ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติของประชากรในนครหลวงเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

นายสายฝน พันธ์มณี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THALASSEMIA AND HEMOGLOBINOPATHIES AMONG LAO POPULATION IN VIENTIANE CAPITAL, LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC

Mr. Sayphonh Phanmany

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Hematology Sciences
Department of Clinical Microscopy
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติของประชากรในนครหลวงเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
โดย	นายสายฝน พันธ์มณี
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.กมลลักษณ์ ลีเจริญเกียรติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา บริมสัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.กมลลักษณ์ ลีเจริญเกียรติ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ญาณีนาถ สุวรรณวงศ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร.อรพรรณ ศรีพิชัย)

สายฝน พันธ์มณี : ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติของประชากรในนครหลวงเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (THALASSEMIA AND HEMOGLOBINOPATHIES AMONG LAO POPULATION IN VIENTIANE CAPITAL, LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.กมลลักษณ์ ลีเจริญเกียรติ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ, 70 หน้า.

ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นโลหิตจางที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในประชากรแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นอกจากผู้ที่เป็นโรคนี้จะมีอาการป่วยรุนแรงแล้วโรคนี้ยังถือว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในแถบภูมิภาคนี้ด้วย ข้อมูลอุบัติการณ์และความผิดปกติระดับยีนของโรคนี้ในประเทศลาวยังมีรายงานอยู่จำกัด การศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจหาอุบัติการณ์ของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในกลุ่มประชากรลาวที่อาศัยอยู่ในนครหลวงเวียงจันทร์ สปป.ลาว จำนวน 354 ราย โดยใช้วิธีตรวจคัดกรอง การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินและการตรวจในระดับยีน ผลการศึกษาพบลักษณะจีโนไทป์ทั้งหมดจำนวน 22 ชนิดและพบอุบัติการณ์ของธาลัสซเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ จำนวน 156 ราย คิดเป็นร้อยละ 44 ประกอบด้วยชนิดที่พบเป็นจำนวนมากดังนี้ พบพาหะฮีโมโกลบินอี จำนวน 64 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 พบพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมีย จำนวน 46 ราย คิดเป็นร้อยละ 13 พบพาหะเบต้าธาลัสซีเมียจำนวน 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.1 และพบกลุ่มความผิดปกติร่วมของทั้งสายแอลฟ่าและเบต้าโกลบินจำนวน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.4 จากผลการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดพบว่ากลุ่มพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมียชนิด SEA มีค่า MCV และ MCH ต่ำกว่ากลุ่มพาหะแอลฟ่าธาลัสซีเมียชนิด 3.7 kb อย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลอุบัติการณ์และลักษณะจีโนไทป์ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมป้องกันโรคธาลัสซีเมียในประชากรลาวได้ต่อไปในอนาคต

Chulalongkorn University

ภาควิชา	จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5476662837 : MAJOR CLINICAL HEMATOLOGY SCIENCES
KEYWORDS: THALASSEMIA, HEMOGLOBINOPATHIES, LAO POPULATION

SAYPHONH PHANMANY: THALASSEMIA AND HEMOGLOBINOPATHIES AMONG LAO POPULATION IN VIENTIANE CAPITAL, LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC. ADVISOR: KAMONLAK LEECHAROENKIAT, Ph.D., CO-ADVISOR: SUPANTITRA CHANPRASERT, Ph.D., 70 pp.

Thalassemia and hemoglobinopathies are the most prevalent inherited blood disorders among Southeast Asian population. The group of diseases is not only clinical health problem but also a socio-economic problem for the region. Incidence and molecular analysis of this disease in Lao population have now been reported in a limited data. In order to detect the incidence of thalassemia and hemoglobinopathies in Lao population, thalassemia screening method, hemoglobin typing and molecular analysis were analyzed. The study was conducted on 354 Lao participants staying at Vientiane, Lao People's Democratic Republic. A total of 22 different genotypes were detected. The thalassemia and hemoglobinopathies were identified in 156 of 354 (44%), including 64 (18%) of heterozygous HbE, 46 (13%) of heterozygous a-thalassemia, 11 (3.1%) of heterozygous b-thalassemia, and 28 (8.4%) of double heterozygous a-thalassemia and b-thalassemia. Hematological parameters of heterozygous a^0-thalassemia (SEA) demonstrated lower MCV and MCH value than heterozygous a^+-thalassemia (3.7 kb) In summary, the thalassemia and hemoglobinopathies in Laos are prevalent and heterogeneous. The incidence and genotype characteristic of identified thalassemia and hemoglobinopathies can be used as a data for prevention and controlling of thalassemia and hemoglobinopathies in Lao population.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department:	Clinical Microscopy	Student's Signature .....
Field of Study:	Clinical Hematology Sciences	Advisor's Signature .....
		Co-Advisor's Signature .....
Academic Year:	2014	

กิตติกรรมประกาศ

ทุกชัยชนะอันยิ่งใหญ่ไม่อาจเทรียบเท่ากับผลสำเร็จวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ได้ ด้วยความกรุณาของท่าน อาจารย์ ดร.กมลลักษณ์ ลีเจริญเกียรติ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ท่านอาจารย์ ดร. สุพันธิตรา ชาญประเสริฐ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ จึงทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ต้องขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้ง 2 ท่านเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังได้เขียนโครงการให้ทุนการศึกษาทุนเพื่อนบ้านนี้ขึ้นมาเพื่อรับเอานิสิตต่างชาติโดยเฉพาะนิสิตจากประเทศลาว ตลอดจนให้ข้อคิดหลายๆอย่างมากกว่านิสิตทุกคนที่ได้รับ นอกนั้นยังให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในหลายๆด้าน จนกระทั้งงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ท่าน อาจารย์ รองศาสศตราจารย์ สุพรรณ สุขอรุณ ที่มีความกรุณารับนิสิตจากประเทศ สปป ลาว ให้มาศึกษาหาวิชาความรู้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ท่าน อาจารย์ ดร.ศิริกัลยา บริมสัน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
ขอขอบพระคุณ ท่าน อาจารย์ ดร.ญาณีนาถ สุวรรณวงศ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายใน

ขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อรพรณ ศริพิชัย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ภายนอกมหาวิทยาลัย มหิดล ที่ให้ความกรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณทุนการศึกษา (ทุนประเทศเพื่อนบ้าน) และ เงินทุนวิจัย “ทุน 90 ปี” จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช” เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอบคุณศูนย์วิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การช่วยเหลือ ข้อสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณ พรณาริน เทียมเมฆา ผู้ช่วยประสานงานทุนเพื่อนบ้าน ที่ให้ความกรุณาในการคุ้มครองดูแล ขอขอบคุณน้อง สิริมา (ขวัญ) น้องหลา น้องส้ม ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างจากประเทศลาว และการวิจัย ขอบคุณเพื่อนพี่ น้องๆ หลักสูตรวท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิกทุกคน ที่ช่วยให้กำลังใจสนับสนุนคอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันในระยะเวลาที่ผ่านมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวทุกๆคน ที่มอบความรักและให้กำลังใจ ซึ่งตลอดเวลาที่ผ่านมาถือว่าให้ความสำคัญอยู่เสมอ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง 1

สารบัญภาพ 1

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 4

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 ความสำคัญของเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบิน 5

2.2 วิวัฒนาการและการควบคุมการสร้างฮีโมโกลบินปกติ 5

2.3 ความผิดปกติของฮีโมโกลบิน 7

2.3.1 ความผิดปกติในเชิงปริมาณ (Quantitative abnormality) 7

2.3.2 ความผิดปกติในเชิงคุณภาพ (Qualitative abnormality) 8

2.4 โรคธาลัสซีเมีย 8

2.4.1 อาการแสดงของโรคธาลัสซีเมีย 10

2.4.1.1 Thalassemia major 11

2.4.1.2 Thalassemia intermedia 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.4.1.3 Thalassemia minor 11
2.4.2 พยาธิสภาพ และกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคธาลัสซีเมีย 11
2.4.3 การรักษาโรคธาลัสซีเมีย 14
2.4.3.1 การให้เลือด 15
2.4.3.2 การปลูกถ่ายไขกระดูก 15
2.4.3.3 การใช้ยาขับเหล็ก 15
2.4.3.4 การตัดม้าม 16
2.5 การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ 17
2.6 อุบัติการณ์ของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ 18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานและแผนการวิจัย 19
3.1 วิธีการดำเนินงาน 19
3.1.1 กลุ่มตัวอย่างที่เข้าในการวิจัย 19
3.1.2 การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ 19
3.1.3 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย 19
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 20
3.2.1 สารเคมีและน้ำยาที่สกัด DNA 20
3.2.2 สารเคมีและน้ำยาที่ทำ PCR 21
3.3 การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย 23
3.3.1 ขั้นตอนการตรวจ Osmotic fragility test (OF) 23
3.3.2 ขั้นตอนการตรวจ Dichlorophenolindophenol precipitation (DCIP) test 23
3.3.3 การตรวจวิเคราะห์ ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin typing) ด้วยเครื่อง HPLC 23
3.3.4 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ 24

หน้า

3.3.5 ขั้นตอนการตรวจหา α-thalassemia โดยเทคนิค Gap-Polymerase chain reaction (PCR) 25

3.3.6 วิธีเตรียมเจล Agarose gel สำหรับตรวจสอบแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 27

3.3.7 ขั้นตอนการตรวจหา β-thalassemia โดยเทคนิค DNA sequencing 28

3.4 การตรวจฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงโดยใช้เทคนิค Real-time PCR with high-resolution melting (HRM) analysis 30

3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 31

บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย 32

4.1 ผลการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ 32

4.2 ผลการตรวจยืนยันชนิดย่อยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติโดยเทคนิค Hemoglobin typing และ พีซีอาร์ 33

4.3 อุบัติการณ์ของแอลฟ่าธาลัสซีเมีย 42

4.4 อุบัติการณ์ของเบต้าธาลัสซีเมีย 45

4.5 เปรียบเทียบผลตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC) และปริมาณฮีโมโกลบินในธาลัสซีเมียกลุ่มย่อยต่างๆ 48

4.6 อุบัติการณ์การเกิดร่วมระหว่างพาหะฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงและธาลัสซีเมียชนิดอื่น .. 52

บทที 5 สรุปผลการวิจัยและวิจารณ์ 55

รายการอ้างอิง 60

ภาคผนวก 65

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งชนิดย่อยของ α-thalassemia 9

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับใช้ตรวจหา α-thalassemia 26

ตารางที่ 4 ขั้นตอน PCR amplification ที่ใช้ในการตรวจหา α-thalassemia 27

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา α-thalassemia 28

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับใช้ตรวจหา β-thalassemia 29

ตารางที่ 7 ขั้นตอน PCR amplification ที่ใช้ในการตรวจหา β-thalassemia 29

ตารางที่ 8 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา β-thalassemia 30

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการ Reaction master mix 31

ตารางที่ 10 ขั้นตอน Real time PCR and HRM analysis สำหรับการตรวจหา HbCS gene 31

ตารางที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของผลตรวจ Complete Blood Count ในกลุ่มอาสาสมัครแบ่งตามผลตรวจคัดกรอง 33

ตารางที่ 12 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง DCIP ให้บวก ปลอม OF/DCIP (+/+), ผล Hb typing และ ผล PCR 36

ตารางที่ 13 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP (+/+), ผล Hb typing และ ผล PCR 37

ตารางที่ 14 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP (+/-), ผล Hb typing และ ผล PCR 38

ตารางที่ 15 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP(-/+), ผล Hb typing และ ผล PCR 39

ตารางที่ 16 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่นำมาใช้ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP(-/-), ผล Hb typing และ ผล PCR 40

ตารางที่ 17 สรุปชนิดย่อยของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหมดจำนวน 156 ราย 41

ตารางที่ 18 อุบัติการณ์การเกิดร่วมระหว่างพาหะคอนสแตนสปริงและธาลัสซีเมียชนิดอื่น 54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 การแพร่กระจายของ Hb E และ β-thalassemia ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia)..... 3

ภาพที่ 2 *แสดงออกของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดในแต่ละช่วงอายุ*..... 6

ภาพที่ 3 แสดงการควบคุมการสร้าง Hb A Hb A_2 และ Hb F โดยกลุ่มเบต้าโกลบินยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 11 และกลุ่มแอลฟ่าโกลบินยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 16..... 7

ภาพที่ 4 การแสดงลำดับของยีนสายแอลฟาโกลบินที่มีขนาดของยีนขาดหายไปที่เป็นสาเหตุทำให้เกิด α-thalassemia ชนิดต่างๆได้..... 13

ภาพที่ 5 การแสดงออกของการกลายพันธุ์ยีนสายบีต้าโกลบิน..... 14

ภาพที่ 6 สรุปแผนแนวทางการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจวินิจฉัยหาความผิดปกติของยีน..... 22

ภาพที่ 7 แสดงถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยวัดความเข้มข้นที่คลื่นแสง 260 นาโนเมตร..... 25

ภาพที่ 8 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล Hb H Constant Spring disease (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$) ดังเลนส์ที่ 3 และ 7..... 43

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (เลนส์ที่ 3 และ 6)..... 44

ภาพที่ 10 Chromatogram ในรูปแบบ DNA Sequencing ที่แสดงถึงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนโดยตำแหน่งของลำดับเบสที่พบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ชี้ให้เห็นตามลูกศรในภาพที่เปลี่ยนจาก C-T IVSII 666 polymorphism..... 45

ภาพที่ 11 Chromatogram ในรูปแบบ DNA Sequencing ที่แสดงถึงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนโดยตำแหน่งของลำดับเบสที่พบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ชี้ให้เห็นตามลูกศรในภาพที่เปลี่ยนจาก GGT-GAT ที่ตำแหน่ง CD 136..... 46

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล Double heterozygous for Hb E (β^{E}/β^{E}) and α^{o}-thalassemia (SEA type)($--^{SEA}/\alpha\alpha$) (เลนส์ที่ 2 , 6 , 9 47

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล ให้ผล..... 48

ภาพที่ 14 แสดงถึงกานเปรียบเทียบค่า MCV ละหว่าง 3 กลุ่มตัวอย่าง SEA trait, Homo 3.7 kb and 3.7 trait..... 50

ภาพที่ 15 แสดงถึงเปรียบเทียบค่า MCH ระหว่าง 3 กลุ่มตัวอย่าง SEA trait , Homozygous 3.7 kb และ Heterozygous 3.7 kb 51

ภาพที่ 16 แสดงถึงเปรียบเทียบค่า HbA2 (E) ระหว่าง 3 กลุ่มตัวอย่าง E and SEA trait , E and Heterozygous 3.7 kb และ E trait 52

ภาพที่ 17 แสดงผลการทำฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงที่ใช้เทคนิค HRM analysis เพื่อตรวจหา Hb Constant Spring ซึ่งภาพ (A) และ(B) 53

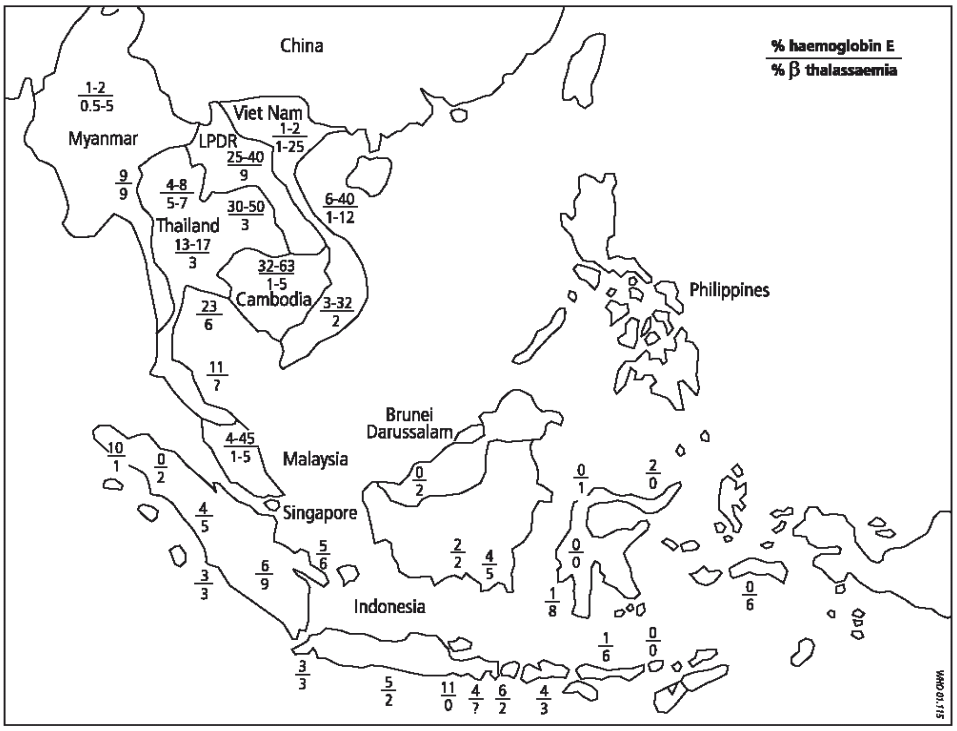
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นโรคโลหิตจางชนิดหนึ่งที่เป็นปัญหาสำคัญของประชากรในทั่วโลกและเป็นโรคที่สามารถป้องกันและควบคุมได้ โรคนี้มีสาเหตุมาจากการได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่มีการสร้างของสายฮีโมโกลบินที่สร้างได้น้อยกว่าปกติหรือไม่มีการสร้างเลย [1] โดยได้มีการรายงานเกี่ยวกับโรคนี้เป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาโดยในปี 1925 Dr. Thomas Cooley และ Dr. Pearl Lee ตรวจพบความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและได้มีการรายงานเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของธาลัสซีเมียเป็นครั้งแรกโดยพบผู้ป่วยที่มีอาการภาวะโลหิตจางที่ผิดปกติโดยเขาได้ตรวจพบเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดเล็ก (Microcytic anemia) และเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยรายนั้นเสียชีวิตเพราะจากการแตกของเม็ดเลือดแดง [2] ยังมีการค้นพบความผิดปกติของ hemoglobin ชนิดแรกคือ Hb S ที่ทำให้เกิดโรค sickle cell anemia ในปี ค.ศ.1949 ต่อจากนั้นก็ได้มีการค้นพบ hemoglobin ที่มีความผิดปกติชนิดต่างๆ เพิ่มขึ้นมาอีกเป็นจำนวนมากและได้มีการตั้งชื่อ hemoglobin ผิดปกติตามชื่อของเมืองหรือประเทศที่พบผู้ป่วยครั้งแรก เช่น Hb Constant Spring (เมือง Constant Spring, ประเทศจาไมก้า) หรือตั้งชื่อเรียงตามลำดับตัวอักษร เช่น Hb C, Hb D, Hb E, Hb G และ Hb J เป็นต้น [2] จากความผิดปกติดังกล่าวนั้นจึงเป็นสาเหตุให้มีการคิดค้นหาวิธีการตรวจความผิดปกติที่เกิดขึ้นเพื่อมุ่งเน้นสู่การศึกษาให้ถึงระดับโมเลกุล ในปี ค.ศ.1988 ได้มีการรายงานผลงานเกี่ยวกับวิเคราะห์เครื่องมือที่ใช้สำหรับตรวจ Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเครื่องมือที่ใช้งานทางด้าน (Molecular Biology) ทางด้านโครโมโซม ดังนั้น จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์การแพทย์และนักวิทยาศาสตร์มีความเข้าใจถึงโรคธาลัสซีเมียมากขึ้น และได้ทำการพัฒนาวินิจฉัยเพื่อจะได้มีแนวทางในการรักษา ควบคุมเพื่อป้องกันโรค Thalassemia ชนิดที่รุนแรงไม่ให้มีการขยายเพิ่มมากขึ้น [3] จากอุบัติการณ์ที่กล่าวมานั้นเราสามารถพบโรค Thalassemia ได้หลายชนิดด้วยกันในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ α-thalassemia, β-thalassemia, Hb E, Hb Constant Spring, Hb Pakse's แต่ส่วนในประเทศไทยนั้นสามารถตรวจพบโรคธาลัสซีเมียมี 4 ประเภทคือ Hb Bart's hydrops fatalis Hb H disease Homozygous β-thalassemia และ β-thalassemia/Hb E disease [4] ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้นอกจากเขาจะเป็นทุกขเวทนาแก่ตัวเองแล้วก็ยังเป็นภาระแก่คนภายในครอบครัวโดยพ่อแม่ก็ต้องมีความลำบากไปด้วยเพราะความสงสารลูกต้องหมดเงินเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในการรักษาเยียวยาลูกทำให้ครอบครัวมีภาระมากขึ้นด้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งครอบครัวผู้ยากจนทำให้ลำบากเข้าไปอีก ส่วนปัญหาทางด้านเศรษฐกิจและสังคมก็พบว่าในแต่ละปีรัฐบาลไทยต้องสูญเสีย

