวณขอบคอนกรีตใช้แผ่นเหล็กฉากหุ้มตำแหน่งที่มีการกระแทกกับล้อรถนั่งคนพิการบ่อย สนามฝึกออกแบบให้มีความกลมกลืนกับสวนหย่อม มีไม้ดอกไม้ประดับ เพื่อสร้างบรรยากาศการฝึกให้มีความผ่อนคลาย ร่มรื่น และใช้เป็นสถานที่พักผ่อนของผู้ป่วยและญาติที่มารับบริการของภาควิชาเวชศาสตร์ฟื้นฟู พื้นที่สนามฝึกถูกออกแบบให้มีความต่อเนื่อง (circuit) เพื่อประหยัดพื้นที่ และเพื่อความสะดวกปลอดภัยในการใช้รถนั่งคนพิการเคลื่อนที่ไปยังสถานที่ฝึกของแต่ละกลุ่มทักษะ โดยนักกายภาพบำบัดสามารถนำผู้ป่วยไปยังฐานการฝึกต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว สามารถฝึกผู้ป่วยได้คราวละ 3-4 คนในเวลาเดียวกัน อย่างไรก็ตามควรมีนักกายภาพบำบัดดูแลขณะฝึกอย่างใกล้ชิด บริเวณที่เข็นรถนั่งคนพิการใช้ราวเหล็กกันเพื่อป้องกันรถนั่งคนพิการตกลงไปในสวนหย่อม ฐานการฝึกใช้พื้นที่มาตรฐานตามที่แนะนำกเว้นฐานการเข็นรถนั่งคนพิการบนพรม ที่ปรับใช้หญ้าเทียมแทนพรมเนื่องจากสนามเป็นที่เปิดโล่งไม่มีหลังคาทำให้พรมเปียกน้ำฝนได้และมีโอกาสเสื่อมสภาพไว จึงใช้หญ้าเทียมแต่ยังคงมีความยากเพราะเกิดแรงต้านการเข็นคล้ายพรม คนพิการของไทยมีโอกาสเข็นบนสนามหญ้ามากกว่าเข็นบนพรมที่ใช้ปูพื้นบ้านในต่างประเทศ ส่วนฐานการฝึกเปิด-ปิด ประตู ใช้ประตูของห้องฝึกออกกำลังกายเนื่องจากประตูสร้างจากไม้และมีโอกาสสุกกรอบหากถูกน้ำฝนเป็นประจำ นอกจากจะสอนผู้ป่วยฝึกทักษะเข็นด้วยตนเองแล้วยังใช้สนามฝึกทักษะรถนั่งคนพิการสอนญาติเป็นผู้ขึ้นให้ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่สามารถเข็นรถนั่งคนพิการด้วยตนเองได้ โดยเน้นให้เกิดความปลอดภัยและถูกวิธี เช่น เข็นขึ้น-ลงทางลาด เข็นข้ามสิ่งกีดขวาง เข็นข้ามร่องน้ำ เข็นบริเวณที่เป็นกรวด เป็นต้น สำหรับผู้ป่วยฝึกทักษะเข็นด้วยตนเองควรใช้รถนั่งคนพิการที่มีน้ำหนักเบา (lightweight wheelchair) ซึ่งใช้พลังงานในการเข็นน้อย ใช้เวลาฝึกวันละ 2 ชั่วโมง จำนวน 5 วัน สามารถออกสู่ชุมชนที่มีสิ่งอำนวยความสะดวกสำหรับรถนั่งคนพิการได้ จากการฝึกที่ผ่านมาคนพิการบางรายเสนอแนะสร้างพื้นที่การฝึกขึ้นลงบันไดโดยใช้รถนั่งคนพิการด้วย นอกจากนี้ยังมีการสร้างหลุมหัดพัตลูกกอล์ฟโดยเจาะพื้นสนามคอนกรีตเป็นรูกลมขนาด 7 เซนติเมตร ลึก 7 เซนติเมตร จำนวน 5 หลุมมีความยากง่ายแตกต่างกัน เช่น พัตลูกกอล์ฟทางราบ พัตขึ้นเนิน พัตข้ามสิ่งกีดขวาง เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อใช้กีฬาเป็นกิจกรรมยามว่างฝึกหัดผู้ป่วยที่สามารถเดินได้ฝึกยืนทรงตัวลดความเสี่ยงการล้มโดยพัตลูกกอล์ฟลงหลุมเมื่อเลิกฝึกใช้ท่อพีวีซีปลายปิด ครอบหลุมกอล์ฟให้พื้นราบเรียบไม่เป็นอุปสรรคต่อการฝึกทักษะรถนั่งคนพิการ นอกจากนี้สนามฝึกรถนั่งคนพิการยังสามารถใช้ฝึกทักษะการเดินของผู้ป่วยด้วยออกแบบการฝึกเดินในที่แคบแบบต่อส้นกับ

