

ความชุกของฮีโมโกลบินอีในคนไทยเชื้อสายมลายู ที่นับถือศาสนาอิสลาม: การวินิจฉัยระดับดีเอ็นเอ

จิตบรรจง ตั้งปอง^{1,*} สิริชัย ปัญญาใส² อรรพรรณ สารกุล¹ ธารรัตน์ ศักดิ์ศรี³

พัชรา รัตนพร³ เมธพร ศิริรูป³

¹สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

²แขนงวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรพิษณุ

³นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

บทคัดย่อ: ศึกษาความชุกของฮีโมโกลบินอีในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม จากตัวอย่างจำนวน 200 ราย อายุเฉลี่ย 20.15 ± 2.35 ปี เป็นเพศชาย 75 ราย เพศหญิง 125 ราย โดยเก็บเลือดจากตัวอย่างทุกรายนำมาตรวจวิเคราะห์ข้อมูลทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ NIHON KOHDEN MEK-8222K (Tokyo, Japan) ตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ VARIANT II (Philadelphia, PA, USA) ตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเทคนิค Allele Specific PCR (ASPCR) จากการศึกษพบว่า ค่าพารามิเตอร์ของเม็ดเลือดแดงเฉลี่ย RBC 4.49 ± 0.49 cell/mm³, Hb 12.6 ± 1.3 g/dL, Hct 39.1 ± 4.0 %, MCV 87.4 ± 6.7 fL, MCH 28.1 ± 2.6 pg, MCHC 32.2 ± 0.8 g/dL และ RDW-CV 11.3 ± 0.9 % มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A₂A จำนวน 187 ราย คิดเป็นร้อยละ 93.5 และ EA จำนวน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.5 มีค่าทางโลหิตวิทยาและดัชนีเม็ดเลือดแดงเฉลี่ยดังนี้ RBC 4.8 ± 0.5 cell/mm³, Hb 12.0 ± 1.1 g/dL, Hct 38.2 ± 3.6 %, MCV 79.1 ± 3.32 fL, MCH 4.8 ± 1.4 pg, MCHC 31.4 ± 0.8 g/dL, RDW-CV 11.4 ± 0.7 %, HbF 1.1 ± 0.2 % และ ปริมาณ Hb A2/E 31.6 ± 1.9 % เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าค่า MCV และ MCH ในกลุ่มฮีโมโกลบินอี มีค่าต่ำกว่าในกลุ่มที่มีชนิดฮีโมโกลบินเป็น A₂A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอีโดยเทคนิค Allele Specific PCR (ASPCR) เป็นผลบวกทั้ง 13 ราย จากการศึกษานี้พบความชุกของฮีโมโกลบินอีในกลุ่มคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม ร้อยละ 6.5 การค้นพบอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอีซึ่งเป็นความผิดปกติที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม จึงเป็นข้อมูลที่สามารถนำมาใช้ในการวางแผนให้คำแนะนำปรึกษา เพื่อหาแนวทางการป้องกันการถ่ายทอดของโรคสู่รุ่นลูกหลานและยังใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการเกิดโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอีในประชากรกลุ่มนี้ได้อีกด้วย

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินอี ไทยมลายู-มุสลิม ธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี อัลลีลสเปซิฟิกพีซีอาร์

บทนำ: ฮีโมโกลบินอี (HbE) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่ง ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ของเบต้าโกลบินยีน (β -globin) โดยมีการเปลี่ยนจาก GAG เป็น AAG ตำแหน่งโคดอนที่ 26 ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวเปลี่ยนจาก glutamine (E) เป็น lysine (K)¹⁻³ ซึ่งความผิดปกตินี้เกิดขึ้นในระดับดีเอ็นเอ (DNA) จึงสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้โดยส่วนใหญ่ผู้ที่ป่วยเป็นพาหะของฮีโมโกลบินอีจะไม่แสดงอาการทางคลินิกแต่จะพบว่ามีค่าผิดปกติของเม็ดเลือดแดงเพียงเล็กน้อยหากพบฮีโมโกลบินอีร่วมกับเบต้าธาลัสซีเมีย (β -thalassemia) จะทำให้เกิดโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี (β -thalassemia/HbE) ซึ่งอาการที่แสดงออกในผู้ป่วยแต่ละรายจะมีตั้งแต่รุนแรงน้อยจนถึงรุนแรงมาก ทำให้เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ^{4,6} ปัจจุบันพบว่าความชุกของฮีโมโกลบินอีในประเทศไทยสูงเป็นอันดับหนึ่ง เมื่อเทียบกับความผิดปกติของฮีโมโกลบินชนิดอื่น โดยพบว่าที่