ค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย เป็นเงินจำนวนปีละ 5.000-6.000 ล้านบาท [5] และส่วนในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ได้พบการรายงานเกี่ยวกับอบัติการณ์ที่มีความเกี่ยวกับธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบิน อี โดยองกรณ์อนามัยโลก (World health Organization: WHO) ที่ได้สำรวจกลุ่มประชากรทั่วโลกพบว่าร้อยละ 7 ที่สามารถตรวจพบฮีโมโกลบิน อี ในนั้นที่พบมากที่สุดก็จะอยู่ในแถบภูมิภาคเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่น: ลาว ไทย เวียดนาม กัมพูชา พม่าที่พบว่ามีประชาชนเป็นพาหะของโรคดังกล่าวนี้เยอะมาก และอาจสามารถส่งผลกระทบหรือถ่ายทอดมาสู่ลูกได้ โดยในแต่ละปีจะมีเด็กทารกที่เป็นโรคชนิดที่รุนแรงนี้ถึง 300.000-400.000 ราย หรือสามารถเพิ่มขึ้นมากกว่านี้ก็เป็นได้ เมื่ออิงใส่การเพิ่มขึ้นของประชากรในทั่วโลกที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นในทุกๆปี [6] สำหรับประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว นั้นพบว่าประชากรส่วนใหญ่โดยเฉลี่ยร้อยละ 25-40 ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบิน อี (Hb E หรือ E trait) และร้อยละ 9 พบว่าเป็นพาหะ β-thalassemia จากการศึกษาอุบัติการณ์ของโรคนี้ในกลุ่มของหญิงตั้งครรภ์ที่เข้ามารับการตรวจที่โรงพยาบาลศูนย์สุขภาพแม่ และเด็กนครหลวงเวียงจันทร์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวในปี 2008 พบผู้ที่พาหะฮีโมโกลบิน อี สูงถึงร้อยละ 19.5 ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยกลุ่มโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพและได้นำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติอย่างแพร่หลาย แต่ยังมีการนำวิธีเหล่านั้นไปใช้ศึกษาหาข้อมูลในกลุ่มประชากรลาวอยู่น้อยมากโดยเฉพาะการศึกษาหาความผิดปกติในระดับโมเลกุลที่ยังทำได้อย่างจำกัด การศึกษาอุบัติการณ์ของโรคนี้ในประชากรลาวที่ผ่านมายังทำอยู่เฉพาะในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์เท่านั้น ยังไม่มีรายงานอุบัติการณ์จากกลุ่มประชากรลาวที่แท้จริง การศึกษานี้มุ่งหวังจะศึกษาอุบัติการณ์และความผิดปกติระดับโมเลกุลของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในนครหลวงเวียงจันทน์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เนื่องจากเป็นกลุ่มประชากรที่มาจากหลายๆภูมิภาคของสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและลดจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ให้เหลือน้อยที่สุด



ภาพที่ 1 การแพร่กระจายของ Hb E และ β-thalassemia ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia) [6, 7]

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษานี้นำวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ทั้งวิธีตรวจคัดกรอง ตรวจยืนยันและตรวจระดับยีนที่ใช้ในประเทศไทยไปประยุกต์ใช้ในการตรวจกลุ่มตัวอย่างจากประชากรลาวเพื่อ

1.2.1 หาอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรลาว ซึ่งยังมีการรายงานค่อนข้างจำกัด

1.2.2 ค้นหาความผิดปกติระดับโมเลกุลของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรลาว เพื่อนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศลาวให้ประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาความผิดปกติของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรลาวที่อาศัยอยู่ในนครหลวงเวียงจันทน์ สปป.ลาว จำนวน 354 ราย โดยไม่ได้มีการจำกัดเพศ แต่กำหนดเอาช่วงเกณฑ์ของอายุของอาสาสมัครอยู่ระหว่าง 15-50 ปี โดยทำการตรวจคัดกรอง ตรวจยืนยันและตรวจระดับยีน

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย

ขั้นตอนการขนส่งตัวอย่างเลือดและเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอค่อนข้างทำได้จำกัดและใช้งบประมาณสูงเนื่องจากคณะผู้วิจัยต้องเก็บตัวอย่างในประเทศลาวและนำมาตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ประเทศไทยเนื่องจากที่ประเทศลาวยังไม่มีเครื่องตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินและเครื่องพีซีอาร์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 นำเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.5.2 นำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการเสียชีวิตของเด็กทารกในครรภ์เพื่อลดจำนวนผู้ป่วยรายใหม่ที่จะเป็นโรคธาลัสซีเมียนี้ให้น้อยที่สุด

1.5.3 ทราบถึงความผิดปกติของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในระดับยีนซึ่งอาจจะเป็นความผิดปกติในตำแหน่งใหม่ๆ

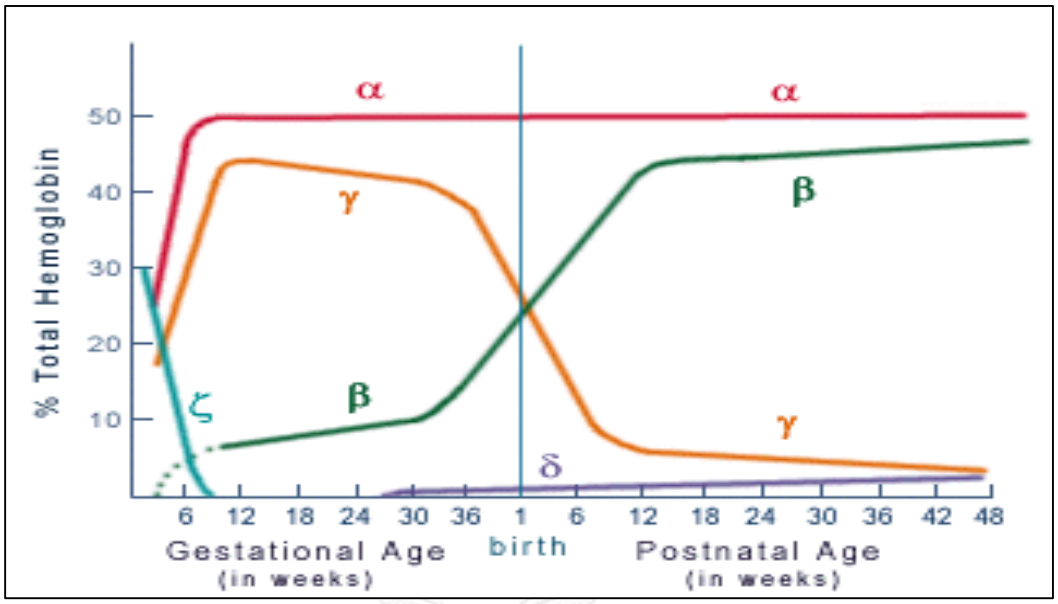
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบิน

การทำหน้าที่ของเม็ดเลือดแดงเป็นการนำเอาออกซิเจนไปให้เนื้อเยื่อของร่างกาย และการนำคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อเพื่อนำไปปล่อยออกที่ปอด โดยสารที่เป็นตัวหลักในการจับและปล่อยก๊าซทั้ง 2 ชนิดนี้คือ ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) ซึ่งประกอบด้วย 2 องค์ประกอบหลัก ได้แก่ส่วนฮีม hem และ ส่วนโกลบิน (globin) โดย heme จะมีพอร์ไฟริน (porphyrin) กับเหล็ก (iron หรือ Fe) จับอยู่ โดยในส่วนของเหล็กจะจับกับออกซิเจนเพื่อนำไปเลี้ยงส่วนของร่างกาย ส่วน globin เป็น Polypeptide ที่มีการเรียงตัวกันเป็นกรดอะมิโนที่มีหลายๆโมเลกุลที่มาเชื่อมต่อกัน ซึ่งโกลบินในคนมีอยู่ 6 ชนิดด้วยกันคือ alpha (α) beta (β) gamma (γ) delta (δ) epsilon (ε) และ zeta (ζ) ทั้งนี้ในหนึ่งโมเลกุลของฮีโมโกลบินประกอบด้วยโกลบิน 2 คู่ ดังนั้นหนึ่งโมเลกุลของฮีโมโกลบินจะจับกับออกซิเจนได้ 4 โมเลกุล [8]

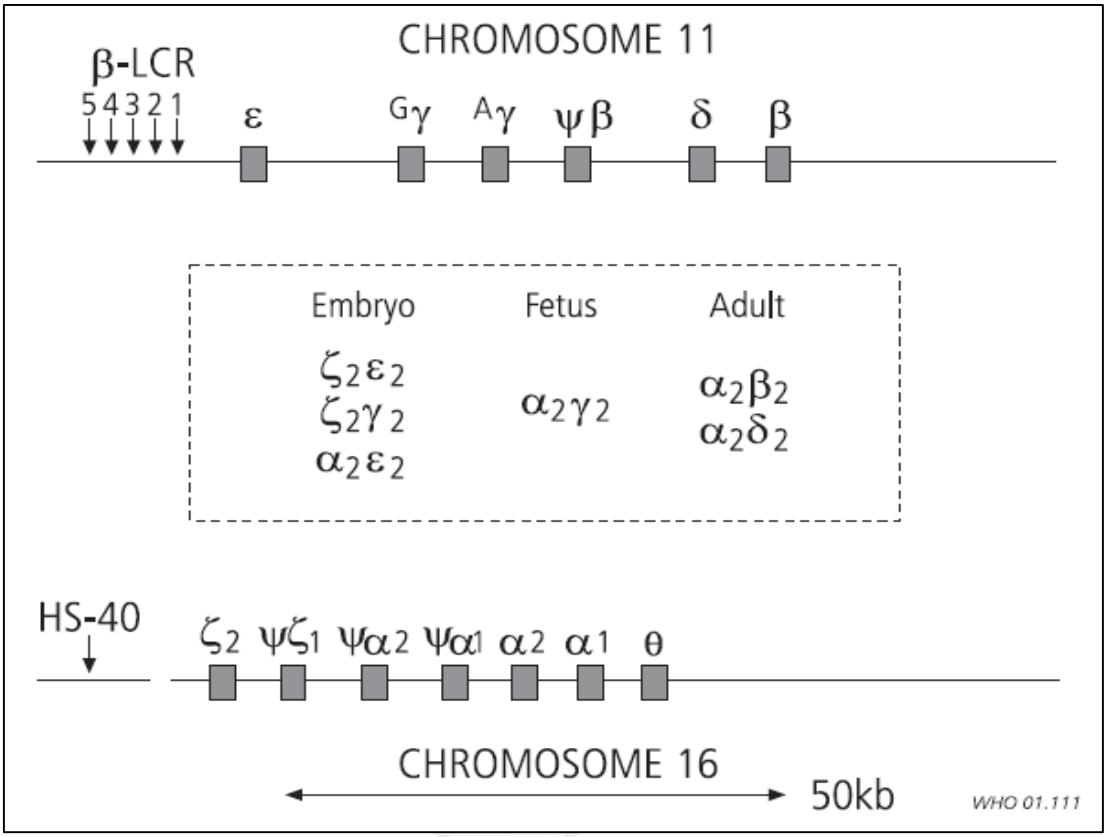
2.2 วิวัฒนาการและการควบคุมการสร้างฮีโมโกลบินปกติ

การสร้างฮีโมโกลบินเกิดขึ้นครั้งแรกในระยะตัวอ่อน (Embryo) ที่มีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ภายหลังการปฏิสนธิซึ่งเรียกว่า embryonal hemoglobin ฮีโมโกลบินของตัวอ่อนประกอบด้วย Hb Gower 1: $\zeta_2\varepsilon_2$ และ Hb Gower 2: $\alpha_2\varepsilon_2$ ในสัดส่วนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็น Hb Portland I: $\zeta_2\gamma_2$ และ Hb Portland II : $\zeta_2\beta_2$ ประมาณ เปอร์เซ็นต์ 40 ต่อมาเมื่ออายุครรภ์ได้ 7-10 สัปดาห์จะมีการสร้าง Hb F เรียกว่า ฟีตัลฮีโมโกลบิน (fetal hemoglobin) ประกอบด้วย α-globin และ γ-globin อย่างละ สาย $2\alpha_2\ \gamma_2$ จากนั้นเมื่อทารกใกล้คลอด จะมีการสร้าง Hb A ซึ่งประกอบด้วย α-globin และ β-globin อย่างละ 2สาย $\alpha_2\beta_2$ โดยมีการสร้างเพิ่มขึ้นในขณะที่มีปริมาณของ Hb F ลดลง ตามระยะการเจริญเติบโต โดย γ-globin จะหยุดการสร้างในอายุ > 1 ปี ในทางกลับกัน δ-globin จะสร้างหลังคลอด และ δ-globin มารวมกับ β-globin เป็น Hb A2 ในผู้ใหญ่จะมี Hb A ประมาณ 97-97.5% Hb A2 ประมาณ 2.5-3% และ Hb F น้อยกว่า 1% [9, 10]



ภาพที่ 2 แสดงออกของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดในแต่ละช่วงอายุ [11]

การเปลี่ยนแปลงแหล่งที่สร้างเม็ดเลือดแดงจะร่วมกับมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของฮีโมโกลบินที่สร้างขึ้นในระดับโมเลกุล การสร้างฮีโมโกลบินจะถูกควบคุมโดยกลุ่มยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 16 (กลุ่มของ α-like globin genes) จะมี α-globin gene cluster ประกอบด้วย α_1 gen, α_2 gene และ zeta (ζ) gene การสร้าง α-globin และ β-globin ถูกกำหนดโดย α-globin กับ β-globin เกิดเป็น Adult hemoglobin หรือ Hb A: ($\alpha_2\beta_2$) ส่วน α-globin กับ δ-gene คุมการสร้าง α และ δ-globin เกิดเป็น Hb A2 หรือ ($\alpha_1\delta_2$) และ α-gene กับ γ-gene คุมการสร้าง α-gene และ γ-gene เกิดเป็น Fetal hemoglobin หรือ Hb F: ($\alpha_2\gamma_2$) และโครโมโซมคู่ที่ 11 (กลุ่มของ β-like globin genes) จะมี β-globin gene cluster ประกอบด้วย β-globin, δ-globin $^{G}\gamma$ $^{A}\gamma$-gene และ ε-gene โดยยีนจะมีการเรียงกันเป็นลำดับ ดังภาพที่ 3 [6, 11]



ภาพที่ 3 แสดงการควบคุมการสร้าง Hb A Hb A_2 และ Hb F โดยกลุ่มเบต้าโกลบินยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 11 และกลุ่มแอลฟ่าโกลบินยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 16 [6]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3 ความผิดปกติของฮีโมโกลบิน

โดยปกติสัดส่วนระหว่างสายแอลฟากับสายบีต้าหรือสายอื่นนั้นจะต้องสร้างออกมาเท่ากัน แต่เมื่อใดก็ตามหากมีการสร้างสายใดสายหนึ่งน้อยกว่าปกติ ก็จะเกิดเป็นโรคขึ้น ความผิดปกติของฮีโมโกลบินแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ [12]

2.3.1 ความผิดปกติในเชิงปริมาณ (Quantitative abnormality)

การสร้างสายโกลบินที่ลดน้อยลงหรือสร้างไม่ได้เลยเรียกว่าเป็นธาลัสซีเมีย ถ้าสร้างสายแอลฟาลดลงหรือสร้างไม่ได้เรียกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย (α-thalassemia) สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการขาดหายไปของยีนแอลฟาโกลบินในบางส่วนหรือทั้งหมดก็ว่าได้และอีกมุมมองหนึ่ง หากการสร้างสาย β นั้นลดลงหรือสร้างไม่ได้ก็อาจจะเรียกว่า (β-thalassemia) สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสในยีน β-globin

2.3.2 ความผิดปกติในเชิงคุณภาพ (Qualitative abnormality)

สายโกลบินประกอบด้วยกรดอะมิโน เรียงตัวกันตามชนิดและลำดับ เป็นแบบจำเพาะของสาย alpha ที่กรดอะมิโน 141 ตัว ส่วนสาย beta มีกรดอะมิโน 146 ตัวการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนเพียง 1 ตัวจะทำให้สายโกลบินทั้งสายมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากปกติเช่น เคลื่อนที่ช้าลง หรือเร็วขึ้นเมื่อนำมาไว้ในตัวกลางที่ให้กระแสไฟฟ้าผ่านซึ่งฮีโมโกลบินบางชนิดจับกับออกซีเจน Oxygen แน่นกว่าปกติและไม่ปล่อย ทำให้เนื้อเยื่อขาดออกซิเจน ฮีโมโกลบินบางชนิดไม่เสถียร ตกตะกอนง่าย ทำให้เม็ดเลือดแดงขาดความยืดหยุ่นและแตกสลายง่าย ผู้ที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติเหล่านี้ส่วนน้อยก่อให้เกิดอาการซีด แต่ส่วนใหญ่ไม่มีอาการใดๆ มักตรวจพบโดยบังเอิญจากการตรวจเลือด ฮีโมโกลบินผิดปกติในทั่วโลกมีมากกว่า 750 ชนิด โดยมีการค้นพบความผิดปกติของ Hemoglobin ชนิดแรกคือ Hb S ที่ทำให้เกิดโรค sickle cell anemia ในปี ค.ศ.1949 ต่อจากนั้นก็ได้มีการค้นพบ hemoglobin ที่มีความผิดปกติชนิดต่างๆ เพิ่มขึ้นมาอีกเป็นจำนวนมากและได้มีการตั้งชื่อ hemoglobin ผิดปกติตามชื่อของเมืองที่พบผู้ป่วยครั้งแรก เช่น Hb Constant Spring พบที่เมือง Constant Spring ในประเทศจาไมก้า Hb Beijing (China), Hb Q-Thailand หรือ Hb Tak , Hb Queens (USA) หรือตั้งชื่อเรียงตามลำดับตัวอักษร เช่น Hb C, Hb D, Hb E, Hb G และ Hb J เป็นต้น