ปลายเท้า (tandem steps) และเดินก้าวตามความยาวที่กำหนดไว้ โดยใช้หินปูพื้นสนามทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร วางเรียงบนพื้นดิน นอกจากนี้ยังมีส่วนพื้นซึ่งเป็นทางราบและยาว เพื่อทดสอบการเดิน 10 meter walk test (10 MWT)⁴ และ

walking index for spinal cord injury (WISCI)⁵ ค่าใช้จ่ายในการสร้างสนามฝึกทักษะรถนั่งคนพิการเป็นเงิน 60,000 บาท ไม่รวมค่าตกแต่งสวนหย่อม

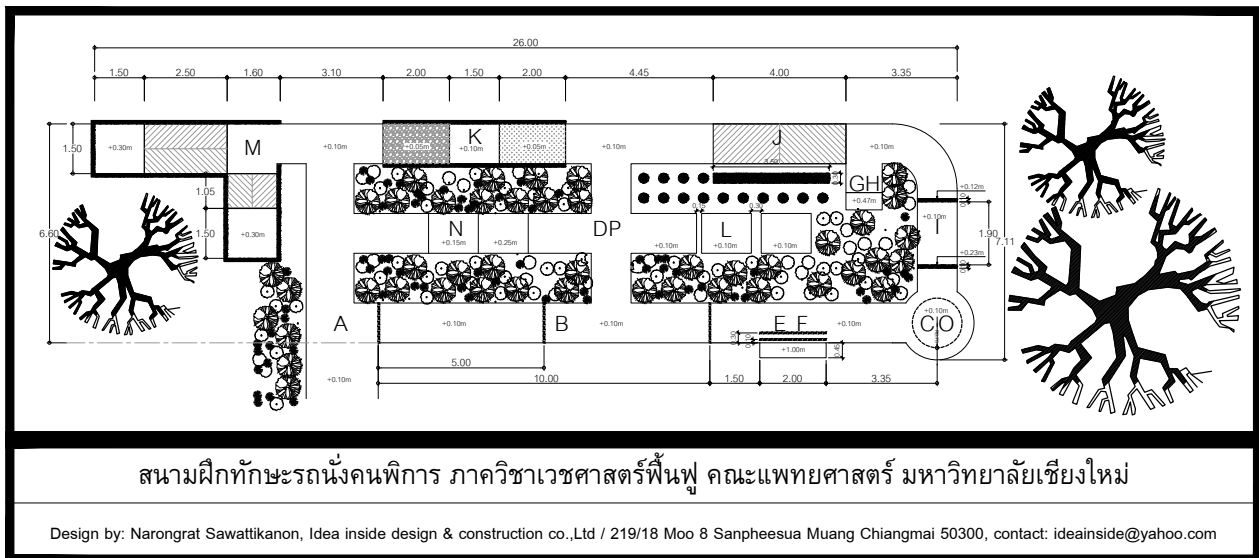


Figure 1 Figure frame of wheelchair skill training circuit.