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความชุกของฮีโมโกลบินอีมากที่สุดคือประมาณร้อยละ 32-60 รองลงมาคือกรุงเทพมหานคร พบประมาณร้อยละ 13-17 และภาคใต้พบประมาณร้อยละ 9-11⁷) การพบความชุกที่แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคสะท้อนให้เห็นถึงแหล่งกำเนิดและความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติ และในภาคใต้ของประเทศไทยก็มีความหลากหลายทางด้านเชื้อชาติไม่ว่าจะเป็น ไทยเชื้อสายอินเดีย ไทยเชื้อสายจีน รวมถึงคนไทยเชื้อสายมลายู ซึ่งพบเป็นกลุ่มประชากรส่วนใหญ่วางภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย คนไทยเชื้อสายมลายูมีการเคลื่อนย้ายอพยพเข้ามาอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยประมาณสองถึงสามพันปีก่อนประกอบกับการที่คนไทยเชื้อสายมลายูนับถือศาสนาอิสลาม ซึ่งมีวัฒนธรรมที่ไม่นิยมแต่งงานข้ามศาสนา⁸) ดังนั้นการศึกษาหาอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอี ซึ่งมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคในกลุ่มประชากรกลุ่มนี้

*ติดต่อได้ที่ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161 โทรศัพท์ 085-9100334

โทรสาร 0 7567 2106 e-mail: rjitbanj@wu.ac.th

เนื่องจากฮีโมโกลบินอีเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยมากในประเทศไทย การมีภาวะฮีโมโกลบินอีไม่ก่อให้เกิดปัญหาใดๆ ต่อการดำรงชีวิต แต่หากพบภาวะฮีโมโกลบินอีร่วมกับเบต้าธาลัสซีเมียซึ่งเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบบ่อยเช่นกันในประเทศไทย จะก่อให้เกิดโรคโลหิตจางเรื้อรังชนิดที่รุนแรงและเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับต้นๆของประเทศ ดังนั้นการค้นหาคำผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีในประชากรไทย จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศ การตรวจค้นหาคำผู้ที่เป็นฮีโมโกลบินอีทางห้องปฏิบัติการมีหลายระดับ ทั้งการตรวจกรองฮีโมโกลบินอี ด้วยวิธี การตกตะกอนด้วย dichlorophenol-indolphanol (DCIP precipitation test) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ร่วมกับ Osmotic Fragility test (OF-test) สำหรับการตรวจกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินอีในประชากรตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย แต่มีข้อเสียคือใช้เวลาทำปฏิกิริยาก่อนข้างนาน และเนื่องจากน้ำยามีสีเข้มจึงเกิดปัญหาทำให้อ่านผลได้ยาก ต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงาน จึงทำให้เกิดความผิดพลาดง่ายและไม่สอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้มักเกิดผลบวกปลอมง่ายเมื่อตั้งหลอดทิ้งไว้นาน ปัญหาเหล่านี้ส่งผลให้แผนงานการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยไม่ได้ผลดี การตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานในปัจจุบันเป็นวิธีที่สามารถแยกชนิดฮีโมโกลบินและหาปริมาณของฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ใช้หลักการของ cation exchange HPLC และ อาศัย elution buffer ที่มี ionic strength ต่างๆชนิด วิธี HPLC นี้สามารถใช้หาปริมาณฮีโมโกลบินอี และฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ ได้พร้อมกัน ใช้เลือดตัวอย่างค่อนข้างน้อย ทำให้สะดวกและให้ผลการตรวจวัดที่เชื่อถือได้ดี ส่วนการตรวจยืนยันฮีโมโกลบินอีเป็นการตรวจหาความผิดปกติระดับยีน โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งอาจสกัดได้จากเม็ดเลือดขาวเนื้อเยื่อหรือเซลล์ต่างๆ ที่มีนิวเคลียส เช่น เซลล์น้ำคร่ำและเนื้อรก ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างเพื่อใช้วินิจฉัยทารกในครรภ์ เป็นต้น การตรวจหาความผิดปกติของผู้ป่วยในระดับดีเอ็นเอจะช่วยให้การวินิจฉัยได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การตรวจยืนยันฮีโมโกลบินอีโดยการตรวจดีเอ็นเอยังใช้ในการวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ซึ่งมีอุบัติการณ์สูงในประเทศไทย และสามารถใช้ในการตรวจหาภาวะฮีโมโกลบินอีในทารกเกิดใหม่ซึ่งมีระดับของฮีโมโกลบินอีในเลือดน้อยและตรวจได้ไม่ชัดเจน⁹⁻¹²⁾