2.4 โรคธาลัสซีเมีย

โรคธาลัสซีเมียพบได้ในประชากรทั่วโลก อุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียแต่ละชนิดของแต่ละประเทศหรือแต่ละเชื้อชาติจะแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น β-thalassemia พบมากในเขตแถบทะเลเมดิเตอเรเนียนตั้งแต่ทางตอนใต้ของประเทศอิตาลีจนถึงประเทศกรีซโดยพบประมาณร้อยละ 10 ของประชากรที่เป็นพาหะ นอกจากนั้นก็ยังมีประชากรทางตะวันออกกลางของอินเดีย ปากีสถาน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ส่วน α-thalassemia จะพบมากในประเทศจีน ไทย และประเทศฟิลิปปินส์ ธาลัสซีเมียยังสามารถพบได้ในทุกๆ เชื้อชาติทุกศาสนาและทุกเพศไม่มีการจำกัด โดยพ่อหรือแม่ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะของโรค จะทำให้ลูกทุกคนที่เกิดมานั้นมีโอกาสเป็นโรคคิดเป็นร้อยละ 25 เป็นพาหะร้อยละ 50 และมีโอกาสที่ลูกไม่เป็นโรค ร้อยละ 25 โดยโอกาสแต่ละครั้งนั้นจะพบพอๆ กันของการตั้งครรภ์ [13]

ธาลัสซีเมียเป็นกลุ่มของความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง ธาลัสซีเมียกำหนดให้เป็นโรคที่มีความผิดปกติทางด้านโครโมโซมคู่ที่ 11 และคู่ที่ 16 ที่มีการสร้างสายใดสายหนึ่งเกิดมีความผิดปกติหรือไม่สามารถสร้างสาย α-globin และ β-globin สายใดสายหนึ่งลดลงที่จะมาประกบคู่กันนั้นเกิดไม่สมดุลกันขึ้นมาอาจจะทำให้สายที่สร้างมาแล้วไม่มี

คู่ที่มันจะจับนั้น เมื่อเป็นเช่นนั้นสายที่ถูกสร้างออกมาเมื่อไม่มีตัวที่มาจับ จึงจับกันเองเช่นตัวอย่างใน α-thalassemia ที่มีการสร้างจำนวนลดลงหรือไม่มีการสร้างสาย α-globin ขึ้นมาได้จึงทำให้สาย β-globin ที่สร้างมาเพียงสายนี้สายเดียวเมื่อไม่มีตัวที่มันจะไปจับ จำเป็นต้องจับกันเองที่เป็นสายเดียวกันเป็น β_4 อาจจะทำให้เกิดเป็นโรคได้ ดังนั้นเม็ดเลือดแดงจึงไม่เสถียร ตกตะกอนได้ง่ายและอาจจะมีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่อยู่ภายในตัวของเม็ดเลือดแดงเองก็ได้ จึงทำให้มีรูปร่างที่ผิดจากเดิมไปคือตัวเล็กกว่าเดิม ติดสีซีดหรือจางลงมีความยืดหยุ่นน้อย เวลาที่มีการเคลื่อนที่ไปในช่องที่แคบนั้นมีความคงทนน้อยกว่าปกติ อายุของเม็ดเลือดแดงก็จะสั้นลงและแตกง่ายกว่าเม็ดเลือดแดงในคนปกติ โรคธาลัสซีเมียสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. α-thalassemia syndromes
2. β-thalassemia syndromes

ซึ่งสามารถแบ่งชนิดย่อยดังแสดงในตารางที่ และ 1ตารางที 2

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งชนิดบ่อยของ α-thalassemia [14]

ชื่อโรคหรือภาวะ	**ความผิดปกติของยีน genotype**	**อาการแสดงของ Phenotype**
ยีนปกติ	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	ลักษณะยีนที่ปกติ
α-thalassemia 2 heterozygote	($_\alpha/\alpha\alpha$)	ลักษณะเม็ดเลือดแดงมีขนาดปกติและระดับฮีโมโกลบินปกติ
α-thalassemia heterozygote	($__/\alpha\alpha$)	เม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก (MCV) ต่ำ หรือมีระดับฮีโมโกลบินปกติ
Homozygous Hb Constant Spring	($\alpha^{CS}\alpha/(\alpha^{CS}\alpha$)	มีอาการซีดเล็กน้อยถึงปานกลาง ไม่ต้องให้เลือดเป็นประจำ
Hb H – Constant Spring (Hb H-CS)	($__/\alpha^{CS}\alpha$)	มีลักษณะอาการซีดปานกลาง บางคนอาจจำต้องให้เลือดเป็นประจ (α-thalassemia1/Hb CS)
Hb H disease	($__/_\alpha$)	มีอาการซีดปานกลาง โดยไม่ต้องให้เลือดเป็นประจำ (α-thalassemia 1/α-thalassemia 2)
Hb Bart's hydrops fetalis	($__/__$)	เด็กมักเสียชีวิตตั้งแต่ในครรภ์หรือตายหลังคลอดในเวลาต่อมา Homozygous α-thalassemia 1

ตารางที่ 2 แสดงการแบ่งชนิดบ่อยของ β-thalassemia [15]

ชื่อโรคหรือภาวะ	ความผิดปกติของยีนgenotype	อาการแสดงของ Phenotype
ยีนปกติ	(β/β)	ลักษณะยีนที่ปกติของ (β-globin) ยีน
β-thalassemia trait	(β^0/β) หรือ (β^+/β)	ระดับฮีโมโกลบินปกติ หรือ อาการซีดเล็กน้อย เม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก (MCV) ต่ำ
Hb E trait	(β^E/β)	ระดับฮีโมโกลบินปกติ ที่เม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก ค่าของ (MCV) ต่ำหรือขนาดปกติ
Homozygous Hb E (Hb EE)	(β^E/β^E)	อาการซีดแบบเล็กน้อย
ยีนปกติ	(β/β)	ลักษณะยีนที่ปกติของ (β-globin) ยีน
β-thalassemia trait	(β^0/β) หรือ (β^+/β)	ระดับฮีโมโกลบินปกติ หรือ อาการซีดเล็กน้อย เม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก (MCV) ต่ำ
β-thalassemia/Hb E	(β^0/β^E) หรือ (β^+/β^E)	อาการซีดแบบปานกลางจนถึงขั้นซีดมาก บางคนให้เลือดเป็นประจำ แต่บางคนไม่ต้องให้
Homozygous β-thalassemia	(β^0/β^0) (β^0/β^+) หรือ (β^+/β^+)	อาการซีดมาก ส่วนใหญ่ต้องให้เลือดเป็นประจำเพื่อความอยู่รอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.1 อาการแสดงของโรคธาลัสซีเมีย

ในกลุ่มคนเหล่านี้จะมีอาการแสดงออกของโรคมีความแตกต่างกันไปตั้งแต่มีอาการโลหิตจางเล็กน้อย ไปจนถึงโลหิตจางขั้นรุนแรงจนอาจทำให้เสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดาหรือหลังการคลอดได้ไม่นาน ส่วนผู้ที่เป็นพาหะจะมีสุขภาพปกติเหมือนคนทั่วไป แต่มียีนแฝงของผู้ที่เป็นพาหะมีความสามารถในการถ่ายทอดยีนที่ผิดปกตินี้ไปสู่ลูกหลานได้ ดังนั้นเราจึงสามารถแบ่งพยาธิสภาพของโรคนี้ออกตามอาการของความรุนแรงของโรคออกเป็น 3 แบบคือ [16]

2.4.1.1 Thalassemia major

เป็นโรคที่มีความรุนแรงมากได้แก่ (Hb Bart's hydrops fetalist) ผู้ป่วยจะเสียชีวิตตั้งแต่ตอนอยู่ในครรภ์ของแม่ในขณะที่เป็นฟีตัส ส่วน Homozygous β-thalassemia disease ซึ่งส่วนใหญ่เด็กที่เกิดมาจะมีอายุประมาณ 1 ปีจะมีอาการแสดงออกของ severe anemia ซึ่งโรคจะมีอาการเรื้อรังไปจนอายุได้ 10-20 ปีจะเสียชีวิตลง

2.4.1.2 Thalassemia intermedia

ได้แก่ β-thalassemia/Hb E และโรค Hemoglobin H disease เป็นความรุนแรงของโรคโลหิตจางปานกลางที่ผู้ป่วยจะมีรูปร่างและใบหน้าเป็นโรคธาลัสซีเมียแต่ prognosis ของเขายังดี

2.4.1.3 Thalassemia minor

กลุ่มนี้มีอาการเลือดจางเพียงเล็กน้อยรูปร่างและใบหน้าปกติทุกอย่างเกิดจากความผิดปกติของยีนบนโครโมโซมเพียงข้างเดีย

2.4.2 พยาธิสภาพ และกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคธาลัสซีเมีย

ปัจจุบันธาลัสซีเมียกำลังเป็นปัญหาของสังคมเพราะเป็นโรคที่ควบคุมได้ยากโดยเฉพาะในกลุ่มประชากรที่ห่างไกลจากความเจริญหรือประเทศที่กำลังพัฒนาเห็นว่ายากต่อการควบคุมและป้องกันจึงทำให้เกิดโรคธาลัสซีเมียมากขึ้นในแต่ละปี [17] ธาลัสซีเมียก่อให้เกิดพยาธิสภาพกับคนเรานั้นแทบทุกอวัยวะของร่างกาย และพยาธิสภาพของโรคธาลัสซีเมียนี้เกิดมาจากความไม่สมดุลของการสร้างสายฮีโมโกลบิน เมื่อมีการสร้างสายฮีโมโกลบินที่ลดลงในแต่ละชนิดจึงทำให้เกิดมีสายฮีโมโกลบินที่เป็นส่วนเกินมาจับกันเองในที่สุดและตกตะกอนได้ง่าย เมื่อเรามาศึกษาผู้ที่มีความผิดปกติของยีนธาลัสซีเมีย มีทั้งผู้ที่เป็นโรคหรือไม่เป็นโรคแต่เป็นพาหะ ซึ่งอาการรุนแรงนั้นอาจจะมีความแตกต่างกันไป [18] ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมส่วนใหญ่แล้วนั้นเกิดมาจากยีนที่มีความผิดปกติซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่ออาการและความรุนแรงของโรค ซึ่งกลไกลการเกิดพยาธิสภาพของโรคธาลัสซีเมียอาจสามารถแบ่งเป็นสาเหตุดังนี้คือ

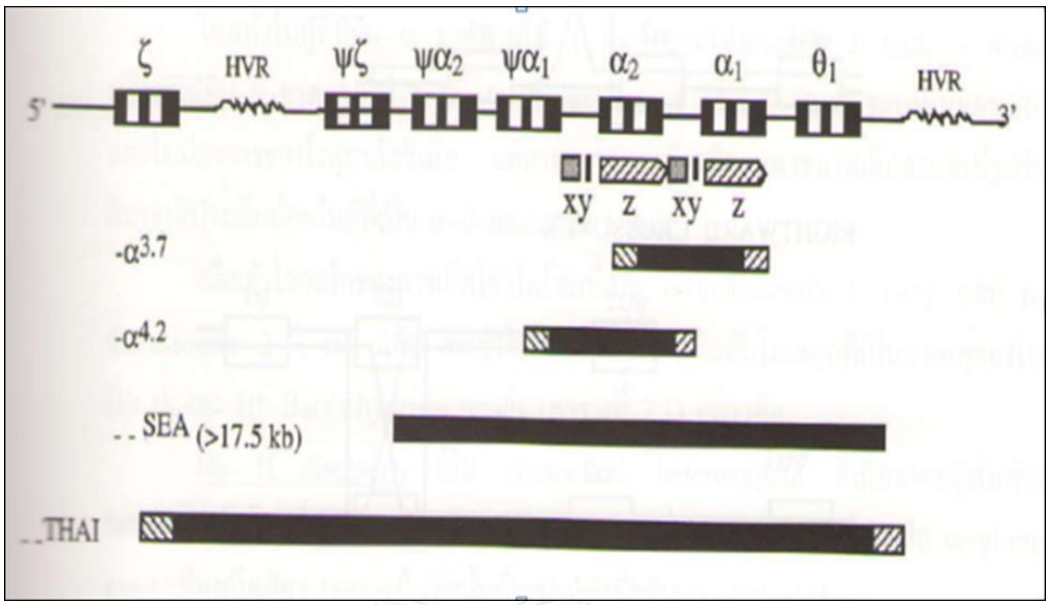
2.4.2.1 เกิดจากสาเหตุการขาดหายไปของกลุ่มยีนที่ไม่สามารถสร้างโกลบินได้โดยตรงแต่เป็นบริเวณที่มีการตัดสาย RNA ให้เป็น mRNA ดังนั้นการขาดหายไปของยีนอยู่บริเวณนี้ทำให้ mRNA สร้างโกลบินไม่ได้ [19]

2.4.2.2 เป็นความผิดปกติที่เกิดจากมีการกลายพันธุ์ที่อยู่ในตัวของยีนนั้นเองทำให้สายยีนที่เกิดขึ้นใหม่นั้นมีการเปลี่ยนแปลงหรือที่จุด promoter ที่เป็นจุดเริ่มต้นจนไม่สามารถทำงานตามปกติได้หรือทำงานได้น้อยลงแต่ก็ยังมี RNA อยู่ [20]

2.4.2.3 เกิดความผิดปกติที่มีการขาดหายไปของยีนบางส่วนหรือขาดหายไปทั้งหมด deletion ทำให้การสร้างโกลบินนั้นน้อยลงหรือไม่มีการสร้างเลยความรุนแรงนั้นมีความแตกต่างกันไปจากอาการรุนแรงน้อยจนถึงอาการที่รุนแรงมากจนทำให้เสียชีวิตเพราะฉะนั้นความรุนแรงที่ตรวจต แท้งก่อนคลพบบ่อยคือ ตับโต ม้ามโอดเสียชีวิดไม่เกิน 6 ชั่วโมงหลังการคลอด

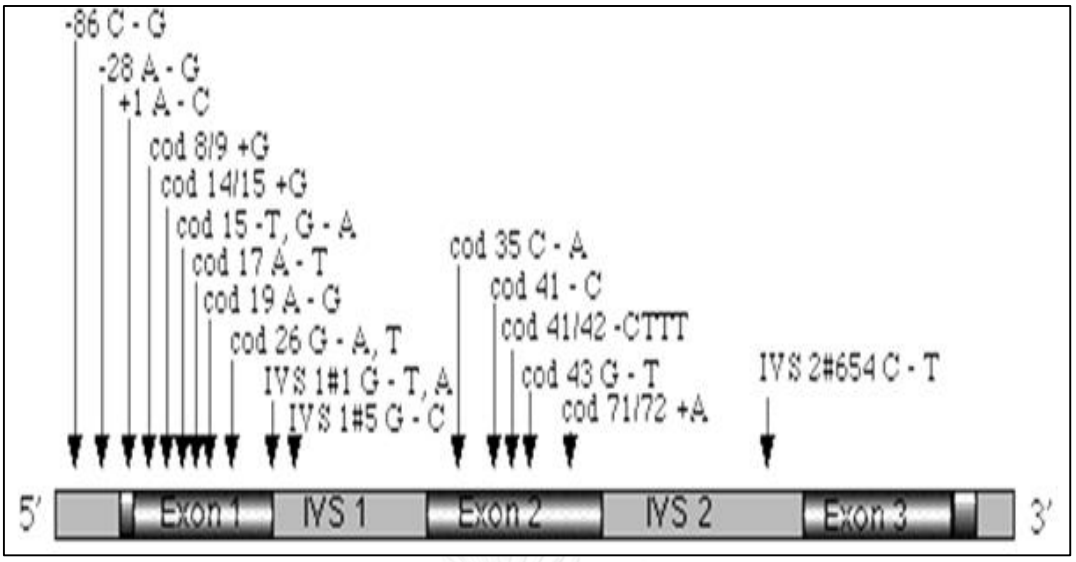
2.4.2.4 การกลายพันธุ์ของยีนทำให้บริเวณที่จะสร้างโปรตีน สิ้นสุดการสร้าง stop region ซึ่งทำให้ส่วนที่เป็น (coding region) นั้นยืดออกกว่าปกติ เช่น Hb Constant Spring ping [21]

α-thalassemia เป็นการหายไปของยีนแอลฟาโกลบิน) α-globin gene) ทำให้ไม่สามารถสร้างแอลฟาโกลบินได้หรือสร้างได้น้อยกว่าปกติ ซึ่งความรุนแรงของระดับการสร้างแอลฟาโกลบินที่ลดลงขึ้นกับตำแหน่งและจำนวนของยีนที่มันกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์นี้เกิดขึ้นทั้งในยีน α_1 และ α_2 หรือเกิดเฉพาะแต่ในยีนใดยีนหนึ่ง เพียงยีนเดียวเท่านั้น แต่ถ้าเป็นสาย α_1 จะไม่มีการสร้างสายแอลฟาโกลบินเลยในส่วนนี้จะเกิดความผิดปกติจากยีนทั้งสอง loci ที่ขาดหายไป α-thalassemia 1 ที่สามารถพบได้บ่อยที่สุดคือ Southeast Asia type (SEA type) สำหรับ α-thalassemia 2 เป็นชนิดค้นพบว่าสามารถสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบีนได้แต่สร้างในปริมาณน้อยกว่าปกติและอาการรุนแรงน้อยกว่า α-thalassemia 1 ความผิดปกติส่วนใหญ่นั้นเกิดมีการขาดหายไปของยีนในช่วงที่ 3.7 kb ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) เกิดขึ้นเพราะว่ามีการเรียงตัวผิดตำแหน่ง เกิดมีการ crossing over ที่มีการรวมตัวกันเป็นยีนใหม่อีกครั้งที่มี DNA ใน ช่วง 3.7 kb ที่ขาดหายไปลักษณะแบบนี้มักจะพบได้บ่อยในกลุ่มประชากรชาวผิวดำอเมริกันที่พบได้ประมาณร้อยละ 20-30 Heterozygous และส่วน Homozygous พบได้ในปริมาณร้อยละ 2-3 ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) ส่วน α-thalassemia ที่มีความผิดปกติที่รองลงมาที่พบได้บ่อยเช่นกันนั้นเกิดจากการหายไปของยีนช่วง 4.2 kb ($-\alpha^{4.2}/\alpha$) โดยส่วนใหญ่จะพบมากในกลุ่มคนแถบเอเชีย [22-24]



ภาพที่ 4 การแสดงลำดับของยีนสายแอลฟาโกลบินที่มีขนาดของยีนขาดหายไปที่เป็นสาเหตุทำให้เกิด α-thalassemia ชนิดต่างๆได้ [25]

β-thalassemia นับได้ว่าเป็นความผิดปกติของยีนที่มีการสร้างสาย β-globin ลดลงหรือไม่สามารถสร้างได้เลยโดยในความผิดปกติที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่นั้นเกิดมีการเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งของเบสที่มีการขาดหายไปเพียงตัวใดตัวหนึ่งก็ทำให้เกิดมีการ (Mutation) ของgene ซึ่งความรุนแรงของ β-thalassemia ขึ้นอยู่กับชนิดของการกลายพันธุ์ ถ้าหากยังมีการสร้างสายโปรตีน β-globin หรือไม่มีอาจทำให้มีอาการรุนแรงมากขึ้นเช่น β^0-thalassemia จัดได้ว่าเป็นชนิดที่รุนแรงแต่ถ้ายังมีการสร้างได้อยู่แต่สร้างในปริมาณที่น้อยจะมีความรุนแรงน้อยกว่า เช่น β^+-thalassemia โดยการกลายพันธุ์เกิดจากการแทนที่ของเบสตัวใดตัวหนึ่งที่บริเวณ promoter ที่พบเป็นประจำหรือพบบ่อยๆได้แก่ ตำแหน่งของ C เปลี่ยนเป็น G (C⟶G) ตำแหน่ง (-86) อีกชนิดของเบส A เปลี่ยนเป็น G (A⟶G) ที่ตำแหน่ง (-28) การกลายพันธุ์กลุ่มนี้เป็นชนิดของ β^+-thalassemia และตำแหน่ง (-101) ที่เปี่ยนจาก (C⟶T) ที่ก่อให้เกิด β-thalassemia แบบแฝง (silent β-thalassemia) ได้ [26, 27]