Table 1. Skills and characteristics of occupied areas of wheelchair skill training circuit

Skill names	Occupied Areas	Characteristics of occupied areas
Applies brake Moves armrests away and back Moves footrests away and back	A	Level surface area of at least 12x12 meters.
Propels the wheelchair	B	Level surface area of 1.2 meters wide and 10 meters long, with the additional length of at least 1.5 meters at the starting and finishing ends, the observed lines are set at the 0, 5, 10 meters.
Turns in narrow space	C	Level surface area in a circle diameters of 1.5 meters.
Turns 90°	D	Level surface area of 1.2 meters wide, containing the length of 0.5 meters for a straight direction, 90° turning point, and then 0.5 meters for a straight direction. The additional distance of at least 1.5 meters are set at the starting and finishing ends.
Maneuvers sideways	E	The obstacle is set to the side of the pathway, with two lines parallel to the obstacle. The starting line is 2 meters long and at 30 centimeters away from the obstacle. The finishing line is 2 meters long and at 10 centimeters away from the obstacle.
Reaches high object Picks object up from floor	F	Reach high object skill is set by the concrete table with 90 centimeters high and 45 centimeters wide. The reaching object size is 2.5 diameters and is set at 1.5 meters high from the table. The object size of 5x10x10 centimeters, weighs 200 is set for pick up object from floor skill.
Transfers to and from bench	G	Bench size of 1 meter long, 0.5 meter wide and 0.47 meter high. Level surface area of at least 1.2x1.2 meters.

Table 1. Skills and characteristics of occupied areas of wheelchair skill training circuit (continued)

Skill names	Occupied Areas	Characteristics of occupied areas
Folds and unfolds wheelchair	H	Bench size 1 meter long, 0.5 meter wide and 0.47 meter high. Level surface area of at least 1.2x1.2 meters.
Rolls across obstacles	I	Level surface area of 1.2 meters wide, with two obstacles of each 2 and 13 centimeters high, 10 centimeters wide and 1 meter long. Distance before rolling across each obstacles is at least 50 centimeters.
Rolls across side-slope	J	Right and left side-slope of 5° occupied area of 1.2 meters wide and 4 meters long. Roll across side-slope training must be in a straight direction and must not exceed the 10-centimeter-widened line. The additional distance of at least 1.5 meters are set at the starting and finishing ends.
Rolls on uneven surface	K	Two areas laid with artificial grass and pebble stones. Each area is 1.2 meters wide and 2 meters long, with the additional distance of at least 1.5 meters at the starting and finishing ends.
Gets over gap	L	Level surface area of 1.2 meters wide, and two gaps of each 15 and 30 centimeters wide and 5.1 centimeters deep. The additional distance of at least 1.5 meters are set at the starting and finishing ends.
Ascends and descends 5° incline	M	Two inclines surface areas are 5° incline with 2.5 meters long and 7.5° with 1 meter long. Both inclines are 1.2 meters wide.
Gets over threshold	N	Two different surface level of each 5 and 15 centimeters high and 1.2 meters wide, with the additional distance of at least 1.5 meters at the starting and finishing ends.
Performs stationary wheelie in narrow space	O	Level surface area in a circle diameters of 1.5 meters.
Turns 90° in place in wheelie	P	Level surface area of 1.2 meters wide, containing the length of 0.5 meters for a straight direction, 90° turning point, and then 0.5 meters for a straight direction. The additional distance of at least 1.5 meters are set at the starting and finishing ends.



Figure 2 Wheelchair skill training circuit.



Figure 3 Concrete covered with metal sheet steel along the positions where hit by the wheelchair.



Figure 4 Get over gap skill training.

สรุป

การสร้างสนามฝึกทักษะรถนั่งคนพิการตามมาตรฐานการฝึกของ Kirby version 3.2 สามารถสร้างแบบเป็น circuit ได้

มีประโยชน์ทั้งการฝึกทักษะรถนั่งคนพิการและใช้เป็นสถานที่ฝึกเดิน ฝึกยืนทรงตัว เป็นสถานที่ทดสอบการเดินและสร้างสวนหย่อมประดับเพื่อความสวยงามใช้เป็นสถานที่พักผ่อนได้

1. Kirby RL. Wheelchair skills program (WSP) version 3.2 manual [Internet]. [cited 2005 May 26]. Available from: URL:www.wheelchairskillsprogram.ca/.
2. Kirby RL, Lugar JA. Spotter strap for the prevention of wheelchair tipping. *Arch Phys Med Rehabil* 1999; 80(10): 1354-6.
3. Tangsagulwatthana S, Sawattikanon N, Kovindha A. Wheelchair skills training for individual with spinal cord injury: a pilot study. *Thai J Phys Ther* 2008; 32(3): 173-80.
4. van Hedel HJ, Wirz M, Curt A. Improving walking assessment in subjects with an incomplete spinal cord injury: responsiveness. *Spinal Cord* 2006; 44: 352-6.
5. Ditunno PL, Dittuno JF Jr. Walking index for spinal cord injury (WISCI II): scale revision. *Spinal Cord* 2001; 39: 654-6.