การศึกษาหาความชุกของฮีโมโกลบินอีในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม เพื่อดูว่ามีอุบัติการณ์มากน้อยเพียงใด หากการศึกษาครั้งนี้พบความชุกของฮีโมโกลบินอีสูงในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม อาจมีโอกาที่จะทำให้เกิดภาวะโลหิตจางฮีโมโกลบินอี (EE) และหากคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามมีความชุกของเบต้าธาลัสซีเมียสูงร่วมด้วย จะทำให้มีโอกาสการเกิดโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ซึ่งเป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรมชนิดรุนแรง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้สามารถนำข้อมูลมาใช้ในการให้คำแนะนำ ปรีกษา และวางแผนในการควบคุมป้องกันการเกิดโรคในประชากรกลุ่มนี้ได้

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ:

การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างเลือดจากคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม จำนวน 200 คน โดยเก็บตัวอย่างเลือดคนละ 3.0 มิลลิลิตร ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง การศึกษาในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และอาสาสมัครทุกคนให้ความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

สารเคมีและน้ำยา Dextran ($C_6H_{12}O_6$), Ammonium chloride (NH_4Cl), Potassium hydrogen carbonate ($KHCO_3$), Acetic acid, Chloroform, SDS (Sodium dodecyl sulphate), Pronase E, Sodium chloride ($NaCl$), Absolute ethanol, Na_2 EDTA, Phenol, Glycerol, Bromphenol blue, Absolute ethanol bromide, Agarose, Sodium hydroxide ($NaOH$), Triton X-100, Tris base, Boric acid (น้ำยาข้างต้นจาก Merck, USA), PCR buffer, Specific Oligonucleotide primer (Promega, USA) และ dNTPs mix, Taq DNA polymerase, λ DNA /Hind III marker (Invitrogen, USA).

เครื่องมือ และอุปกรณ์ เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ NIHON KOHDEN MEK-8222K (Tokyo, Japan), เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินอัตโนมัติ VARIANT II (Philadelphia, PA, USA) เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, USA).

การตรวจวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาเบื้องต้น

ตัวอย่างเลือดทุกรายจะถูกตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาซึ่งประกอบด้วย RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC และ RDW-CV ด้วยเครื่อง MEK-8222K, NIHON KOHDEN โดยใช้หลักการที่เรียกว่า "Volumetric impedance" โดยเครื่องจะวัดขนาดและจำนวนเซลล์ของตัวอย่างเลือด วัดปริมาณฮีโมโกลบินจากเม็ดเลือดแดงโดยจะทำปฏิกิริยากับ

potassium ferricyanide และ potassium cyanide ได้ cyan-methemoglobin และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm นับแยกชนิดและปริมาณของเม็ดเลือดขาวโดยใช้หลักการ Flow cytometry ร่วมกับ laser light scattering โดยใช้การใช้ตัวอย่างเลือดที่ถูกเจือจางแล้วผ่านเข้าสู่ flow cell เมื่อมีแสงเลเซอร์ยิงผ่านเซลล์จะเกิดการกระจายของแสงเลเซอร์ของเซลล์นั้น หลังจากนั้นตัว detector จะแปรสัญญาณของการตกกระทบแสงของเซลล์แต่ละมุ่มออกมาตามขนาด (size) องค์ประกอบภายใน (complexity) และปริมาณแกรนูลภายในเซลล์ (granularity) ทำให้เครื่องสามารถแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวทั้ง 5 ชนิด