ภาพที่ 5 การแสดงออกของการกลายพันธุ์ยีนสายบีต้าโกลบิน [28]

2.4.3 การรักษาโรคธาลัสซีเมีย

ผู้ป่วยธาลัสซีเมียหากไม่ได้รับการดูแลรักษาที่เหมาะสมก็จะทำให้ผู้ป่วยมีอายุขัยลดลง การรักษาโรคนี้จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งเพื่อหลีกเลี่ยงอัตราของการเสียชีวิตให้ลดลง เนื่องจากโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียมีหลายชนิด และมีระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน ระดับที่รุนแรงมากที่สุด เช่น Hb Bart's hydrops fatalist ที่ทำให้เด็กตายตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา และในอีกระดับที่พบคือช่วงแรกเกิดจะเห็นว่ามีความปกติแต่เมื่อเด็กได้มีอายุ 1-2 ปีเริ่มมีอาการความผิดปกติเกิดขึ้น ดังนั้นการรักษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคเลือดจางจากการเป็นโรคธาลัสซีเมียนี้ ส่วนใหญ่แล้วจะเน้นไปที่อาการและความรุนแรงของโรค สามารถรักษาได้โดยการให้เลือดแบบประคับประคองเพื่อจะผู้ป่วยที่ได้รับเลือดนั้นมีจำนวนระดับฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นเป็นระยะทำให้ผู้ป่วยนั้นหายจากอาการอ่อนเพลียจากการขาดออกซิเจน การรักษาอีกแบบคือการให้เลือดแก่ผู้ป่วยเป็นประจำจนกว่าผู้ป่วยจะหายจากภาวะซีดซึ่งส่วนมากแล้วจะให้ในผู้ป่วยที่มีอาการที่รุนแรงตั้งแต่อายุน้อยๆอย่างสม่ำเสมอเพื่อจะได้ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของกระดูกของใบหน้าและยังเป็นการป้องกันไม่ให้ตับและม้ามโตได้ เพราะฉะนั้นการรักษาผู้ป่วยอย่างถูกวิธีและเหมาะสมนั้นจะลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้ ผู้ป่วยจะแข็งแรงขึ้นไม่เหนื่อยง่ายการเจริญเติบโตเป็นปกติทั้งน้ำหนัก และส่วนสูง เป็นต้น [29]

2.4.3.1 การให้เลือด

ในผู้ป่วยที่มีภาวะซีดนั้นเพื่อเป็นการทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซเมียดีขึ้นและมีชีวิตที่ยืนยาวจำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยวิธีให้เลือดแก่ผู้ป่วย ทั้งนี้การให้เลือดถือว่ามีความจำเป็นและสำคัญมากระหว่างผู้ให้และผู้รับเพราะเลือดที่จะให้นั้นต้องมีหมู่เลือดที่ตรงกัน การให้ทุกครั้ง แพทย์ต้องติดตามอย่างใกล้ชิดเป็นประจำเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาตามมา ดังนั้นการให้เลือดที่เหมาะแก่ผู้ป่วยควรปฏิบัติตามหลักการให้อย่างถูกต้องเพื่อป้องกันไม่ให้มีผลเสียที่จะเกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมีย

2.4.3.2 การปลูกถ่ายไขกระดูก

การปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) เป็นการรักษาให้หายขาด โดยหลักการของการปลูกถ่ายไขกระดูก หรือการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดคือ ผู้ป่วยจะต้องมีผู้ให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรม Human leukocyte Antigen หรือ HLA เหมือนกับผู้ป่วยโดยต้องเตรียมผู้ป่วยให้พร้อมที่จะรับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดใหม่ด้วยการให้ยาเคมีบำบัดขนาดสูงแล้วจึงนำเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากผู้ให้มาให้แก่ผู้ป่วยทางเส้นเลือดดำใหญ่ ภายหลังการปลูกถ่ายไขกระดูกผู้ป่วยจะมีภูมิต้านทานต่ำมากต้องอยู่ในห้องแยกเพื่อป้องกันการติดเชื้อเนื่องจากปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงและได้ยากดภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ของผู้ให้ต่อผู้รับทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดใหม่ที่ให้สามารถปรับเข้ากับร่างกายผู้ป่วยได้ เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ให้เข้าไปใหม่จะใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ในการเจริญแบ่งตัวเป็นเซลล์เม็ดเลือดที่ปกติต่อไป [30]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.3.3 การใช้ยาขับเหล็ก

ในผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่มีความรุนแรงและมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการรักษาด้วยการให้เลือดตลอดชีวิตอาจทำให้มีภาวะเหล็กเกินเกิดขึ้นได้ เพราะปกติในแต่ละวันร่างกายของคนเราจะได้รับธาตุเหล็กที่กินเข้าไปประมาณ 2 มิลลิกรัม/วัน ทั้งนี้การกำจัดธาตุเหล็กที่เหลือออกจากร่างกายก็เท่ากันกับตอนที่ได้รับมาจากการรับประอาหารที่มีธาตุเหล็กเข้าไปเพื่อความสมดุลกับสิ่งที่รับเข้าไปในร่างกาย ซึ่งลำไส้เล็กก็จะดูดซึมเข้าไปในรูปแบบของ ferrous form (Fe^{2+}) แล้วจะเข้าสู่กระแสเลือดโดยจับกับโปรตีน transferrin ดังนั้นธาตุเหล็กที่หมุนเวียนในกระแสเลือดหรือตามร่างกายจะต้องถูกนำส่งเข้าไปในไขกระดูกเพื่อทำการสร้างฮีโมโกลบินที่มีในอยู่เม็ดเลือดแดงขึ้นมาใหม่อีก [31] ส่วนเหล็กอีกจำนวนหนึ่งก็ถูกไปเก็บสะสมไว้ในเซลล์ตับ เมื่อเวลาที่ต้องการและมีความจำเป็นซึ่งจะต้องได้นำมาใช้ใหม่อีกครั้ง ผู้ป่วยที่ได้รับเลือดเป็นประจำจะมีแนวโน้มสูงมากที่จะมีเหล็ก

เกินได้เพราะเลือดที่ผู้ป่วยได้รับเข้าไปนั้นในถุงหนึ่งอาจจะมีธาตุเหล็กในปริมาณ 200-250 มิลลิกรัม เมื่อเทียบกับจำนวนที่ร่างกายที่ได้รับจากการทานอาหารชนิดต่างๆเข้าไปและขับออกในแต่ละวันมีเพียงแค่ 1-2 มิลลิกรัม ดังนั้นเมื่อเทียบกันแล้วจะเห็นว่าร่างกายได้รับธาตุเหล็กเข้าไปจากการให้เลือดเท่ากับ 200 เท่าของปริมาณที่ร่างกายได้รับจากเดิมที่มีการดูดซึมเข้าไปจากทางเดินอาหาร เพราะฉะนั้นร่างกายจึงไม่สามารถขับเหล็กออกได้ตามจำนวนที่ได้รับเข้ามาจากการรับเลือดถึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดมีภาวะเหล็กเกินได้ ธาตุเหล็กที่มาสะสมภายในร่างกายมากจนเกินไปก็จะส่งผลกระทบต่อระบบอวัยวะร่างกายอย่างมากโดยเฉพาะระบบหัวใจ ไต ต่อมไร้ท่อ และตับอาจจะนำไปสู่ภาวะโรคแทรกซ้อนที่ทำให้ร่างกายได้รับผลกระทบอย่างมาก ถ้าหากเหล็กนั้นไปสะสมในที่ใดที่หนึ่งในร่างกายเช่น สะสมที่หัวใจทำให้หัวใจเกิดมีการเต้นผิดจังหวะ เต้นเร็วกว่าปกติและสามารถทำให้ผู้ป่วยหัวใจวายได้ ถ้าสะสมในตับมากเกินไปก็จะทำให้ตับเกิดเป็นพังผืดขึ้นมาจนทำให้ตับวายได้ ร้ายแรงกว่านั้นอาจทำให้เกิดเป็นโรคเบาหวานได้ แต่ถ้าในเด็กที่มีเหล็กเกินก็จะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของร่างกายโดยตรงคือทำให้เด็กมีการเจริญเติบโตได้ช้า ตัวเล็ก ตัวเตี้ย [32]ในผู้ป่วยเด็กที่รับ hyper transfusion ไปประมาณ 15 ครั้งให้เลือดประมาณ 1 ปีจะทำให้ serum ferritin สูงกว่า 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งถือว่ามีภาวะเหล็กเกิน (iron overload) ที่ควรได้รับการแก้ไขและธาตุเหล็กจะเพิ่มขึ้นอีกเมื่อได้รับเลือดต่อไป เพราะฉะนั้นผู้ป่วยจะต้องได้รับการรักษาด้วยวิธีให้ยาขับเหล็ก ส่วนในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงได้แก่ β-thalassemia major และ β-thalassemia /Hb E [33] ที่ต้องได้รับเลือดเป็นประจำ เรียกผู้ป่วยกลุ่มนี้ว่า transfusion dependent thalassemia การรักษาประกอบด้วยการให้เลือดตลอดชีวิต ดังนั้นผู้ป่วยที่ได้รับเลือดเป็นประจำควรจะต้องได้รับยาขับธาตุเหล็กควบคู่กันไปเพื่อลดภาวะแทรกซ้อนที่จะตามมา [34, 35]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.3.4 การตัดม้าม

การตัดม้ามเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งเพื่อลดการจับทำรายเม็ดเลือดแดงจากม้ามโดยผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีอาการตับโตม้ามโตเพราะเม็ดเลือดแดงถูกทำลายเกินไปก่อนอายุไข การตัดม้ามจึงเป็นวิธีหนึ่งของการรักษาเพื่อช่วยผู้ป่วยตามภาวะซีดของผู้ป่วย เมื่อภาวะซีดถึงระดับที่เหนื่อยง่าย เช่นระดับ ฮีโมโกลบินน้อยกว่า 7 กรัมต่อเดซิลิตร จะเป็นข้อบ่งชี้ว่าจำเป็น ต้องให้เลือด ในบางรายนอกจากจะพบภาวะซีดและม้ามโตมาก แล้วยังพบว่าม้ามทำหน้าที่มากเกินไปคือทำลายเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ซึ่งจำเป็นต้องตัดม้าม [36]

2.5 การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ

การตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียสามารถทำได้โดยการเจาะเลือดส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งมี 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 ประเมินความเสี่ยงในการเป็นโรคธาลัสซีเมีย โดยอาศัยการตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดแดง Complete blood count: (CBC) เป็นเกณฑ์หลัก โดยกำหนดค่าปกติคือ Hct ≥ 36-52 %, Hb ≥ 12-18g/dl, MCV ≥ 80-100 femtoliter MCH ≥ 2-31 picograms/cell, MCHC ≥ 32-36 grams/deciliter ถ้าผลการตรวจมีค่าผิดปกติจึงทำการตรวจในขั้นตอนต่อไป ขั้นตอนที่ 2 เป็นการตรวจคัดกรองโดยวิธี Osmotic fragility Test (OF–Test), Dichlorophenol Indophenol Precipitation Test (DCIP Test) ต้องเป็นผลลบ (Negative) จึงจะถือว่าคนๆนั้นปกติ ไม่จำเป็นต้องตรวจโดยวิธีพิเศษ แต่ถ้าหากผลการตรวจเป็นบวก (Positive) จะต้องทำการตรวจวินิจฉัยหาชนิดของความผิดปกติต่อไปโดยการทำ hemoglobin typing โดยมีหลักทั่วไปในการแปลผลการตรวจ hemoglobin typing ดังต่อไปนี้

2.5.1 ในคนปกติผลการตรวจเป็น A2A ส่วนใหญ่เป็น Hb A โดยที่ระดับของ Hb A2 น้อยกว่าร้อยละ 2.5

2.5.2 หากตรวจพบระดับของ Hb A2 มากกว่าร้อยละ 3.5 โดยที่ผู้ป่วยไม่มีภาวะโลหิตจาง แสดงว่าอาจจะเป็นพาหะของ β-thalassemia

2.5.3 เนื่องจากในการตรวจ Hb electrophoresis โดยหลักการวิธี HPLC นั้น ตำแหน่งพีคของ Hb E และ Hb A2 อยู่ที่เดียวกัน การที่จะบอกว่ามี Hb E ร่วมด้วยหรือไม่ขึ้นกับปริมาณที่ตรวจพบ โดยทั่วไปพบปริมาณ Hb A2 น้อยกว่าร้อยละ 15 หากพบปริมาณมากกว่านี้จะรายงานเป็น Hb E

2.5.4 ในผู้เป็นพาหะของ Hb E ตรวจพบ Hb E ประมาณร้อยละ 35-25 หากพบว่ามีปริมาณของ Hb E น้อยกว่าร้อยละ 25 จะต้องสงสัยว่าผู้ป่วยมี α-thalassemia ร่วมด้วยหรือมีภาวะโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กร่วมด้วย

2.5.5 ผู้ที่เป็น Homozygous Hb E จะตรวจพบ Hb E มากกว่าร้อยละ 85

2.5.6 หากผลตรวจพบว่ามี Hb Bart's หรือ Hb H แสดงว่าผู้ป่วยเป็น α-thalassemia ชนิด Hb H disease

2.5.7 ผู้ที่เป็นพาหะของ Hb Constant Spring (Hb CS) ตรวจพบ Hb CS ร้อยละ 1-2 ส่วนผู้ที่เป็น Homozygous Hb CS จะตรวจพบ Hb CS ร้อยละ 5-10 อย่างไรก็ตามอาจตรวจไม่พบฟีคของ Hemoglobin Constant Spring ได้โดยวิธี Hemoglobin Electrophoresis

2.5.8 ผู้ที่เป็นพาหะ α_1 ผู้ป่วยไม่มีความผิดปกติทางคลินิก ผลการตรวจ Hemoglobi typing เหมือนคนปกติ แต่พบว่ามีค่า MCV ต่ำกว่าปกติ

2.5.9 ผู้ที่เป็นพาหะของ α_2 จะตรวจไม่พบความผิดปกติใดๆ ในการวินิจฉัยทำได้โดยอาศัยการตรวจวิเคราะห์ยีนหรืออาศัยหลักการทางพันธุศาสตร์ คือกฎของเมนเดล ในระดับ DNA

2.5.10 ขั้นตอนการตรวจหาชนิดของความผิดปกติด้วยการทำ Gap PCR ในผู้ป่วยที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิด α-thalassemia หรือการตรวจด้วยวิธี Sequencing ในผู้ป่วยที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิด β-thalassemia เป็นต้น [37]

2.6 อุบัติการณ์ของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ

องค์การอนามัยโลก (World health Organization: WHO) ได้สำรวจกลุ่มประชากรทั่วโลกพบว่าร้อยละ 7 ที่สามารถตรวจพบฮีโมโกลบิน อี โดยพบมากที่สุดในภูมิภาคเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่น ลาว ไทย เวียดนาม กัมพูชา พม่า ที่พบว่ามีประชาชนเป็นพาหะของโรคดังกล่าวนี้จำนวนมากและสามารถส่งผลกระทบหรือถ่ายทอดมาสู่ลูกได้โดยในแต่ละปีจะมีเด็กทารกที่เป็นโรคชนิดที่รุนแรงนี้ถึง 300.000-400.000 คน [6] ทั้งนี้ก็ยังมีการรายงานว่าในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สามารถพบธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติได้หลายชนิด ได้แก่:

α-thalassemia ร้อยละ 30, β-thalassemia คิดเป็นร้อยละ 3-9 Hb E คิดเป็นร้อยละ 54 Hb CS คิดเป็นร้อยละ 7 และ Hb Pakse’s คิดเป็นร้อยละ 2 สำหรับในประเทศไทยนั้นพบผู้ป่วยธาลัสซีเมียประมาณร้อยละ 1 ของประชากร และอีกร้อยละ 40 ของประชากรเป็นพาหะของโรค[38] จาการศึกษาพบว่าอุบัติการณ์ของประชากรที่มียีนธาลัสซีเมีย หรือยีนของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดซึ่งเป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียมีความแตกต่างกันตามแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย [39] นอกจากนี้ในปี 2547 ได้มีการลายงานว่าคู่สมรสของประชากรไทยก็มีโอกาสเสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดที่รุนแรงได้และก็มีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคโดยพบว่าภาคเหนือมีโอกาสเสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียได้ร้อยละ 15.3 ภาคกลางนั้นพบร้อยละ 3.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบร้อยละ 2.4 ส่วนภาคใต้นั้นพบว่ามีพาวะเสี่ยงน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 0.5 [40] [41]

ทั้งนี้สำหรับในกลุ่มประชากรลาวก็พบการรายงานก่อนหน้านี้โดยการศึกษาอยู่ในหญิงตั้งครรภ์ซึ่งพบว่าเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบิน อี มากเช่นกันโดยการเฉลี่ยร้อยละ 30.2 เป็นพาหะฮีโมโกลบิน อี และร้อยละ 3.6 พบว่าเป็นพาหะ β-thalassemia ร้อยละ 12.7 เป็นชนิด α-thalassemia [42]

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานและแผนการวิจัย

3.1 วิธีการดำเนินงาน

3.1.1 กลุ่มตัวอย่างที่เข้าในการวิจัย

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่เจาะเก็บมาจากประชากรลาวที่อาศัยอยู่ในนครหลวงเวียงจันทร์ สปป ลาว อายุระหว่าง.15-50 ปี โครงการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จาก National Institute of Public Health National Ethics Committee for Health Research (NECHR) สปปลาว. โดยใช้กลุ่มอาสาสมัคร กลุ่มประกอบด้วยกลุ่มอาสาสมัคร 2

กลุ่มที่ ใช้สำหรับตรวจหาอุบัติการณ์โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ จำนวน 1354 ราย ซึ่งประกอบด้วยเพศหญิง 205 ราย และ เพศชาย 149 ราย

กลุ่มที่ 2 ใช้สำหรับตรวจหาอุบัติการณ์การเกิดร่วมระหว่างพาหะฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงและธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ ซึ่งใช้เลือดจากกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจในโรงพยาบาลมโหสด สสป. ลาว จำนวนทั้งหมด 120 ราย ประกอบด้วยเพศชายจำนวน 41 คน และ เพศหญิงจำนวน 79 คน

3.1.2 การตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ

การศึกษานี้ทำการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติอ้างอิงจากแนวทางการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งเริ่มจากการตรวจคัดกรองโดย 3 วิธีคือการตรวจ OF test การตรวจ DCIP test และการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง และตรวจยืนยันโดยการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด (Hb typing) และการตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ (DNA analysis) ดังรายละเอียดแสดงในภาพที่ 6

3.1.3 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- High speed refrigerated centrifuge (Labnet, Toronto, Ontario, Canada)
- Auto pipette 0.5-10 µl (Proline® Biohit, England)
- Auto pipette 2-20 µl (Proline® Biohit, England)