คำแนะนำสำหรับผู้เขียน

การส่งบทความต้นฉบับ

นิพนธ์ต้นฉบับสามารถส่งผ่านระบบออนไลน์เว็บไซต์ <http://www.ams.cmu.ac.th/journal> หรือ ส่งต้นฉบับจำนวน 2 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกข้อมูล (CD) ที่ระบุโปรแกรมที่ใช้พิมพ์มายัง

บรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เลขที่ 110 ถนนอินทวโรสุ ต่าบลสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

โทรศัพท์ : (053) 945080 ต่อ 17

โทรสาร : (053) 946042

E-mail : preeyanat.v@cmu.ac.th

ข้อมูลทั่วไป

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ เป็นวารสารทางวิชาการของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยินดีพิจารณาบทความที่มีคุณภาพด้านเทคนิคการแพทย์ วัสดุเทคนิค กิจกรรมบำบัด กายภาพบำบัด และด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์สุขภาพ โดยผ่านระบบการตรวจประเมินและได้รับการยอมรับจากผู้ทรงคุณวุฒิภายในหรือภายนอก ผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชานั้นๆ อย่างน้อย 2 ท่าน บทความที่เสนอขอรับการพิจารณาต้องไม่เคยตีพิมพ์ หรืออยู่ในระหว่างการเสนอต่อวารสารอื่นใด บทความที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้แล้ว ถือเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประเภทของบทความที่ส่งตีพิมพ์

1. **นิพนธ์ต้นฉบับ (Research article)** เป็นรายงานผลงานวิจัยในด้านที่เกี่ยวข้องโดยที่บทความนั้นยังไม่เคยตีพิมพ์ หรืออยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ในวารสารอื่นใด
2. **รายงานเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และวัสดุเทคนิค (Short technical report)** เป็นรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจในห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ กายภาพบำบัด กิจกรรมบำบัด และวัสดุเทคนิค โดยแสดงรายละเอียดทั้งวิธีการและผลการใช้เทคนิคนั้น เปรียบเทียบกับวิธีเดิม รวมถึงการวิจารณ์และสรุปผล
3. **นิพนธ์ปริทัศน์ (Review article)** เป็นบทความที่รวบรวมเอาผลงานในเรื่องใดเรื่องหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งเคยลงตีพิมพ์แล้วนำมาวิเคราะห์วิจารณ์เปรียบเทียบเพื่อให้เกิดความกระจ่างในเรื่องนั้นยิ่งขึ้น
4. **บทความทั่วไป (General article)** เป็นบทความที่มีวิชาการเฉพาะด้านรวมอยู่ด้วยค่อนข้างน้อย เขียนเพื่อให้บุคคลทั่วไปสามารถอ่านเข้าใจตลอด
5. **บันทึก (Note)** เป็นบทความหรือรายงานผลการวิจัยคล้ายข้อ 1 และข้อ 2 แต่มีความกะทัดรัดกว่าทั้งในเนื้อหาและรายละเอียด
6. **ปกิณกะ (Miscellany)** เป็นบทความทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ เช่น การวิจารณ์ผลเวชศาสตร์ชั้นสูง การตอบปัญหาทางด้านเวชศาสตร์ชั้นสูง เป็นต้น
7. **จดหมายถึงบรรณาธิการ (Letter to editor)** เป็นบทความทางวิชาการหรืออื่นๆ ที่เป็นบันทึกสั้นๆ ในรูปของจดหมายถึงบรรณาธิการ เพื่อแสดงความคิดเห็นและประสบการณ์ในทางวิชาการ
8. **การออกความเห็น (Commentaries)** และ รายงานการประชุม (Meeting report) การแสดงออกความเห็นสามารถแสดงความสนใจ ความสำคัญและความถูกต้องแท้จริง อย่างไรก็ตามยังสามารถแสดงความไม่เห็นด้วยได้เช่นกัน ในส่วนของรายงานการประชุมจะถูกพิจารณาในลักษณะเดียวกับการแสดงออกความเห็น