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง

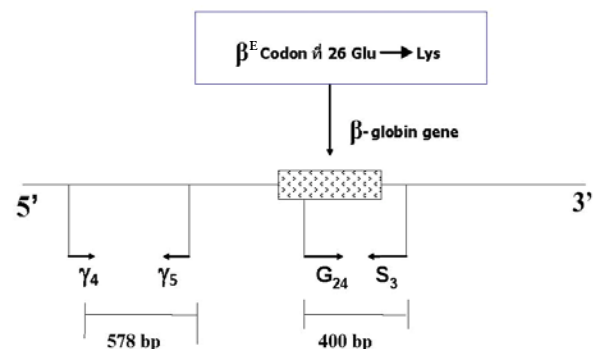
การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC), VARIANT II, BIO-RAD¹²⁻¹⁴⁾ โดยใช้ระบบ HPLC เป็นการแยกโดยอาศัยอัตราการเคลื่อนที่ของสาร และมีการแลกเปลี่ยนไอออนชนิดไอออนบวก (cation exchange chromatography) ซึ่งจะแยกชนิดของฮีโมโกลบินโดยอาศัยการเกิดแรงกระทำระหว่างไอออนในเฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase) กับหมู่แลกเปลี่ยนไอออนบนเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) โดยมีซิลิกาเจลเป็นเรซินซึ่งมีประจุลบเป็นประจุลบ เนื่องจากสารตัวอย่างมีฮีโมโกลบินกันหลายชนิด โดยแต่ละชนิดมีความแรงของประจุไม่เท่ากัน ทำให้ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดถูกแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ที่ระยะเวลาต่างๆ กันที่แน่นอน (specific retention time) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด เพราะฉะนั้นจึงใช้ retention time เป็นตัวระบุชนิดของฮีโมโกลบินได้ ส่วนการตรวจปริมาณของฮีโมโกลบิน (hemoglobin quantitation) จะทำโดยการวัดการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดโดยใช้ photometer เป็นตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และ 690 นาโนเมตร ความเข้มข้นของฮีโมโกลบินคิดเป็นร้อยละโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด โดยมีสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นของ HbA₂ และ HbF ใช้ในการปรับค่า (calibrator) เพื่อให้ค่าที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำสูง

การตรวจวิเคราะห์ DNA¹⁵⁻¹⁶⁾ ด้วยวิธี allele specific PCR (ASPCR)

การตรวจวิเคราะห์ DNA ด้วยวิธี allele specific PCR (ASPCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับฮีโมโกลบินอี นำตัวอย่างที่ตรวจพบแถบฮีโมโกลบินอีตรงตำแหน่งของ HbE

จากผลการตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบิน โดยวิธี cellulose acetate electrophoresis มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐาน และตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี ASPCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัย primer ที่จำเพาะต่อ mutation ให้ตำแหน่งของลำดับเบสที่เปลี่ยนไปอยู่ทางด้านปลาย 3' ของ primer ถ้าเป็นดีเอ็นเอของคนที่ปกติจะจับได้ไม่สมบูรณ์ทำให้ปลายทางด้าน 3' ของ primer เปิดออกส่งผลให้ไม่สามารถใช้เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้ แต่ในกรณีที่ เป็นของคนที่เป็นโรคก็สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ โดยเทคนิคนี้จะใช้ primers ทั้งหมด 4 เส้นด้วยกันคือ γ_4 กับ γ_5 ใช้เป็น primers ที่ใช้คร่อมยีนส่วนปกติที่มีอยู่ในทุกคนเป็น internal control เมื่อนำไป run electrophoresis จะได้ fragment ที่มีขนาด 578 bp และ G_{24} กับ S_3 ใช้เป็น primers ที่ใช้ในการวิเคราะห์ยีนฮีโมโกลบินอี เมื่อนำไป run electrophoresis จะได้ fragment ที่มีขนาด 400 bp ดังแสดงในรูปที่ 1

การเตรียมส่วนประกอบของการทำ ASPCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย genomic DNA 1 ไมโครลิตร primers แต่ละตัวประกอบด้วย 15 พิโคโมล ของ S_3 (5'-TCCCATAGACTCACCTGAA-3') และ G_{24} (5'-CGTGG ATGAAGTTGGTGGTA-3') 7.5 พิโคโมล ของ γ_4 (5'-GG CCTAAAACACAGAGAGT-3') กับ γ_5 (5'-CCAGAAGC GAGTGTGTGGAA-3') 200 ไมโครโมล dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) และ 1 unit ของ Taq-DNA polymerase ใน 10 mM Tris-HCl (pH 7.9) 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100 และ 3 mM MgCl₂ นำส่วนผสมไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ซึ่งมีสภาวะการทำงาน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ annealing ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 รอบ extension ที่ 65 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที และ final extension ที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยเทียบขนาดกับ λ /Hind III marker