- Auto pipette 10-100 µl (Gilson, Inc, USA)
- Auto pipette 1000 µl (Gilson, Inc, USA)
- Centrifuge, wisespin®CF (Daihan Scientific Co,Ltd, south korea)
- EDTA tube (BD BioSeiosciences, USA)
- Gel electrophoresis Applied Biosystemes (Bio-rad, USA)
- Analytic balance (Mettler Toledo, Switzerland)
- 20°c freezer (ilshim, Netherlands)
- Incubator (Memmert, Germany)
- Vortex Mixer (Finepcr, southkorea)
- Bio Rad MyCycler Thermal Cycler PCR (Bio Rad, USA)
- Power supply (Bio Rad, USA)
- Erlenmeyer Flask (T S interlab, USA)
- ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, USA)
- CFX 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)
- VARIANT II Hemoglobin Testing System (Hb variant, Bio-Rad, USA)

Chulalongkorn University

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

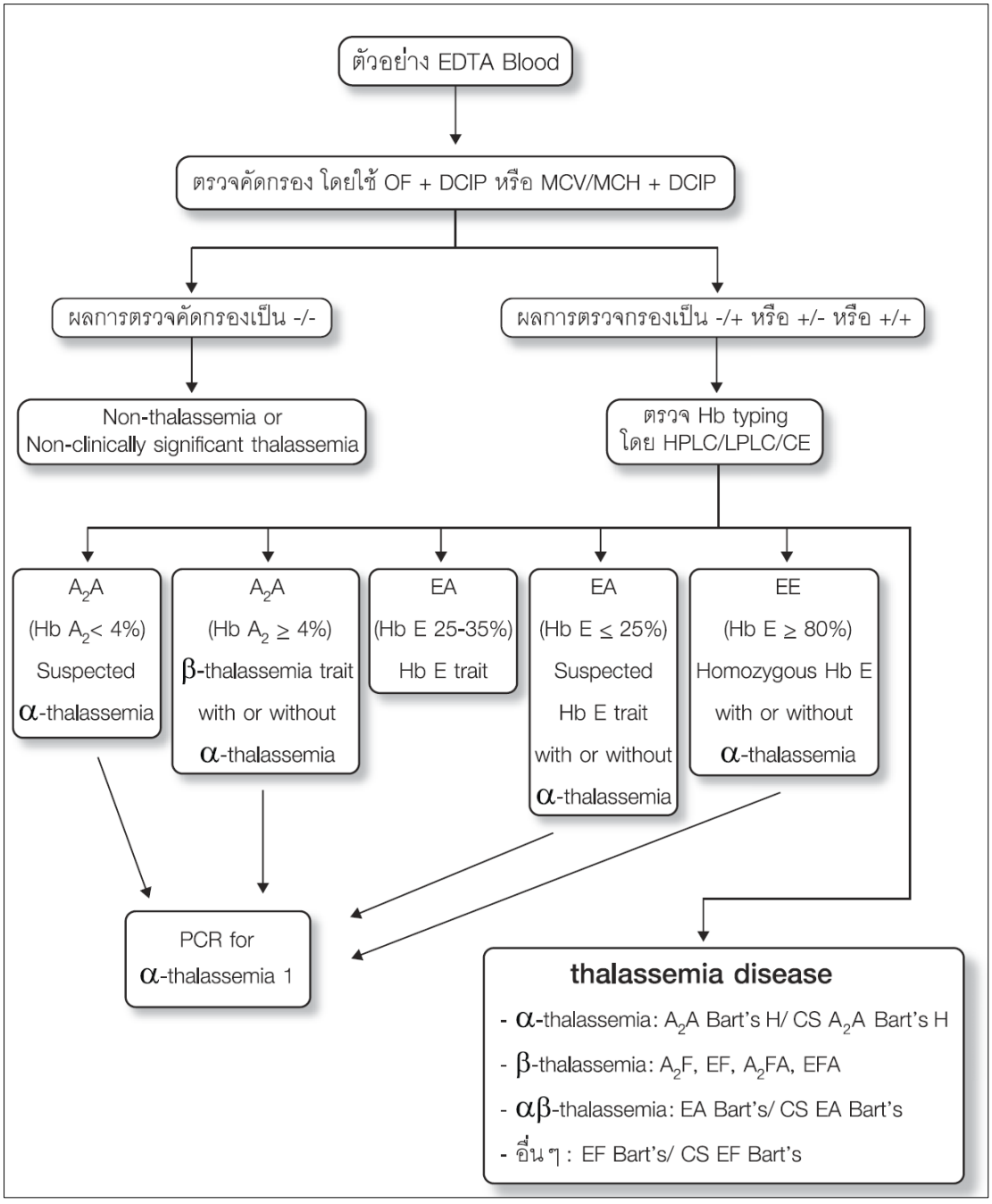
3.2.1 สารเคมีและน้ำยาที่สกัด DNA

- Isopropanol (E.Merck, Darmstadtt, F.A., Germany)
- Absolute ethanol (C_2H_5OH) (E.Merck, Darmstadtt, F.A., Germany)
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)

3.2.2 สารเคมีและน้ำยาที่ทำ PCR

- 10X Reaction buffer (Bioline, pty.Ltd, Australia)
- 5X DNA loading buffer, (Bioline, pty.Ltd, Australia)
- Hot star tag® plu DNA polymerase (Qiagen, USA)
- 1 Kb DNA ladder RTU (Gene dire, USA)
- 50 mM $MgCl_2$ (Bio line, USA)
- 2 mM dNTPs (KAPA BIOSYSTEMS, USA)
- 5X Q solution (Qiagen, USA)
- XzOligonucleotide primer (Bio design, Thailand)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 6 สรุปแผนแนวทางการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจวินิจฉัยหาความผิดปกติของยีน [43]

3.3 การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย

อาสาสมัครที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยได้ถูกเจาะเลือดในปริมาณ 3 ml ใส่ในหลอดที่มี Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) เป็นสารกันเลือดแข็งตัวผสมเลือดให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจความสมบูรณ์ของเลือดด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติภายในเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง หลังจากตรวจความสมบูรณ์ของเลือดเสร็จ ตัวอย่างเลือดที่เหลือได้ถูกนำไปตรวจ Osmotic fragility test (OF) และ Dichlorophenolindophenol precipitation (DCIP) test ต่อไป

3.3.1 ขั้นตอนการตรวจ Osmotic fragility test (OF)

เติมเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA จำนวน ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน 20 tube ที่มีสารละลายน้ำยา Thalcon-OF บรรจุอยู่ปริมาณ 2 มล แล้วปิดฝาให้สนิทแล้วทำการกลับหลอดทดลองไปมาประมาณ 2-4 ครั้งเพื่อผสมเลือดและน้ำยาให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่า ถ้าสีของสารละลายใสก็แสดงว่าให้ผล (negative) แต่ถ้าสีของสารละลายนั้นขุ่นถือให้ผลบวก (positive)

3.3.2 ขั้นตอนการตรวจ Dichlorophenolindophenol precipitation (DCIP) test

เติมเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA จำนวน ไมโครลิตร ใส่ลงไปใน 20 tube ที่มีสารละลายน้ำยา Thalcon-DCIP ปริมาตร 20 µl ปิดฝาให้สนิทแล้วผสมให้เข้ากันโดยการกลับ Tube ไปมา 2-4 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำ Water bath ปรับอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พอครบเวลาให้เอาออกมาเติมน้ำยา Decolorizing Agent 20 µl แล้วอ่านผลภายใน 2-3 นาที ไม่ควรปล่อยให้ใช้เวลามากเกินไปเพราะอาจทำให้การอ่านผลผิดไปได้ ถ้าสีของสารละลายใสก็แสดงว่าให้ผลลบ(negative) แต่ถ้าสีของสารละลายนั้นขุ่นถือให้ผลบวก (positive)

3.3.3 การตรวจวิเคราะห์ ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin typing) ด้วยเครื่อง HPLC

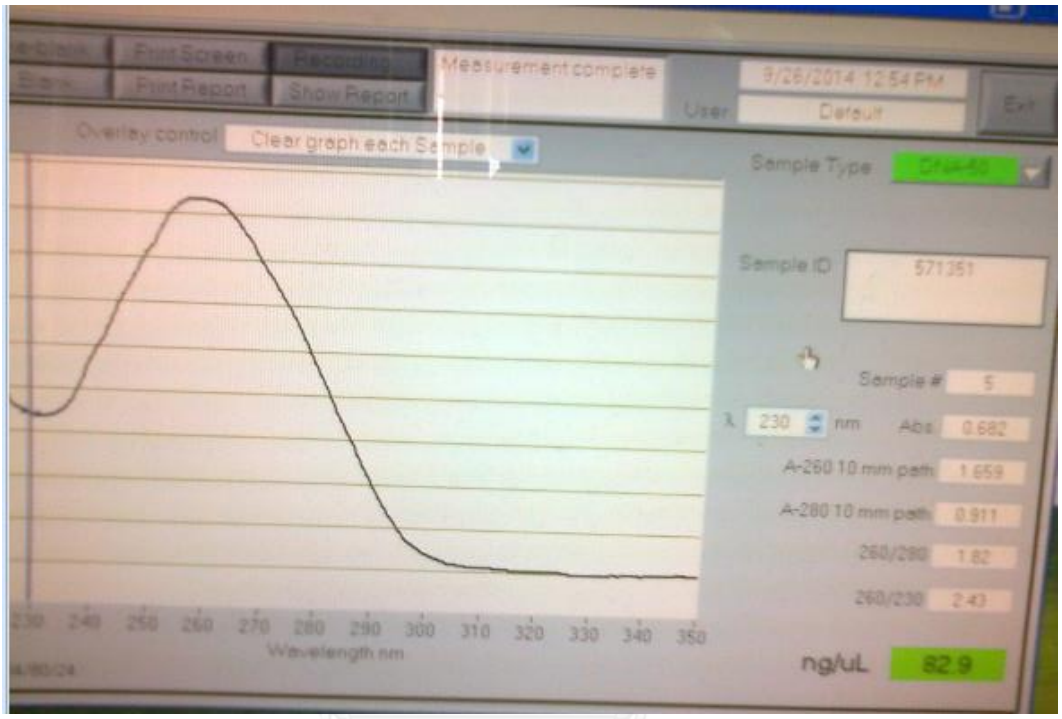
ใช้เลือดที่มีน้ำยา EDTA ในการตรวจ Hemoglobin typing เพื่อวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและเพื่อดูความผิดปกติที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง VARIANT II Hemoglobin Testing System ซึ่งมีคุณสมบัติของการทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงและมีความแม่นยำดีที่สุดเพราะว่าเครื่องนี้ ใช้ระบบ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นการแยกโดยอาศัยอัตราการเคลื่อนที่ของสารระหว่างเฟส 2 เฟส คือเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ผ่านไปบนเฟสอยู่กับที่เรียกว่าเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

ในระบบ HPLC เฟสเคลื่อนที่จะเป็นของเหลว เช่นสารละลายบัพเฟอร์ต่างๆ สารที่จะนำมาแยกจะมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายและมีความสามารถในการดูดซับบนตัวดูดซับต่างกัน ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารแต่ละอย่างต่างกัน โดยสารที่ละลายได้ดีและถูกดูดซับได้น้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ทำให้ถูกชะ (elute) ออกมาก่อน สารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ได้ช้า จึงถูกชะออกมาทีหลัง ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดจะถูกแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ที่ระยะเวลาต่างๆ กันที่แน่นอน (specific retention time) เพราะฉะนั้นจึงใช้ retention time เป็นตัวระบุชนิดของฮีโมโกลบินได้ ส่วนการตรวจปริมาณของฮีโมโกลบิน (hemoglobin quantitation) จะทำโดยการวัดการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดโดยใช้ photometer เป็นตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และ 690 นาโนเมตร เพื่อเป็นการตัดค่าสารรบกวนอื่นออก ในการคำนวณความเข้มข้นของฮีโมโกลบินออกมาเป็นร้อยละ จะคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด โดยใช้สารมาตรฐานที่รู้ค่าความเข้มข้นของ HbA2 และHb F ในการปรับค่า (calibrator) เพื่อให้ค่าที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำสูง [44]

3.3.4 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจคัดกรองและตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำมาทำการตรวจในระดับยีนโดยใช้น้ำยามาตรฐาน Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) โดยนำเลือดที่ต้องการสกัดปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยา Red cell lysis solution 900 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกให้หมดแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นด้วยความเร็ว 13.000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้หมด เก็บแต่ส่วนที่เป็นตะกอนที่อยู่ส่วนข้างล่างหลอดทดลอง เติมน้ำยา Nuclei lysis solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไป Vortex หลังจากนั้นเติมสารน้ำยา Protein Precipitation solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex ประมาณ 20 วินาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13.000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่ในหลอด Eppendorf ใหม่ส่วนหลอดเดิมทิ้งแล้วเติมสารน้ำ Isopropanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13.000 rpm นาน 1 นาที แล้วเทน้ำใสออกให้หมดแล้วจะเห็นว่ามีเม็ดก้อนสีขาวที่ติดอยู่ก้น Eppendorf จากนั้นจิงทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ติดอยู่นั้นด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดสิ่งที่ปนเปื้อนที่ติดกับ DNA ให้ออกเหลือแต่ DNA บริสุทธิแล้วนำไป Vortex แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13.000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นให้เท Ethanol ออกให้หมดเติมสารละลาย DNA Rehydration 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือนำไปเก็บไว้ที่

ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส 1 คืน แล้วนำไปตรวจวัดความเข้มข้นของ DNA โดยใช้เครื่อง ND-100 Spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ดังแสดงอยู่ในภาพที่ 7 จากการตรวจวัดปริมาณของ DNA ที่ได้จากการสกัด



ภาพที่ 7 แสดงถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยวันความเข้มข้นที่คลื่นแสง 260 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.5 ขั้นตอนการตรวจหา α-thalassemia โดยเทคนิค Gap-Polymerase chain reaction (PCR)

α-halassemia 1 และ α-thalassemia 2 เกิดจากการขาดหายไปของยีน α-globin ขนาดตั้งแต่ 3.7kb ถึง ประมาณ 20kb การศึกษานี้จึงใช้เทคนิค Gap-PCR ในการตรวจหาความผิดปกติดังกล่าว ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR แสดงในตารางที่ 3 และในการศึกษานี้ได้ใช้จำนวนไพร์เมอร์อยู่ 9 เส้นด้วยกันดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับใช้ตรวจหา α-thalassemia

No	**สารเคมีที่ใช้**	**Master mix/1 Reaction (ไมโครลิตร)**
01	5 X Q solution	5 ไมโครลิตร
02	10 X Buffer (15mM $MgCl_2$)	2.50 ไมโครลิตร
03	2mM dNTPs	2.50 ไมโครลิตร
04	Thai-F primer (10μM)	1.50 ไมโครลิตร
05	Thai-R primer (10μM)	1.50 ไมโครลิตร
06	4.2-F primer (10μM)	1.25 ไมโครลิตร
07	4.2-R primer (10μM)	1.25 ไมโครลิตร
08	3.7-F primer (10μM)	1 ไมโครลิตร
09	3.7-R primer (10μM)	1 ไมโครลิตร
10	α2-R primer (10μM)	1 ไมโครลิตร
11	SEA-F primer (10μM)	1 ไมโครลิตร
12	SEA-R primer (10μM)	1 ไมโครลิตร
13	Hot start Tag polymerase	0.25 ไมโครลิตร
14	DW	0.25 ไมโครลิตร
15	DNA product	4.00 ไมโครลิตร

เมื่อผสม master mix แล้วก็นำไปเข้าเครื่อง Bio Rad MyCycler Thermal Cycler PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR ตรวจหายีน alpha-thalassemia โดยการติดตั้งเครื่อง Condition ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 2 ขั้นตอน PCR amplification ที่ใช้ในการตรวจหา α-thalassemia

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
01. pre-denature	95 ℃	15 นาที
02. Denature	98 ℃	45 วินาที
03. Annealing	60℃	90 วินาที
04. Extension	72℃	135 วินาที
การทำ PCR amplification ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ		
05.post extension	72℃	5นาที

3.3.6 วิธีเตรียมเจล Agarose gel สำหรับตรวจสอบแอลฟ่าธาลัสซีเมีย

PCR product ของแอลฟ่าธาลัสซีเมียจะมีขนาดประมาณ 1100-2100 base pair จึงต้องใช้ Agarose gel ที่มีเปอร์เซ็นต์ต่ำคือ 1% หรือ 1.5% Agarose gel เตรียมโดยใช้สารละลาย 1X TAE buffer หลังจากที่เตรียมเจล Electrophoresis แต่ก่อนจะนำรันเจลนั้นต้องมีการผสมสี 5X DNA loading dye buffer กับ PCR product ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อระบุตำแหน่งของ DNA ขณะแยกด้วย Electrophoresis โดย 5X DNA loading buffer มีคุณสมบัติของสี loading dye จะไปจับกับ PCR product เพื่อถ่วงให้น้ำหนักดีเอ็นเอตกลงด้านล่างของหลุม และเป็นการป้องกันไม่ให้ PCR product ไหลออกจากหลุมหรือไหลกระจายใน TAE buffer ขณะแยกด้วยกระแสไฟฟ้าสามารถมองเห็นแถบ DNA ได้ด้วยว่ามีการเคลื่อนที่ไปถึงจุดไหน งานวิจัยนี้ใช้ 1 Kb DNA ladder RTU เป็นแถบ DNA มาตรฐานในการเทียบขนาด ใช้เวลาในการทำเจล Electrophoresis 45-50 นาที กระแสไฟฟ้าที่ใช้ 95 volt และ 1X TAE buffer ตัวที่เป็นกลางช่วยในการชักนำกระแสไฟฟ้า โดยน้ำบัฟเฟอร์จะเป็นสื่อพาให้โมเลกุลของ DNA ที่มีประจุลบ เคลื่อนไปหาประจุบวก เมื่อกระบวนวิเคราะห์เสร็จสิ้นนำ Agarose gel ไปย้อมดูแถบ DNA โดยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ Ethidium bromide ซึ่งสารละลาย Ethidium bromide จะจับกับ DNA เมื่อนำไปดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นแถบ DNA ขนาดต่างๆ เมื่อเทียบกับแถบของ DNA marker จะทำให้ทราบว่าขนาดของ DNA ที่นำมาศึกษามีขนาดเท่าไร

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา α-thalassemia

ชื่อไพร์เมอร์	**ลำดับเบส**
α2/3.7-Forward Primer	5' CCC-CTC-GCC-AAG-TCC-ACC-C 3'
α2/3.7-Reverse Primer	5' AAA-GCA-CTC-TAG-GGT-CCA-GCG 3'
α2-Reverse Primer	5' AGA-CCA-GGA-AGG-GCC-GGT-G 3'
4.2-Forward Primer	5' GGT-TTA-CCC-ATG-TGG-TGC-CTC 3'
4.2-Reverse Primer	5' CCC-GTT-GGA-TCT-TCT-CAT-TTC-CC 3'
Sea-Forward Primer	5' CGA-TCT-GGG-CTC-TGT-GTT-CTC 3'
Sea-Reverse Primer	5' AGC-CCA-CGT-TGT-GTT-GTG 3'
Thai-Forward Primer	5' GAC-CAT-TCC-TCA-GCG-TGG-GTG 3'
Thai-Reverse Primer	5' CAA-GTG-GGC-TGA-GCC-CTT-GAG 3'

3.3.7 ขั้นตอนการตรวจหา β-thalassemia โดยเทคนิค DNA sequencing

การศึกษานี้ได้ตรวจหาความผิดปกติของยีน β-globin โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน β-globin ตามปฏิกิริยาที่แสดงในตารางที่ 6 โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำ PCR amplification ดังแสดงในตารางที่ 7 หลังจากเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเสร็จแล้วตัวอย่างดีเอ็นเอได้ถูกส่งตรวจ DNA sequencing (First Base DNA Sequencing services, First Base Laboratories, Malaysia) เนื่องจากขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดประมาณ 2200bp ซึ่งถือว่ามีขนาดใหญ่ดังนั้นการส่งตรวจ DNA sequencing จึงต้องใช้ไพร์เมอร์เพิ่มอีก เส้น 1 ที่มีชื่อว่า China 3 ที่แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับใช้ตรวจหา β-thalassemia