คำแนะนำสำหรับการเตรียมต้นฉบับ

1. **ภาษาที่ใช้** มี 2 ภาษาคือ ภาษาไทย และ/หรือภาษาอังกฤษ ใช้อักษร Browallia New 14 สำหรับตัวอักษรและขนาด 12 สำหรับสัญลักษณ์ ต้นฉบับภาษาไทย ควรใช้ถ้อยคำและศัพท์ภาษาไทยให้มากที่สุด โดยใช้พจนานุกรมศัพท์แพทย์อังกฤษ-ไทยฉบับราชบัณฑิตยสถานเป็นบรรทัดฐาน คำศัพท์ภาษาอังกฤษที่บัญญัติเป็นภาษาไทยแล้วแต่ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลายหรือแปลแล้วเข้าใจยาก ให้ใส่ภาษาเดิมกำกับไว้ในวงเล็บหรืออนุโลมให้ใช้ภาษาอังกฤษได้
2. **ต้นฉบับ** ใช้กระดาษสีขาวขนาด 8.5x11 นิ้ว พิมพ์หน้าเดียว ชิดซ้าย เว้นระยะระหว่างบรรทัด 2 ช่วง (2 spaces) ใช้โปรแกรม และตัวพิมพ์มาตรฐาน มีเลขที่หน้ากำกับทุกหน้า
3. **ชื่อเรื่อง** ให้มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษเป็นข้อความสั้นๆ และสื่อความหมาย บ่งชี้ให้เห็นสาระสำคัญของเนื้อหาในบทความไม่ควรใช้คำย่อนอกจากคำย่อนั้นเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไป
4. **ชื่อผู้แต่ง** ให้ใส่ชื่อตัวและชื่อสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ กรณีที่ผู้แต่งหลายคนให้เรียงตามลำดับความสำคัญในงานนั้นๆ และให้ระบุชื่อและสถานที่ติดต่อพร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร หรือ E-mail address ของผู้รับผิดชอบบทความเพื่อการติดต่อได้สะดวก กรณีที่มีผู้วิจัยมากกว่าหนึ่งคน ให้ลำดับด้วยตัวอักษรจาก A ถึง Z และเครื่องหมายดอกจันทน์สำหรับผู้รับผิดชอบบทความ
5. **บทคัดย่อ** ให้มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ (Abstract) ความยาวไม่เกิน 400 คำ โดยแบ่งเป็น 5 หัวข้อเรียงตามลำดับ ดังนี้ บทนำ ที่มาของปัญหาวิจัย วัตถุประสงค์ วัสดุและวิธีการ ผลการศึกษา และสรุป ผลการศึกษา ทั้งนี้ให้มีคำรหัส (Keyword) จำนวน 3-5 คำ

6. โครงสร้างของบทความ สำหรับนิพนธ์ต้นฉบับให้เรียงลำดับตามหัวข้อ ดังนี้:-

- บทนำ (Introduction) ซึ่งรวมถึงวัตถุประสงค์หรือสมมติฐานในการศึกษา เนื้อหาที่สำคัญสั้นๆ ความสำคัญของงานปัจจุบันที่กำลังทำ พร้อมอ้างอิงงานที่มีการพิมพ์เผยแพร่มาก่อนหน้าและแสดงความคิดเห็นประกอบ
- วัสดุและวิธีการ (Materials and methods) การทดลองสั้นๆ พอที่ผู้อ่านเข้าใจในรายละเอียดของการศึกษา และผู้อ่านอาจสามารถนำไปทดลองต่อได้
- ผลการศึกษา (Results) ผลการศึกษารายละเอียดเฉพาะผลการศึกษาที่ได้รับจากการศึกษานี้ เช่น ข้อมูลจากรูปภาพ ตารางข้อมูล สามารถอธิบายเหตุผลที่เกินกว่าข้อมูลได้ในส่วนของวิจารณ์ผลการศึกษา
- วิจารณ์ผลการศึกษา (Discussion)
- สรุปผลการศึกษา (Conclusion)
- กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) กรณีที่งานวิจัยนั้นได้รับทุนวิจัยให้ระบุแหล่งที่มาของทุนวิจัยนั้นด้วย
- เอกสารอ้างอิง (References) การอ้างอิงเอกสารในเรื่องให้อ้างอิงเรียงตามลำดับเลขที่ของเอกสารอ้างอิงซึ่งอยู่ท้ายเรื่อง โดยใส่ตัวเลขแบบยกต่อท้ายข้อความนั้นๆ

7. ตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ

- ตาราง แผนภูมิ รูปภาพประกอบ ให้แยกไว้ต่างหาก หนึ่งไฟล์ ต่อ 1 ตาราง หรือ 1 แผนภูมิ หรือ 1 รูปภาพ บันทึกโดยใช้นามสกุล .jpg หรือ .tif ให้มีความละเอียดเพียงพอ
- คำอธิบายรูป (Figure legend) ให้พิมพ์แยกไว้ต่างหาก คำอธิบายภายในรูปให้ใช้ภาษาอังกฤษ
- ชื่อตารางและคำอธิบายในตารางให้ใช้ภาษาอังกฤษ

การตรวจทาน (Proof)

บทความที่ได้รับการยอมรับให้พิมพ์จะส่งกลับไปยังผู้วิจัยเพื่อตรวจทานผ่าน E-mail ของผู้วิจัยก่อนการตีพิมพ์

ค่าใช้จ่ายในการพิมพ์ (Page charge)

ไม่มี

การเขียนเอกสารอ้างอิง

1. การเขียนเอกสารอ้างอิง ให้ใช้ระบบแวนคูเวอร์ (Vancouver) เท่านั้น
2. เอกสารอ้างอิง ที่เป็นภาษาไทยให้แปลเป็นภาษาอังกฤษ และต่อท้ายด้วย (in Thai)

ตัวอย่างการเขียนเอกสารอ้างอิง

- Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N Engl J Med 2002 Jul 25; 347(4): 284-7
- Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. Brain Res 2002; 935(1-2): 40-6
- Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. Headache 2002; 42 Suppl 2: S93-9
- Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs 2002 Jun [cited 2002Aug 12];102(6):[about 1 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm> Article
- Forooghian F, Yeh S, Faia LJ, Nussenblatt RB. Uveitic foveal atrophy: clinical features and associations. Arch Ophthalmol. 2009 Feb; 127(2): 179-86. PubMed PMID: 19204236; PubMed Central PMCID: PMC2653214 Who's Certified [Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp> Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.
- Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002
- Chanungklang P, Vongchan P. Screening and identification of alloantibodies in blood samples from Community Medical Service Project, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University [Term paper]. Faculty of Associated Medical Sciences: Chiang Mai University; 2012 (in Thai).
- Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15 ; Leeds, UK. New York: Springer, 2002.
- Portney JG, Watkins MP. Foundation of clinical research applications to practice. 2nd United States of America. Julie Alexandar; 2000.

Instructions for Authors

How to send original article/thesis

Original article/thesis can be submitted through the on-line system via website <http://www.ams.cmu.ac.th/journal> or by sending 2 original hard copies and CD (please specify the program used to print) to the editorial office at

The Office of Editor of Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences
Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University
110 Inthawaroros Rd., T.Sriphum, A.Muang,
Chiang Mai Thailand 50200
Telephone: (053) 945080 Ext. 17 Fax: (053) 946042
E-mail: preeyanat.v@cmu.ac.th

General Principles

Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences is a scientific journal of the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University. The articles submitted to the bulletin that are relevant to any of all aspects of Medical Technology, Radiologic Technology, Occupational Therapy, Physical Therapy and other aspects related to the health sciences are welcome. Before publication, the articles will go through a system of assessment and acceptance by at least two experts who are specialized in the relevant discipline. All manuscripts submitted to Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences should not have been previously published or under consideration for publication elsewhere. All publications are protected by the Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences' copyright.