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งของยีนบีตาโกลบิน และการแทนที่ของเบสที่ทำให้เกิดฮีโมโกลบินอี และตำแหน่งของ primers ที่ใช้ในเทคนิค ASPCR

และดูแถบ ดีเอ็นเอภายใต้แสง UV หลังจากย้อมเจลด้วย ethidium bromide

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่า Mean $\pm$ SD และเปรียบเทียบค่าทางสถิติใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4 (IL, USA) โดยใช้สถิติ Unpaired-*t*-test ตามด้วย Welch's correction ที่ค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผล:

ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

การตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาและค่าดัชนีชี้วัดของเม็ดเลือดแดง จากตัวอย่างเลือดชาวไทยเชื้อสายมลายู ที่นับถือศาสนาอิสลาม 200 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้คือ RBC 4.49 ± 0.49 cell/mm³, Hb 12.6 ± 1.3 g/dL, Hct 39.1 ± 4.0 %, MCV 87.4 ± 6.7 fL, MCH 28.1 ± 2.6 pg, MCHC 32.2 ± 0.8 g/dL และ RDW-CV 11.3 ± 0.9 % ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน

การตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน พบชนิดของฮีโมโกลบิน 2 แบบ คือ A₂A จำนวน 187 ราย คิดเป็นร้อยละ 93.5 และ EA จำนวน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.5 ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการเปรียบเทียบค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม

ค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามที่มีฮีโมโกลบินปกติ (A₂A) และที่มีฮีโมโกลบินอี (EA) พบว่าค่า RBC, Hb, Hct, MCHC และ RDW-CV ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ามีเพียงค่า MCV และ MCH ในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามที่มีฮีโมโกลบินอีมีค่าเท่ากับ 79.1 ± 3.3 (fL) และ 24.8 ± 1.4 (pg) เมื่อเปรียบเทียบกับคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามที่มีฮีโมโกลบินปกติ (A₂A) มีค่าเท่ากับ 87.9 ± 6.5 (fL) และ 28.3 ± 2.5 (pg) พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่มีปริมาณฮีโมโกลบินอีเพิ่มขึ้นเป็น 31.6 ± 1.9 % เมื่อเปรียบเทียบกับ 3.4 ± 3.2 % ในกลุ่มคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

ผลการตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลโดยเทคนิค Allele

Specific PCR (ASPCR)

เมื่อนำตัวอย่างที่พบว่าเป็นฮีโมโกลบินอีจากการตรวจ Hb typing มาสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีมาตรฐาน

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค 1.0% agarose gel electrophoresis โดยปรากฏแถบของดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดมากกว่า 23 kb เมื่อนำมาทำการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอีโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ASPCR โดยใช้ primer 2 ชนิดคู่กันคือ S₃ เป็น common primer และ G₂₄ เป็น mutant primer ซึ่งในคนที่ เป็นฮีโมโกลบินอีจะให้แถบขนาด 400 bp และใช้ primer γ_4 และ γ_5 เป็น primer ควบคุม (internal control) ซึ่งให้แถบขนาด 578 bp แล้วนำไปตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค 1.5% agarose gel electrophoresis ในตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ HbE จะพบเฉพาะแถบขนาด 578 bp ส่วนในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HbE จะให้แถบทั้งขนาด 578 และ 400 bp จากตัวอย่างทั้ง 13 ราย ที่ถูกนำมาตรวจพบว่าทุกรายให้ผลบวกต่อ HbE ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงของคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม จำนวน 200 ราย

Parameter	Mean $\pm$ SD
RBC ($\times 10^6$ cell/mm ³)	4.5 $\pm$ 0.5
Hb (g/dL)	12.6 $\pm$ 1.3
Hct (%)	39.1 $\pm$ 4.0
MCV (fL)	87.4 $\pm$ 6.7
MCH (pg)	28.1 $\pm$ 2.6
MCHC (g/dL)	32.2 $\pm$ 0.8
RDW-CV (%)	11.3 $\pm$ 0.9