No	สารเคมีที่ใช้	Master mix /1 Reaction(ไมโครลิตร)
01	P7 primer 10 µM	0.25 ไมโครลิตร
02	B4 primer 10 µM	0.25 ไมโครลิตร
03	PCR buffer 10 X	0.25 ไมโครลิตร
04	$MgCl_2$ 50 mM	1 ไมโครลิตร
05	dNTPs 10 mM	1 ไมโครลิตร
06	Tag polymerase	0.125 ไมโครลิตร
07	Total master mix	5.12 ไมโครลิตร
08	DW	15.88 ไมโครลิตร
09	DNA product	4 ไมโครลิตร

ตารางที่ 5 ขั้นตอน PCR amplification ที่ใช้ในการตรวจหา β-thalassemia

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
pre-denature	95 °C	นาที
Denature	94°C	วินาที
Annealing	60°C	วินาที
Extension	72°C	1 นาที 15 วินาที
การทำ PCR amplification ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ		
post extension	72°C	15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 6 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจหา β-thalassemia

ชื่อ ไพร์เมอร์	ลำดับเบส
P7- Forward primer	5' TCC-TAA-GCC-AGT-GCC-AGA-A 3'
B4- Reverse Primer	5' CAC-TGA-CCT-CCC-ACA-TTC-CCT-TTT 3'
China 3-Reverse primer	5'GTG-TAC-ACA-TAT-TGA-CCA-AA 3'

3.4 การตรวจฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงโดยใช้เทคนิค Real-time PCR with high-resolution melting (HRM) analysis

การศึกษานี้ได้ตรวจหายีนคอนสแตนท์สปริงโดยเทคนิค Real-time PCR with high-resolution melting (HRM) analysis โดยเริ่มจากการเพิ่มปริมาณยีนแอลฟ่า 2 โกลบินที่ครอบคลุมตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงด้วยเทคนิค Real time PCR โดยใช้ชุดน้ำยามาตรฐาน (SYBR® Select Master Mix for CFX, Applied Bio systems, USA) และใช้ไพร์เมอร์ จำนวน เส้นได้แก่ 2

1. Forward primer ที่มีลำดับเบสเป็น (5'CCGCACTGACCCTCTTCTCTG3')
2. Reverse primer ลำดับเบส (5'CACCGGCCCTTCC3')

ดังส่วนประกอบของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 9 ปฏิกิริยา Real time PCR และ HRM analysis ทำโดยใช้เครื่อง CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) ตามโปรแกรมแสดงในตารางที่ 10 การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างควบคุมยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง 3 ตัวอย่างคือ ตัวอย่างที่ 1 ตัวควบคุมผลบวก (positive control) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จาก Heterozygous Constant Spring ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) และ Homozygous Constant Spring ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha^{CS}\alpha$) และตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control) ซึ่งใช้ DNA ที่สกัดได้จากคนที่มียีนปกติ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) ที่ได้ผ่านการตรวจยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงด้วยเทคนิค DNA Sequencing การตรวจหาความผิดปกติของยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis™ Software (Bio-Rad, USA) โดยเปรียบเทียบกราฟของ melt peak เทียบกับผลของตัวอย่างควบคุม ซึ่งสามารถแยก peak ของ Heterozygous CS, Homozygous CS และ คนปกติ ออกจากกันได้อย่างชัดเจนตามความแตกต่างของค่า Tm ตัวอย่างทุกตัวอย่างที่ตรวจพบ peak ของยีนฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง ได้ถูกส่งตรวจยืนยันผลโดยการอ่านลาดับนิวคลีโอ

ไทด์เบสด้วยเทคนิค DNA Sequencing (First Base DNA Sequencing services, First Base Laboratories, Malaysia) โดยใช้ทั้งไพร์เมอร์ทั้ง Forward primer และ Reverse primer

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการ Reaction master mix

สารเคมีที่ใช้	Master mix /Reaction	ความเข้มข้นสุดท้าย
SYBR Master mix 1X	10 ไมโครลิตร	1 x
Forward primer 5 µM	1 ไมโครลิตร	250 nM
Reverse primer 5 µM	1 ไมโครลิตร	250 nM
DNA template	2 ไมโครลิตร	≤200 ng/reaction
Water	6 ไมโครลิตร	Add to 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ 8 ขั้นตอน Real time PCR and HRM analysis สำหรับการตรวจหา HbCS gene

Step	Temperature, ^{0}C	Time	Number of cycles
Initial DNA denaturation	95	2 min	1
PCR cycling			
Denaturation	95	15 sec	40
Annealing/ Extension	60	1 min	
HRM analysis			
HRM (plate read)	75–95	5 sec/step	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลของค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของผลตรวจต่างๆ ใช้ โปรแกรม GraphPad Prism 5 ส่วนการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MCV, MCH และ Hb E ของธาลัสซีเมียกลุ่มต่างๆ ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Student T-test โดยใช้ค่าจากการคำนวนทางสถิติที่มีค่า *p value* ต่ำกว่า <0.05 ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการศึกษาวิจัย

4.1 ผลการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ

ตัวอย่างเลือดทั้งหมด 354 ราย ได้ถูกนำมาตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ โดยการทำ OF test และ DCIP test พบว่าอาสาสมัคร จำนวน 156 ราย คิดเป็นร้อยละ 44 ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองซึ่งประกอบด้วยผู้ชายจำนวน 54 ราย และผู้หญิงจำนวน 202 ราย หากแบ่งตามภูมิลำเนาที่อยู่อาศัยผู้ที่มียีนโกลบินผิดปกติมาจากภาคเหนือจำนวน 61 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.2 ภาคกลาง 72 รายคิดเป็นร้อยละ 20.3 และภาคใต้จำนวน 26 รายคิดเป็นร้อยละ 7.7 ในผู้ที่ให้ผลตรวจบวกต่อ OF test/DCIP test จำนวนทั้งหมด 156 ราย ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มที่ให้ผลบวกต่อ OF test และ DCIP test (+/+) จำนวน 103 ราย คิดเป็นร้อยละ 29.3 กลุ่มที่ให้ผลบวกต่อ OF test แต่ให้ผลลบต่อ DCIP test (+/-) จำนวน 25 รายคิดเป็นร้อยละ 7 กลุ่มที่ให้ผลลบต่อ OF test แต่ให้ผลบวกต่อ DCIP test (-/+) จำนวน 17 รายคิดเป็นร้อยละ 4.8 ในกลุ่มผู้ที่ให้ผลตรวจ OF test และ DCIP test เป็นลบ (-/-) จำนวน 198 ราย ได้ถูกนำมาตรวจความผิดปกติในระดับยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งพบว่ามีความผิดปกติระดับยีนจำนวน 11 ราย ส่วนอีก 187 รายเป็นคนที่มียีนโกลบินปกติ ซึ่งอิงใส่ค่าผลตรวจ CBC ควบคู่กับการจัดเรียงเพื่อแบ่งกลุ่มตามผลการตรวจคัดกรอง ดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งพบว่าผู้ที่มีผลตรวจคัดกรองที่ให้ผลบวกจะมี ค่าเฉลี่ย MCV < 80 fl, MCH < 26 pg

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของผลตรวจ Complete Blood Count ในกลุ่มอาสาสมัครแบ่งตามผลตรวจคัดกรอง

OF/DCIP 354	Hct % (35-48)	Hb(g/dl) (12-18)	MCV (fl) (>85-94)	MCH (pg) (>28-33)	MCHC(g/dl) (>22-36)	RDW % 11-15
+/+ (103)	38.1 (4.8)	12.5 (1.7)	72 (8.9)	23.6 (2.9)	32.5 (1.6)	14.8 (2)
+/- (25)	39 (8.1)	12.7 (2.8)	72.3 (7.6)	23.6 (2.6)	31.5 (3.6)	14.7 (1.7)
-/+ (17)	40.7 (2.8)	13.6 (1.1)	77.3 (4.0)	25.3 (1.0)	34 (1.1)	13.4 (1.0)
-/- (198)						
-/- (11)	38.6 (4.6)	12.5 (1.4)	77.8 (6)	25.4 (2.6)	32.7 (1.1)	13.1 (1.1)
-/- (187)	39.3 (10)	12.9 (1.4)	85.5 (3.0)	28.2 (1.5)	28.2 (1.5)	14.5 (1.4)

4.2 ผลการตรวจยืนยันชนิดย่อยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติโดยเทคนิค Hemoglobin typing และ พีซีอาร์

ตัวอย่างเลือดที่ผ่านการตรวจคัดกรองและตรวจ Complete Blood Count (CBC) แล้วได้ถูกนำไปตรวจยืนยันโดยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติโดยอาศัยหลักการ HPLC และตรวจความผิดปกติในระดับยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ดังนั้นจึงแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มด้วยกันคือ

กลุ่มที 1 จะเป็นกลุ่มที่ให้ผล OF/DCIP (+/+) มีทังหมดจำนวน 103 ราย ซึ่งในนั้นพบว่ามีผลบวกปลอมจำนวน 16 ราย ประกรอบด้วย Heterozygous α^0-thalassemia (SEA type) 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 6, Heterozygous β^0-thalassemia 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 3, ที่ประกอบด้วย ($\beta^{41/42}/\beta$) (-TTCT) 1 ราย (β^{17}/β) (A-T) 3 ราย และอีก 3 รายที่เป็น β^+ คือ Heterozygous β^+-thalassemia codon 136 (GGT-GAT) 1 ราย กับ IVSII codon 666 (C-T) polymorphism 2 ราย ดังแสดงตารางที 12

ส่วนที่ให้ผล OF/DCIP (+/+) มีจำนวน 87 ราย คิดเป็นร้อยละ 56 ประกอบด้วย Double heterozygous for Hb E (β^E/β^E) and α^o-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Double heterozygous for Hb E (β^E/β) and α^o-thalassemia (SEA type)

(−−^{SEA}/αα) 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 9, Double heterozygous of Hb E (β^E/β) and α^+-thalassemia (3.7 kb) (−$\alpha^{3.7}$/αα) 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.56, Double heterozygous of Hb E (β^E/β^E) and α^+-thalassemia (3.7 kb) (−$\alpha^{3.7}$/αα) 1 รายคิดเป็นร้อยละ 0.3, Hb H disease (−−^{SEA}/−$\alpha^{3.7\ or\ 4.2}$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Double homozygous of Hb E (β^E/β) and (α^+-thalassemia)(3.7 kb) (−$\alpha^{3.7}$/−$\alpha^{3.7}$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Double heterozygous of Hb E(β^E/β) and α^+-thalassemia(4.2 kb)(−$\alpha^{4.2}$/αα) 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Compound heterozygous of Hb Constant Spring and α^o-thalassemia (SEA type) (−−^{SEA} /α^{CS}α) 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Hb H Constant Spring disease 1 รายคิดเป็นร้อยละ 0.3, Heterozygotes E จำนวน 52 ราย คิดเป็นร้อยละ 33, Homozygous Hb E 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.2 ดังตารางต่อเนื่องที่ 13

กลุ่มที 2 เป็นกลุ่มที่ให้ผล OF/DCIP (+/-) มีจำนวน 25 ราย คิดเป็นร้อยละ 16 ซึ่งประกอบด้วย Heterozygote β^o-thalassemia (β^{17}/β) Codon 17 (A-T) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3, Heterozygote β^o-thalassemia ($\beta^{41/42}$/β) (-TTCT) 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 2, Heterozygous α^o-thalassemia (SEA type) 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 4, Heterozygous α^+-thalassemia (3.7 kb) 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 7, Homozygous α^+-thalassemia (3.7 kb) มีจำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 2 ,และ Uncharacterized Hb variant 1 รายคิดเป็นร้อยละ 0.3 ที่แสดงในตารางที่ 14

กลุ่มที 3 เป็นกลุ่มที่ให้ผล OF/DCIP (-/+) จำนวน 17 ราย ซึ่งกลุ่มนี้พบผลบวกปลอมร่วมกับลบปลอมมีจำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6 คือ Compound heterozygous of Hb Constant Spring and α^+-thalassemia (3.7 kb) (−$\alpha^{3.7}$/α^{CS}), Heterozygote Hb E (β^E/β) 1 รายคิดเป็นร้อยละ 0.3 , Double heterozygous of Hb E (β^E/β) and α^+thalassemia (3.7 kb) (−$\alpha^{3.7}$/αα), Heterozygote Hb E (β^E/β) 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 8, Double heterozygous of Hb E (β^E/β) and α^+thalassemia (3.7 kb) (−$\alpha^{3.7}$/αα) 1 รายคิดเป็นร้อยละ 0.3, Double heterozygous of Hb E (β^E/β) and α^o-thalassemia (SEA type) (−−^{SEA}/αα) 1 รายคิดเป็นร้อยละ, Double heterozygous for Hb E (β^E/β) and Hb constant Spring (α^{CS}α/αα(1 รายคิดเป็นร้อยละ ดังแสดงในตารางที่ 15

กลุ่มที 4 ที่ให้ผล OF/DCIP (-/-) มีจำนวน 11 ราย ที่ให้ผลลบปลอมซึ่งประกอบด้วย Heterozygous α^+-thalassemia (3.7 kb) มี 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.56, Heterozygous α^+-thalassemia (4.2 kb) อีก 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Heterozygous α^o-thalassemia (SEA type)

2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3, Compound heterozygous of Hb Constant Spring and α^{+}-thalassemia (3.7 kb) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3 และ สุดท้าย Heterozygous β^{+}-thalassemia Codon 136 (GGT-GAT) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3 ดังแสดงในตารางที่ 16

จากผลการศึกษาหาความผิดปกติของยีนในแต่ระเทคนิคที่ได้กล่าวในเบื้องต้นนั้นสามารถตรวจพบชนิดย่อยของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ในประชากรลาวที่มีจีโนไทป์ผิดปกติด้วยกันทั้งหมดมีจำนวน 22 ชนิด แต่ระชนิดนั้นที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นสายย่อยต่างๆ ได้โดยเริ่มจากความชุกที่เป็นสาย α-globin มีจำนวน 46 ราย คิดเป็นร้อยละ 13 และความผิดปกติของยีนที่เป็นสาย β-globin จำนวน 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.1 พาหะฮีโมโกลบิน อี (E-trait) จำนวน 64 ราย คิดเป็นร้อยละ 18 พบพาหะโฮโมซัยกัสฮีโมโกลบิน อี 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.4 และ ความผิดปกติร่วมกันระหว่างสาย α-globin กับสาย β-globin มีจำนวน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 8.4 สุดท้ายเป็น Uncharacterized Hb variant มีจำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3 ดังแสดงในตารางที่ 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 10 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง DCIP ให้บวกปลอม OF/DCIP (+/+), ผล Hb typing และ ผล PCR

OF/DCIP (+/+) 16	Hct % (35-48)%	Hbg/dl (12-18)	MCV(fl) (85-94)	MCH(pg) (28-33)	MCHCg/dl (22-36)	RDW % 11-15	Hb typing	HbA2(E) %	Hb F %	Hb A %	**Genotype สาย (α)**	**Genotype สาย (β)**	**Interpretation**
9	37.8 (4.5)	**11.7 (2)**	67.4 (6.6)	20.7 (2.4)	30.8 (2.8)	17.5 (3.5)	A2A	2.2 (0.6)	0.3 (0.1)	88 (2.4)	$(--^{SEA}/\alpha\alpha)$	(β/β)	Heterozygotes α^{o}-thalassemia (SEA type)
1	38	12.3	57.9	18.6	32.3	17.2	A2A	5.9	1.3	82.7	$(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$	$(\beta^{41/42}/\beta)$	Heterozygous β°-thalassemia $(\beta^{41/42}/\beta)$ (-TTCT)
1	39.4	12.7	70.7	22.7	32.2	15.5	A2A	5.0	1.6	82.6	$(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$	Codon 136 (GGT-GAT)	Heterozygous β^{+}-thalassemia (β^{+}/β) 136 (GGT-GAT)
2	31.3, 34.9	10, 11.3	54.9,77.6	17.5,25.1	32, 32.3	18, 12.8	A2A	5, 2	0.8, 0.2	84, 63.4	$(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$	Ivs2666 poly morphism	Heterozygous β^{+}-thalassemia (β^{+}/β)(IVSII 666(C-T) polymorphism)
3	34.3 (6.7)	10.6 (0.6)	19 (2.1)	19 (1)	31 (1.5)	15.4 (1)	A2A	6.4	1.7	81.9	$(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$	$(\beta 17/\beta A)$	Heterozygous β°-thalassemia (β^{17}/β)(A-T)

ตารางที่ 11 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP (+/+), ผล Hb typing และ ผล PCR

OF/DCIP (+/+) 87	Hct % (35-48)%	Hbg/dl (12-18)	MCV(fl) (85-94)	MCH(pg) (28-33)	MCHC g/dl (22-36)	RDW % 11-15	Hb typing	HbA2(E) %	Hb F %	Hb A %	**Genotype สาย (α)**	**Genotype สาย (β)**	**Interpretation**
2	34.7, 35	11.4, 12	63, 65	21, 22	33, 34	16, 17	EE	77.2, 76	23, 41.3	63.5, 73	($__^{SEA}/\alpha\alpha$)	(β^E/β^E)	Double heterozygous for Hb E and α^o-thalassemia (SEA type)
14	37 (2.4)	12 (0.7)	70 (2.8)	23 (1)	32 (0.6)	15 (0.6)	EA	19 (2.2)	1 (0.4)	69(3)	($__^{SEA}/\alpha\alpha$)	(β^E/β)	Double heterozygous for Hb E and α^o-thalassemia (SEA type)
4	39 (4.8)	13 (1.4)	60 (28)	24 (1.4)	33 (0.4)	14.5 (1)	EA	25 (1.5)	1.5 (1.5)	63 (2.1)	($_\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	(β^E/β)	Double heterozygous of Hb E and α^+-thalassemia (3.7 kb)
2	37, 30.5	11.2, 8	58.5, 73	17.6, 19	30.2, 26	22.2, 25	A2A Bart'H	1.8	0.2	91.1	($__^{SEA}/_\alpha^{3.7 \text{ or } 4.2}$)	(β/β)	Hb H disease
1	32.1	10.8	66.1	22.2	33.6	16.5	EE	79.5	1.0	63.1	($_\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	(β^E/β^E)	Double homozygous for Hb E and α^+-thalassemia (3.7 kb)
5	34 (2.7)	11.4 (2)	59 (3.7)	20.2 (2.5)	33.5 (1)	17 (1.5)	EE	79.4 (1.2)	3.1 (2.7)	69 (1)	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	(β^E/β^E)	Homozygous Hb E
2	37, 40.8	13.5, 12	68.3, 71	23, 27.3	32.2, 32.5	14.3, 14	EA	19, 21	0.8, 1.2	69, 68.2	($_\alpha^{3.7}/_\alpha^{3.7}$)	(β^E/β)	Double homozygous of Hb E and α^+-thalassemia (3.7 kb)
2	**33, 39.6**	**11, 13.2**	70, 82.1	23, 27.3	33, 33.3	15, 14	EA	26.5, 25	0.8, 1.7	60.6, 63	($_\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)	(β^E/β)	Double heterozygous of Hb E and α^+-thalassemia (4.2 kb)
52	**38.8 (4.6)**	**12.8 (1.5)**	75.7 (3.4)	24.8 (1.8)	32.8 (0.8)	14 (0.8)	EA	25.6 (1.5)	1 (0.6)	62 (2)	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	(β^E/β)	Heterozygotes E
1	28.3	10	59.8	21.6	32.8	21.4	CS A2A Bart'H	0.7	0.4	91.7	($__/\alpha^{CS}\alpha$)	(β/β)	Hb H constant Spring disease
2	**33.5, 28.3**	**8.2, 8.4**	77.6, 63	19, 19	24, 29	21, 16	CS A2A Bart'H	1.3, 1	0.1, 0.5	93, 91	($__^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$)	(β/β)	Compound heterozygous of Hb Constant Spring and α^o-thalassemia (SEA type)