Manuscript categories

1. Research article is a research paper that is relevant to any of all aspects described above and must not have been previously published or be under consideration for publication elsewhere.
2. Short technical report is a formal report of a technology innovation in a field of Medical laboratory, Physical Therapy, Occupational Therapy and Radiologic Technology which details method, results, discussion and conclusion.
3. Review article is an article that provides a comprehensive review of a topic having direct relevance to research on the specific topics. It analyzes or discusses research previously published by others.
4. General article is an article that is less technical and permits access by the people in general, compared to a research article.
5. Note is an article or research report similar to a research article but short and limited in scope.
6. Miscellany is an article relating to an article published in the health sciences such as a discussion of the result of laboratory medicine or to answer a research question on laboratory medicine.
7. Letters to the Editor is a technical article or notes or letter sent to a publication about issues of opinions and experiences from authors.
8. Commentaries and Meeting report are a series of comments or annotations of the meeting.

Manuscript Format

1. **Language.** Thai and/or English, Browsers New 14 for text and 12 for all symbols. For an original Thai article, the manuscript should use as many Thai words as possible. Author should use the Royal Institute English-Thai Medical Dictionary as a guideline for translation. For English words that have been formally translated into Thai, but not widely recognized or too difficult to understand, the English words can be placed in parenthesis for those original words.
2. **Format.** Print the original hard copy in A4 paper, size 8.5x11 inch, one-side printing, double spacing. Use standard program and fonts and, add page and line number for all pages.
3. **Title of the article.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
4. **Author names and affiliation.** Where the family name may be ambiguous (e.g. a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with superscript number immediately after author's name and in front of appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the province, country and, if available, the e-mail address of each author.
5. **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication, ensure that telephone and fax numbers (with postal area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author
6. **Abstract.** In Thai and English not exceeding 400 words. The abstract must include background, objectives, methods, results and conclusion, and 3-5 keywords should be included. The manuscripts should be arranged in the following headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Conclusion, Acknowledgement and Reference.

7. **Article structure.** Prepare according to following contents;
 - Introduction: State the objectives of work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results..
 - Materials and Methods: Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference. Only relevant modifications should be described.
 - Results: Results should be clear and concise. Present the new results of the study such as tables and figures mentioned in the main body of the article, and numbered in the order in which they appear in the text or discussion.
 - Discussion: This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.
 - Conclusions: The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a "Discussion" or "Results and Discussion".
 - Acknowledgement: Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g. providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.)
 - References: Numbering with superscript is in required.
8. **Artworks**
 - Each table, graph and figure should be self-explanatory one page per each. Save the figures as high resolution i.e., .jpg or .tiff files.
 - Separate and self-explanatory of figure legend and using English for figure description.
 - Title and description of the tables and figures should be in English.

Proof correction

The Proofs of final paper approved for publication are to be returned by e-mail to the corresponding author before publication publication.

Page charge

No page charge

References Format

1. In details of content of the article; using a superscript number after the text or paragraph to refer to the references.
2. References using the Vancouver reference system.
3. In case of references source from non-English language, translate the title to English and retain "in Thai" in the parentheses.

Examples of References list

- Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002 Jul 25; 347(4): 284-7
- Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res* 2002; 935(1-2): 40-6
- Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 2002; 42 Suppl 2: S93-9
- Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* 2002 Jun [cited 2002Aug 12];102(6):[about 1 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm> Article
- Forooghian F, Yeh S, Faia LJ, Nussenblatt RB. Uveiticfoveal atrophy: clinical features and associations. *Arch Ophthalmol.* 2009 Feb; 127(2): 179-86. PubMed PMID: 19204236; PubMed Central PMCID: PMC2653214 Who's Certified [Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp> Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.
- Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI):Central Michigan University; 2002
- Chanungklang P, Vongchan P. Screening and identification of alloantibodies in blood samples from Community Medical Service Project, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University [Term paper]. Faculty of Associated Medical Sciences: Chiang Mai University; 2012 (in Thai).
- Harnden P, Joffe JK, Jones WG, editors. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer, 2002.
- Portney JG, Watkins MP. Foundation of clinical research applications to practice. 2nd United States of America. Julie Alexandar; 2000.