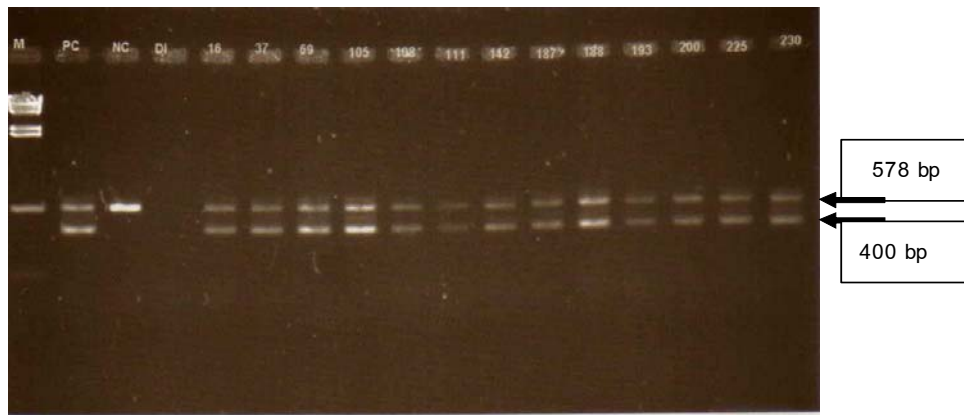
ตารางที่ 2 ชนิดและร้อยละของฮีโมโกลบินของคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม จำนวน 200 ราย

Phenotype	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
A ₂ A	187	93.5
EA	13	6.5

ตารางที่ 3 ค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามที่มีฮีโมโกลบินปกติกับกลุ่มที่มีฮีโมโกลบินอี ทั้งหมด 200 ราย

Parameter	Hb typing	
	A ₂ A (n = 187)	EA (n = 13)
RBC ($\times 10^6$ cell/mm ³)	4.46 $\pm$ 0.48	4.8 $\pm$ 0.5
Hb (g/dl)	12.6 $\pm$ 1.3	12.0 $\pm$ 1.1
Hct (%)	39.1 $\pm$ 4.0	38.2 $\pm$ 3.6
MCV (fL)	87.9 $\pm$ 6.5	79.1 $\pm$ 3.3 *
MCH (pg)	28.3 $\pm$ 2.5	24.8 $\pm$ 1.4 *
MCHC (g/dl)	32.2 $\pm$ 0.8	31.4 $\pm$ 0.8
RDW-CV (%)	11.3 $\pm$ 0.9	11.4 $\pm$ 0.7
HbF (%)	0.7 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.2
HbA ₂ /E (%)	3.4 $\pm$ 3.2	31.6 $\pm$ 1.9*

คนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามที่มีฮีโมโกลบินอี MCV และ MCH มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (* $p < 0.001$)



รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ยีนฮีโมโกลบินอีโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ASPCR แถบ M คือ /Hind III DNA marker, PC คือ positive control, NC คือ negative control และ DI คือ deionized water โดยทั้ง 13 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับฮีโมโกลบินอี

สรุปและวิจารณ์:

การศึกษาครั้งนี้มุ่งหาความชุกของฮีโมโกลบินอี ในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม โดยตรวจค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดง ตรวจหาชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบิน และการตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลโดยเทคนิค Allele Specific PCR (ASPCR) ซึ่งจากจำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 200 ราย พบว่าเป็นฮีโมโกลบินอี 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.5