ตารางที่ 12 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP (+/-), ผล Hb typing และ ผล PCR

OF/DCIP (+/-) 25	Hct % (35-48)	Hbg/dl (12-18)	MCV(fl) (85-94)	MCH (pg) (28-33)	MCHC(g/dl) (22-36)	RDW % (11-15)	Hb typing	HbA2(E)% 0.6±0.43	Hb F % 74±0.43	Hb A % 17±6.32	**Genotype สาย (α)**	**Genotype สาย(β)**	**Interpretation**
1	34.8	11.5	68.6	22.6	33	15.4	A2A	5.1	2.6	79.6	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)		Uncharacterized Hb variant
1	36.5	11.3	68	21.9	30.3	15.1	A2A	4.8	0.7	84.7	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	β^{17}/β	heterozygote β°-thalassemia (β^{17}/β) Codon 17 (A-T)
3	35.5 (1.3)	11.7 (0.4)	66.4 (5.3)	22 (0)	26 (10.1)	15.2 (0.5	A2A	5.5 (0.1)	1.3 (1.2)	83.2 (1.2)	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	$\beta^{41/42}/\beta$	heterozygote β°-thalassemia ($\beta^{41/42}/\beta$) (Codon 41/42 (-TTCT)
6	44.3 (14.5)	14.4 (5.28)	68.4 (7.1)	23 (3.7)	32.3 (1.2)	14.8 (1.2)	A2A	2.3 (0.1)	0.3 (0.1)	87.6 (0.5)	($__^{SEA}/\alpha\alpha$)	β/β	Heterozygous α°-thalassemia (SEA type)
11	39.1 (4.3)	12.8 (1.5)	79.2 (1)	25.7 (1)	32.4 (0.6)	13.8 (1)	A2A	2.6(0.2)	0.4(0.1)	87.3 (0.6)	($_\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	β/β	Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb)
3	36.5 (4.9)	11.6 (1.6)	67.1 (1.4)	21 (0.6)	31.5(0.2)	15 (0.4)	A2A	2.5(0.2)	1(1)	86.4 (0.7)	($_\alpha^{3.7}/_\alpha^{3.7}$)	β/β	Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb)

ตารางที่ 13 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP(-/+), ผล Hb typing และ ผล PCR

OF/DCIP (-/+) 17	Hct % 35-48	Hbg/dl 12-18	MCV(fl) 85-94	MCH(pg) 28-33	MCHC g/dl 22-36	RDW % 11-15	Hb typing	HbA2(E)%	Hb F %	Hb A %	**Genotype สาย(α)**	**Genotype สาย(β)**	**Interpretation**
12	40 (2.4)	13.5 (0.7)	77.3 (3.9)	25.2 (1.1)	33 (1.1)	13.4 (1.1)	EA	22.1 (8.7)	0.7 (0.6)	66.2 (10.0)	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	β^E/β	Heterozygote Hb E (β^E/β)
2	45.7, 39.2	15.1, 12.5	79, 81.1	26, 26	31.8	13, 14	A2A	2.8, 2.7	0.2, 0.3	86, 87.6	($_\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$)	β/β	Compound heterozygous of Hb constant spring and α^+-thalassemia (3.7 kb) ($_\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$)
1	41.1	12	76.5	25.1	34.6	13.6	EA	24.6	0.5	63.7	($_\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	β^E/β	Double heterozygous of Hb E (β^E/β) and α^+thalassemia (3.7 kb)($_\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)
1	41	11	70	24	32	13	EA	26.4	0.4	62.1	($__^{SEA}/\alpha\alpha$)	β^E/β	Double heterozygous of Hb E (β^E/β) and α^o-thalassemia (SEA type) ($__^{SEA}/\alpha\alpha$)
1	46.2	14.8	80.1	25.6	32	13.9	EA	26.4	4.2	59.6	($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$)	β^E/β	Double heterozygous for Hb E (β^E/β) and Hb constant Spring ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$)

ตารางที่ 14 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางโลหิตวิทยาที่นำมาใช้ร่วมกับผลการตรวจคัดกรอง OF/DCIP(-/-), ผล Hb typing และ ผล PCR

OF/DCIP (-/-) 11	Hct % 35-48	Hbg/dl 12-18	MCV(fl) 85-94	MCH(pg) 28-33	MCHC g/dl 22-36	RDW % 11-15	Hb typing	HbA2(E)% 0.6±0.43	Hb F % 74±0.43	Hb A % 17±6.32	**Genotype สาย (α)**	**Genotype สาย (β)**	**Interpretation**
4	42.7 (4.2)	13.7 (1.6)	82.2 (2.4)	26.6 (0.4)	32.7 (0.4)	12.4 (0.2)	A2A	2.6 (0.2)	0.4 (0.3)	87.6(0.6)	($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	(β/β)	Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb)
2	32.3, 36.8	10.8, 11.5	81.1, 65.2	27, 20.3	33.4, 31.2	13, 15.2	A2A	3.2, 2.6	0.4, 0.7	89.3, 87.4	($--^{SEA}/\alpha\alpha$)	(β/β)	Heterozygous α°-thalassemia (SEA type)
1	34	12.2	73.7	22.9	31.2	14.2	A2A	2.8	0.4	88.2	($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$)	(β/β)	Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb)
1	**35.3**	**11.3**	72.4	23.1	32	13.6	A2A	1.6	0.5	88	($-\alpha^{3.7}/\alpha^{CS}\alpha$)	(β/β)	Compound heterozygous of Hb constant spring and α^{+}-thalassemia (3.7 kb)
2	**42.1, 38.5**	**14.7, 12.7**	84.1, 76	29.3, 25	34.9, 32.9	11.9, 14	A2A	2.7, 2.6	0.4, 0.4	87.5, 86.8	($\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)	(β/β)	Heterozygous α^{+}-thalassemia (4.2 kb)
1	**35.4**	**12.1**	79.1	27	34.1	12	A2A+abnormal Hb	2.9	0.5	47.7	($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	β^{+}/β	Heterozygous β^{+}- thalassemia Codon 136 (GGT-GAT)

ตารางที่ 15 สรุปชนิดย่อยของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหมดจำนวน 156 ราย

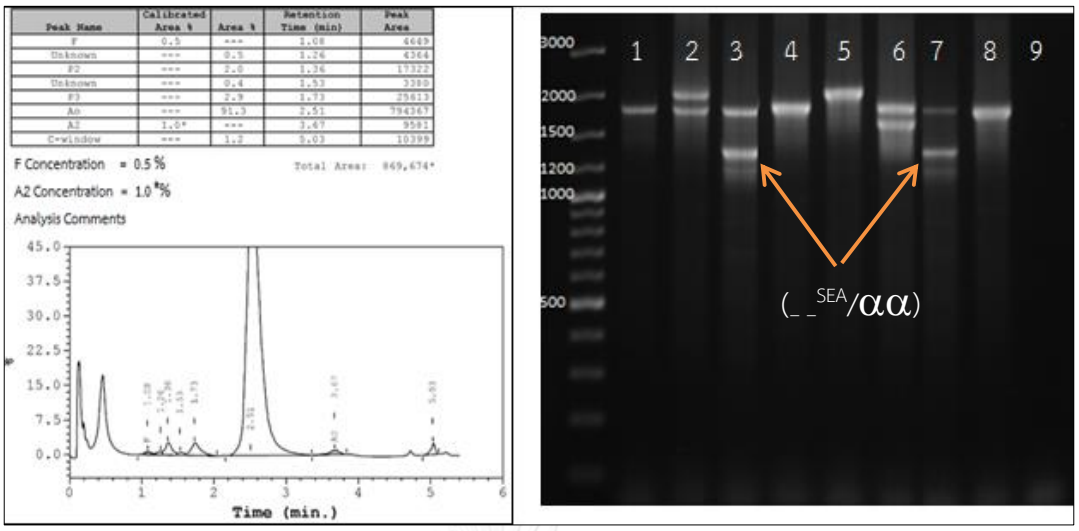
N	Genotypes	Values
1	Heterozygous α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$)	17 (5%)
2	Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	15 (4.2%)
3	Heterozygous α^{+}-thalassemia (4.2 kb)($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)	2 (0.6%)
4	Hb H-constant Spring disease ($--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$)	2 (0.6%)
5	Hb H disease ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7 \text{ or } 4.2}$)	2 (0.6%)
6	Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb)($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$)	4 (1.1%)
7	Hb H-constant Spring disease /($-\alpha^{CS}\alpha$)	1 (0.3%)
8	Compound heterozygous of Hb constant spring and α^{+}-thalassemia (3.7 kb)($\alpha^{CS}\alpha/-\alpha^{3.7}$)	3 (1.0%)
9	Heterozygous β^{+}-thalassemia (β^{+}/β)(IVSII Codon 666 C-T	2 (0.6%)
10	Heterozygous β^{+}-thalassemia (β^{+}/β) (codon 136 (GGT-GAT)	2 (0.6%)
11	Heterozygous β^{0}-thalassemia ($\beta^{41/42}/\beta$) (-TTCT)	4 (1.1%)
12	Heterozygous β^{0}-thalassemia (β^{17}/β) Codon 17 (A-T)	4 (1.1%)
13	Heterozygote Hb E (β^{E}/β) (Codon 26, GAG⟶AAG) glutamic⟶lycine	64 (18%)
14	Homozygous Hb E (β^{E}/β^{E})	5 (1.4%)
15	Double heterozygotes for Hb E (β^{E}/β) and α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$)	15 (4.2%)
16	Double heterozygous for Hb E (β^{E}/β^{E}) and α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$)	2 (0.6%)
17	Double heterozygous for Hb E (β^{E}/β^{E}) and α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	1 (0.3%)
18	Double heterozygous for (β^{E}/β) and Hb constant Spring ($\alpha^{CS}/\alpha\alpha$)	1 (0.2%)
19	Double heterozygous of Hb E (β^{E}/β) and α^{+}-thalassemia(4.2 kb	2 (0.6%)
20	Double heterozygous of Hb (β^{E}/β) and α^{+}-thalassemia (3.7 kb)($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$)	5 (1.4%)
21	Double heterozygous of Hb (β^{E}/β) and α^{+}-thalassemia (3.7 kb)($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$)	2 (0.6%)
22	Uncharacterized Hb variant	1 (0.3%)
จำนวนรวมทั้งหมด		156 (45%)

Chulalongkorn University

4.3 อุบัติการณ์ของแอลฟ่าธาลัสซีเมีย

ในประชากรลาวกลุ่มนี้พบความผิดปกติของยีนที่เป็นสายแอลฟ่าโกลบินทั้งหมด 46 ราย คิดเป็นร้อยละ 13 ซึ่งประกอบด้วย Hb H disease ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7 \text{ or } 4.2}$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Hb H-constant Spring disease($--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6 รายซึ่งลักษณะผลไทปิ้งร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR สำหรับตรวจวิเคราะห์แอลฟ่า-ธาลัสซีเมียจากการทำ PCR product โดยนำไปรัน agarose gel electrophoresis ซึ่งจากภาพตัวอย่าง (เลนส์ที่3 และ 7) ดังแสดงในภาพที่ 8, นอกนี้พบ Hb H Constant Spring disease ($--/\alpha^{CS}\alpha$) จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3 ในส่วนที่เป็นความผิดปกติของแอลฟ่า-ธาลัสซีเมีย 1 (α-thalassemia 1) โดยเฉพาะ Heterozygous α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) มีจำนวน 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 5 ลักษณะผล Hb typingร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR สำหรับตรวจวิเคราะห์แอลฟ่า-ธาลัสซีเมียจากการทำ PCR product โดยวิธีรัน agarose gel electrophoresis ซึ่งจากภาพตัวอย่างเลนส์ที่ (3 และ 6) ดังแสดงใน ภาพที่ 9, นอกนั้นยังมี α-thalassemia 2 Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) จำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.2 ลักษณะผลHb typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR สำหรับตรวจวิเคราะห์แอลฟ่า-ธาลัสซีเมียจากการทำ PCR product โดยวิธีรัน agarose gel electrophoresis ซึ่งให้ผลจากการทำ Multiplex Gap- PCR ที่พบ Heterozygous α^{+}-thalassemia (4.2 kb) ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6 มี Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.1 เหล่านี้เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

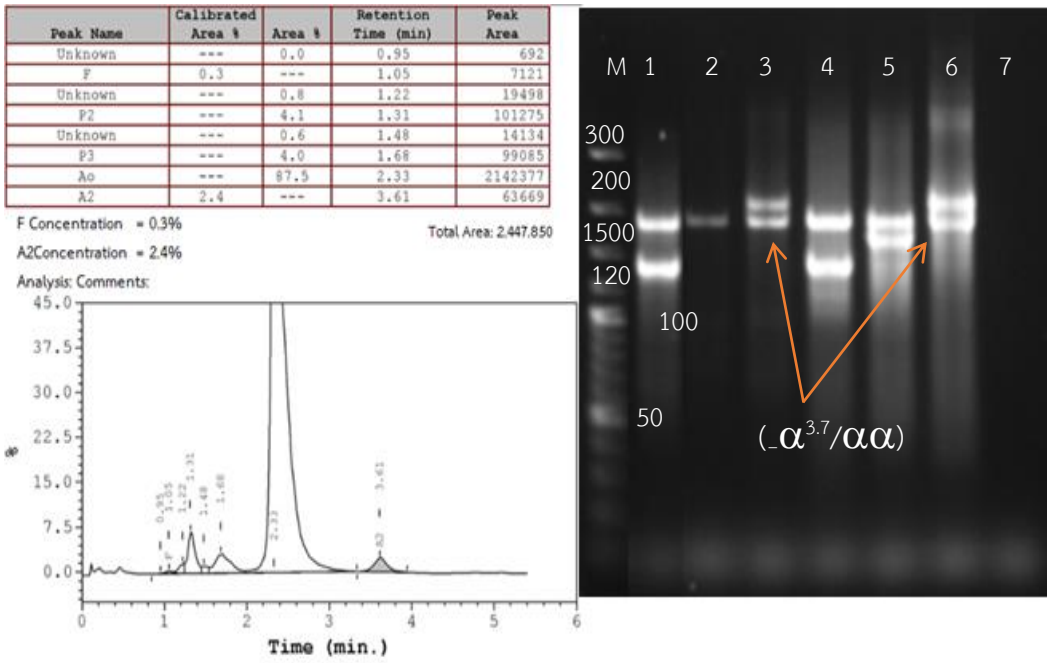


ภาพที่ 8 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล Hb H Constant Spring disease (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha^{CS}\alpha$) ดังเลนส์ที่ 3 และ 7

1= (αα/αα), 2= ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), 3= ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), 4= (αα/αα), 5= ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$)

6= ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$), 7= ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), 8= (αα/αα), 9= normal control

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.0	0.95	692
F	0.3	---	1.05	7121
Unknown	---	0.8	1.22	19498
P2	---	4.1	1.31	101275
Unknown	---	0.6	1.48	14134
P3	---	4.0	1.68	99085
Ao	---	87.5	2.33	2142377
A2	2.4	---	3.61	63669

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (เลนส์ที่ 3 และ 6)

1= ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), 2= ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), 3= ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), 4= ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), 5= ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$)

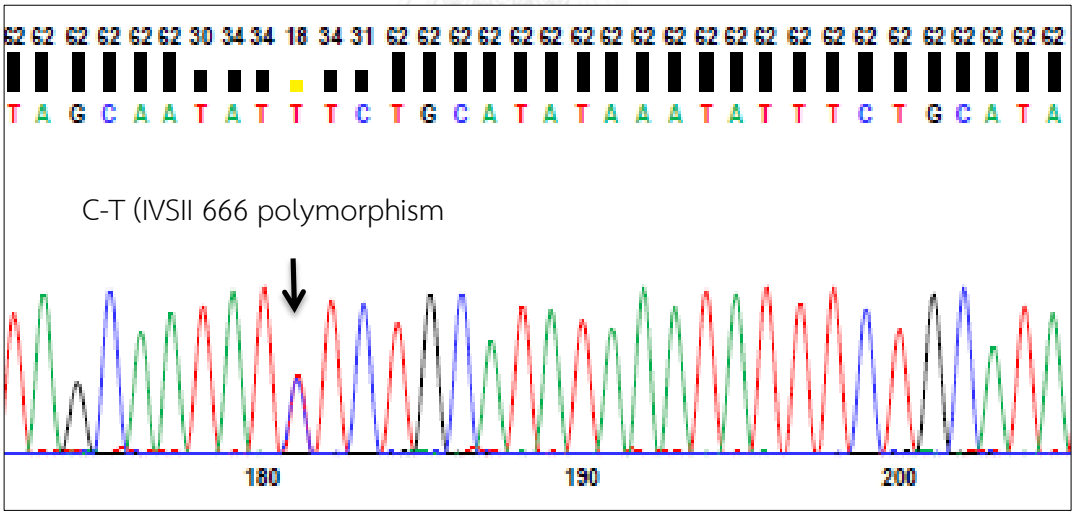
6= ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), 7=normal

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

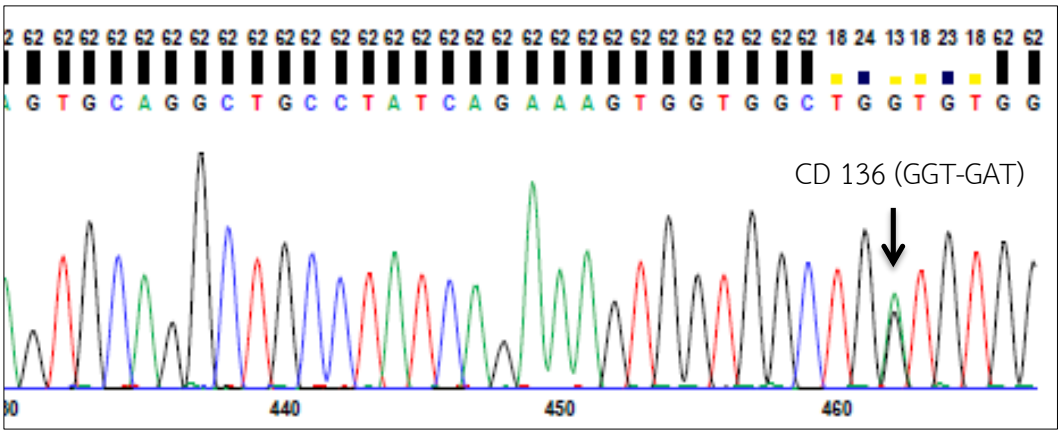
4.4 อุบัติการณ์ของเบต้าธาลัสซีเมีย

ในประชากรลาวกลุ่มนี้พบความผิดปกติของสายเบต้าโกลบินทั้งหมด.80 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.6 ซึ่งประกอบด้วย Heterozygous β^{+}-thalassemia (β^{+}/β) (IVS2codon 666 (C-T) polymorphism) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6 Heterozygous β^{+}-thalassemia (β^{+}/β) Codon 136 (GGT-GAT) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6 ยังมี β^{0}-thalassemia จำนวน 8 ราย ซึ่งประกอบด้วย Heterozygous β^{0}-thalassemia ($\beta^{41/42}/\beta$) (-TTCT) จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.1 และ Heterozygous β^{0}-thalassemia (β^{17}/β) (A-T) จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.1 ยังมีความผิดปกติของ Heterozygote Hb E (β^{E}/β) (Codon 26, GAG⟶AAG) glutamic⟶lycine จำนวน 64 ราย คิดเป็นร้อยละ 19 , Homozygous Hb E (β^{E}/β^{E}) จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.4 และ Uncharacterized Hb variant จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6