ผลการตรวจค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงจากตัวอย่าง 200 ราย ปรากฏว่าค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงที่ได้ทั้งหมดไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองหรือตรวจหาผู้ที่เป็นฮีโมโกลบินอีได้ เนื่องจากค่าที่ได้นั้นมีความใกล้เคียงกันเมื่อนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยจึงยังคงอยู่ในช่วงที่ปกติ เฉพาะค่า MCV และ MCH เท่านั้นที่ลดลง แต่เมื่อนำค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงมาวิเคราะห์ร่วมกับการตรวจหาชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ซึ่งใช้เกณฑ์ของค่า HbA₂ มากกว่า 10% ในการสรุปว่าเป็นฮีโมโกลบินอี ซึ่งพบว่าให้ผล Hb typing เป็นสองแบบคือ A₂A (n=187) และ EA (n=13) เมื่อพิจารณาค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงพบว่าค่า MCV และ MCH ของ Hb typing ทั้งสองแบบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังนั้นเราจึงสามารถนำค่าดัชนีชี้วัดเม็ดเลือดแดงทั้งค่า MCV และ MCH คัดกรองความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงเบื้องต้นก่อนตรวจวินิจฉัยด้วยการตรวจชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินด้วย HPLC และสำหรับการตรวจวินิจฉัยในระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคที่ ASPCR ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยฮีโมโกลบินอีได้เป็นอย่างดีเฉพาะเจาะจง เนื่องจากการตรวจตรงตำแหน่งที่เกิดการ mutation ของยีนฮีโมโกลบินอี จึงถือได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีการตรวจยืนยันที่มีความจำเพาะสูง และยังเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียในทารกที่มีปริมาณฮีโมโกลบินอีต่ำ แต่เนื่องจากการ

ตรวจด้วยเทคนิค ASPCR เป็นการตรวจโดยการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจึงทำให้มีความไวในการตรวจจับความผิดปกติของยีน mutation ของฮีโมโกลบินอี

ที่ผ่านมาพบว่าไม่มีรายงานฮีโมโกลบินอีในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม แต่มีรายงานความชุกของฮีโมโกลบินอีในภาคใต้พบว่ามีอุบัติการณ์ร้อยละ 9-11⁷⁾ และจากการศึกษาครั้งนี้พบความชุกของฮีโมโกลบินอีในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามร้อยละ 6.5 ซึ่งถือว่าค่อนข้างสูงหากนำไปเทียบกับกลุ่มประชากรทั้งหมด จากการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะทำให้ทราบความชุกของฮีโมโกลบินอีในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลามแล้วยังพบอุบัติการณ์ของเบต้าธาลัสซีเมียในคนกลุ่มนี้ด้วย ซึ่งพบว่ามีร้อยละ 1.0 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวัง ควบคุม และป้องกันการเกิดโรคธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านอื่นๆ เช่น การศึกษาความสัมพันธ์เชิงชาติพันธุ์ (ethnic relationship) และพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) สืบต่อไป

จากการศึกษาครั้งนี้พบฮีโมโกลบินอีในคนไทยเชื้อสายมลายูที่นับถือศาสนาอิสลาม คิดเป็นร้อยละ 6.5 ซึ่งจากการหาความชุกในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการให้คำแนะนำปรึกษา และวางแผนในการควบคุมโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมอย่างเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ที่สามารถก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นได้โดยการที่มีเบต้าธาลัสซีเมียร่วมกับการได้รับยีนที่มีฮีโมโกลบินอี ซึ่งเป็นยีนที่ผิดปกติบนสายเบต้าโกลบินเช่นเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ: การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ (WU 57402)

เอกสารอ้างอิง:

- Bernard FG, Nancy OF. In Handin RI, Lux SE, Stossel T. 1995. Blood principles and practice of hematology. 2nd ed. Pennsylvania: Lippincott Williams and Wilkins; p. 1530-73.
- Forget B, Cohen A. 2005. Thalassemia syndrome. In Hoffman R, Benzy EJ, Shattil SJ, Furie B, A. Hematology basic principles and practice. 4th ed. Pennsylvania: Elsevier. Churchill Livingstone; p. 557-82.
- Jandi JH. Hemoglobin E Disorder. In Cohen HJ, Silberstein LE, Moglave P. 1925. Blood pathophysiology. Oxford: Blackwell Scientific Publication; p. 75.
- Fucharoen S. 2001. Hemoglobin E disorder. In Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of hemoglobin. New York: Cambridge University Press; p. 1139-86.
- กิตติ ต่อจรัส. 2549. พาหะฮีโมโกลบินอี (Carriers of hemoglobin E). จุลสารโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย 15: 7-8.
- กุลณา พุเจริญ. 2543. ฮีโมโกลบินอีและธาลัสซีเมียที่ตรวจพบในประชากรทั่วไปในมหาวิทยาลัยขอนแก่น. วารสารวิจัย มข 5: 61-9.
- คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2543. ธาลัสซีเมีย. สงขลา: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; หน้า 65.
- ศูนย์กลางมุสลิมแห่งประเทศไทย. ความเป็นมาของอิสลามในประเทศไทย; URL: <http://www.muslimthai.com/content/ Front.php?option=content&category=11&id=360>
- สุพรรณ พุเจริญ. 2542. พื้นฐานการเกิดโรคระดับโมเลกุลและการตรวจธาลัสซีเมีย. ขอนแก่น. ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ถนอมศรี ศรีชัยกุล, แสงสุรีย์ จูฑา. 2537. บรรณานุกรม. ตำราโลหิตวิทยา การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร. ที.พี.พริน; 203-242.
- กุลณา พุเจริญ, กนกวรรณ แสงไชยสุริยา, บรรณานุกรม. 2546. การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. พิมพ์ครั้งที่ 3. ขอนแก่น. ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 44-7.
- Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, Sae-Ngow B, Sriphanich R, Oncoung W, *et al.* 1998. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. Clinical Chemistry 44: 740-8.
- Ou CN. 1983. High performance liquid chromatography of human hemoglobin on a new cation exchange. J. Chromatogr 23: 197-205.
- Kutlar A, Kutlar F, Wilson JB, Headlee MG, Huisman THJ. 1984. Quantitation of Hemoglobin Components by High Performance Cation Exchange Liquid Chromatography. Amer J Hemat 35: 39-53.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 16: 12-5.
- Fucharoen S, Fucharoen G, Rattanasiri T, Jetsrisupap A, Fukumaki Y. 1994. A simple non-radioactive assay for hemoglobin E gene in prenatal diagnosis. Clin Chem Acta 229: 197-203.

PREVALENCE OF HEMOGLOBIN E IN THAI MALAYU – MUSLIM: IDENTIFICATION BY DNA ANALYSIS

Jitbanjong Tangpong^{1,*} Sitthichai Panyasa² Orawan Sarakul¹ Tanrat Saksri³ Patchara Rattanaporn³ Methaporn Siriroop³

¹School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon-Si-Thammarat.

²Hematology and Clinical Microscopy, Medical Technology Department, School of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phayao.

³Medical Technology Student, School of Allied Health Sciences and Public Health.

ABSTRACT: To study the prevalence of hemoglobin E (HbE) in Thai Malayu-Muslims. Two hundred Thai Malayu-Muslims EDTA bloods were used for identification HbE. All samples were analyzed for hematological data and red cell indices using automated cell count analyzer, NIHON KOHDEN MEK-8222K (Tokyo, Japan). Types and levels of hemoglobin fractions were performed using automated analyzer, VARIANT II (Philadelphia, PA, USA). Molecular characterization of HbE was performed by Allele Specific PCR (ASPCR). The mean of red blood cell indices data from two hundred subjects were RBC 4.49 ± 0.49 cell/mm³, Hb 12.6 ± 1.3 g/dL, Hct 39.1 ± 4.0 %, MCV 87.4 ± 6.7 fL, MCH 28.1 ± 2.6 pg, MCHC 32.2 ± 0.8 g/dL and RDW-CV 11.3 ± 0.9 %. Hb typing showed 93.5% A₂A (187 subjects) and 6.5% EA (13 subjects). HbE subjects showed RBC 4.8 ± 0.5 cell/mm³, Hb 12.0 ± 1.1 g/dL, Hct 38.2 ± 3.6 %, MCV 79.1 ± 3.32 fL, MCH 4.8 ± 1.4 pg, MCHC 31.4 ± 0.8 g/dL, RDW-CV 11.4 ± 0.7 %, Hb F 1.1 ± 0.2 % and Hb A₂/E 31.6 ± 1.9 %. The MCV and MCHC showed significantly lower in Hb E positive group compared with normal hemoglobin, A₂A, group ($p < 0.001$). All of 13 subjects were positive for HbE using ASPCR. These results showed that the prevalence of HbE in Thai Malayu-Muslim was found to be 6.5%. The Hb typing and molecular levels would therefore provide an effective diagnosis of HbE and further benefit for counseling and prevent the increasing incident of HbE and Thalassemia/HbE disease.

Keywords: hemoglobin E, Thai Malayu-Muslims, Thalassemia/HbE, Allele Specific PCR (ASPCR)

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: rjitbanj@wu.ac.th