ซึ่งผลตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินและผลตรวจยีนเบต้าธาลัสซีเมียโดยเทคนิค DNA Sequencing แสดงในภาพที่ 10 และภาพที่ 11



ภาพที่ 10 Chromatogram ในรูปแบบ DNA Sequencing ที่แสดงถึงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนโดยตำแหน่งของลำดับเบสที่พบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ชี้ให้เห็นตามลูกศรในภาพที่เปลี่ยนจาก C-T IVSII 666 polymorphism

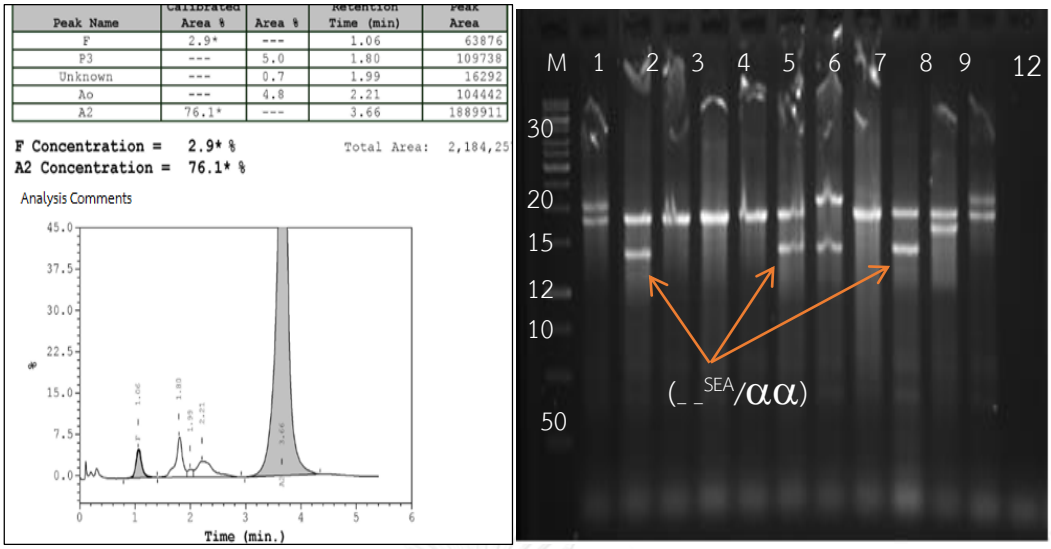


ภาพที่ 11 Chromatogram ในรูปแบบ DNA Sequencing ที่แสดงถึงลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนโดยตำแหน่งของลำดับเบสที่พบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ชี้ให้เห็นตามลูกศรในภาพที่เปลี่ยนจาก GGT-GAT ที่ตำแหน่ง CD 136

4.5 อุบัติการณ์ของความผิดปกติร่วมระหว่างแอลฟ่าและเบต้าธาลัสซีเมีย

ในประชากรลาวกลุ่มนี้พบความผิดปกติร่วมระหว่างสายแอลฟ่าและเบต้าโกลบินจำนวน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 45 ประกอบด้วย Double heterozygotes for Hb E (β^E/β) and α^o-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) จำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.2, Double heterozygous for Hb E (β^E/β^E) and α^o-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6 ที่แสดงใน (ภาพที่ 12), พบ Double heterozygous for Hb E (β^E/β^E) and α^+-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3, Double heterozygous for Hb E (β^E/β) and Hb constant Spring ($-\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3, Double heterozygous of Hb E (β^E/β) and α^+-thalassemia (4.2 kb) ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6, Double heterozygous of Hb (β^E/β) and α^+-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.2, Double heterozygous of Hb (β^E/β) and α^+-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.6 (ดังแสดงในภาพที่ 13)

Double heterozygous for Hb E (β^E/β) and α^o -thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) คิดเป็นร้อยละ 4.2 Double heterozygous β^+-thalassemia and α^+-thalassemia (3.7 kb), ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), ($\beta^E/\beta$) คิดเป็นร้อยละ 1.4, Double homozygous Hb E (β^E/β^E) and α^+-thalassemia (3.7kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) คิดเป็นร้อยละ 0.2 ซึ่งผลตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินและผลตรวจยีน แสดงใน ภาพที่ 13 และ



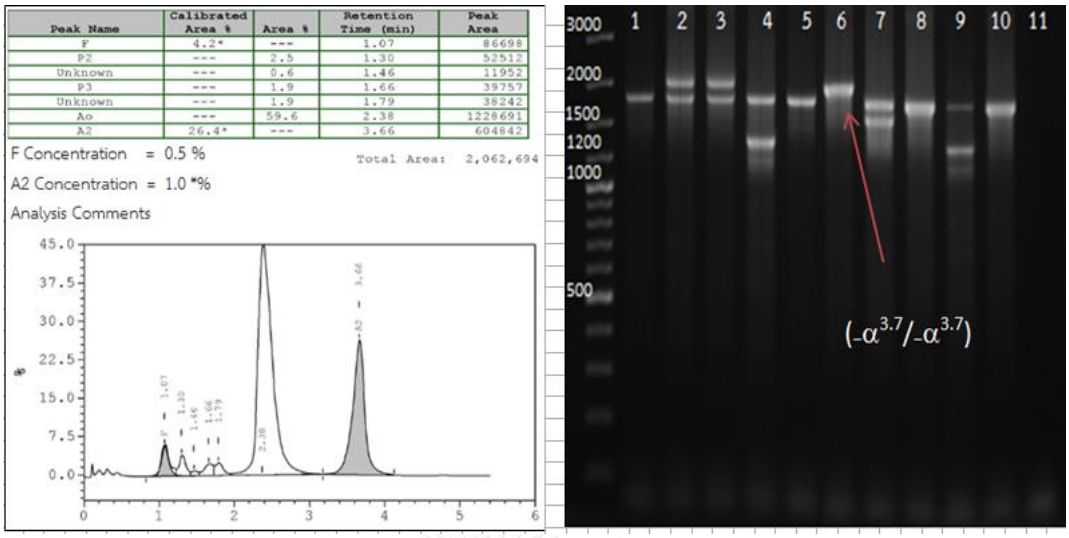
ภาพที่ 12 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล Double heterozygous for Hb E (β^{E}/β^{E}) and α^{o}-thalassemia (SEA type)(_ _^{SEA}/αα) (เลนส์ที่ 2 , 6 , 9

1= (-$\alpha^{3.7}$/αα), 2= (_ _^{SEA}/αα), 3= (αα/αα), 4= (αα/αα), 5= (αα/αα),

6= (_ _^{SEA}/αα), 7= Hb H disease, 8= (αα/αα), 9= (_ _^{SEA}/αα), 10= (-$\alpha^{4.2}$/αα),

11= (-$\alpha^{3.7}$/αα), 12= normal control

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะผล typing ร่วมกับผลการทำ Multiplex Gap-PCR ให้ผล ให้ผล Double heterozygous of Hb E (β^{E}/β) and α^{+}-thalassemia ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) เลนส์ที่ 6

1= ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), 2= ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), 3= ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$), 4= ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) 5= ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$),
6= ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$), 7= ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$), 8= ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), 9= ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) 10= ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$),
11= normal control

4.5 เปรียบเทียบผลตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC) และปริมาณฮีโมโกลบินในธาลัสซีเมียกลุ่มย่อยต่างๆ

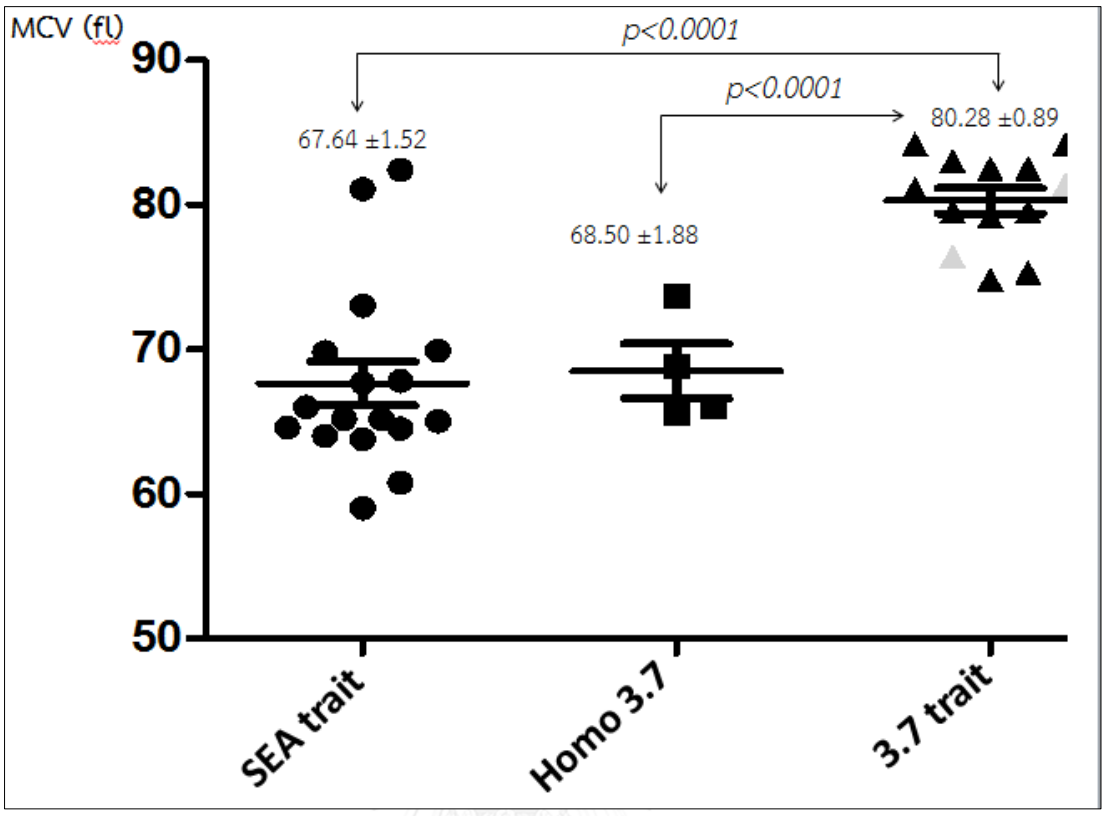
ผลการเปรียบเทียบค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงระหว่าง 3 กลุ่มที่เป็นค่าของ MCV ในกลุ่มที่ให้ผล Heterozygous α^{o}-thalassemia SEA type ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) กับกลุ่ม Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) และกลุ่ม Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb)($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) พบว่าค่า MCV ของกลุ่ม Heterozygous α^{o}-thalassemia (SEA type) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนการเปรียบเทียบค่า MCV ระหว่าง Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) และกลุ่ม Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) พบว่าค่า MCV กลุ่ม Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เช่นกัน ดังแสดงในภาพที 14

การเปรียบเทียบค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง MCH ประกอบด้วย 3 กลุ่มด้วยกัน Heterozygous α^{o}-thalassemia SEA type ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) กับกลุ่ม Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) และกลุ่ม Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) พบว่าค่า MCH ของกลุ่ม Heterozygous α^{o}-thalassemia (SEA type) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนการเปรียบเทียบค่า MCH ระหว่าง Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) และกลุ่ม Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) พบว่าค่า MCH กลุ่ม Homozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที 15

กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มของ HbA2 (E) มี 3 กลุ่มด้วยกัน Double heterozygotes for Hb E (β^{E}/β) and α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) กับกลุ่ม Double Double heterozygotes for Hb E (β^{E}/β) and α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) of Hb (β^{E}/β) and α^{+}-thalassemia (3.7kb) ($-\alpha/^{3.7}\alpha\alpha$) และกลุ่มที่ให้ผลเป็น Heterozygote Hb E ซึ่งสามารถบอกได้ว่า Double heterozygotes for Hb E (β^{E}/β) and α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) มีค่า *p* value น้อยกว่ากลุ่ม Double heterozygous of Hb (β^{E}/β) and α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha/^{3.7}\alpha\alpha$) อย่างมีนัยสำคัญคือ ($p<0.05$)

การเปรียบเทียบอีกแบบระหว่างที่เป็น Double heterozygotes for Hb E (β^{E}/β) and α^{o}-thalassemia (SEA type) ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) กับกลุ่ม Heterozygote Hb E ก็พบว่ามีค่า (*p<0.0001*) นั้นเห็นว่ามีมีความแตกต่างอย่างมีอย่างมีนัยสำคัญคือ (*p<0.05*) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติเหมือนกันคือ ดังภาพที 16

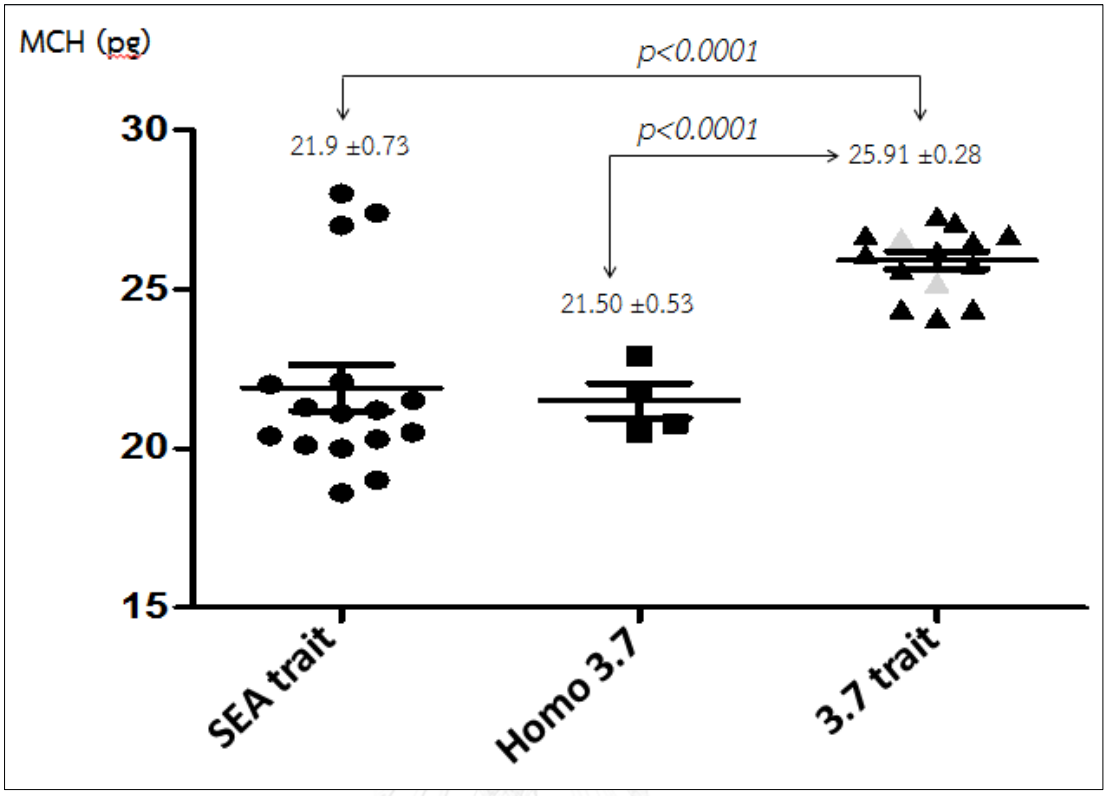
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 14 แสดงถึงกานเปรียบเทียบค่า MCV ละหว่าง 3 กลุ่มตัวอย่าง SEA trait, Homo 3.7 kb and 3.7 trait

จากการเปรียบเทียบระหว่าง SEA type 3.7 trait พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติซึ่ง *p* value<0001 และ Homozygous 3.7 และ 3.7 trait ก็มีความแตกต่างเหมือนกัน

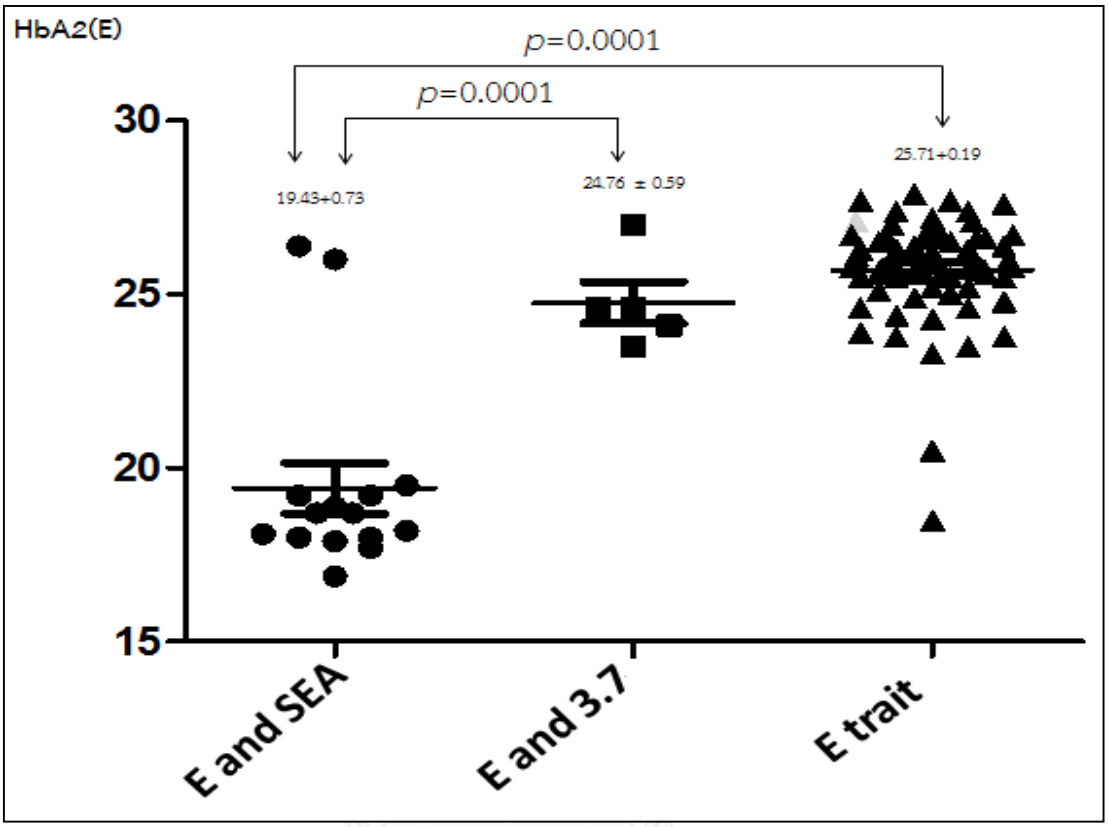
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 15 แสดงถึงเปรียบเทียบค่า MCH ระหว่าง 3 กลุ่มตัวอย่าง SEA trait , Homozygous 3.7 kb และ Heterozygous 3.7 kb

จากการเปรียบเทียบระหว่าง ค่า (MCH) ที่เป็นผล SEA trait กับ 3.7 trait พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติซึ่ง *p* value<0001 และ Homozygous 3.7 และ 3.7 trait ก็มีความแตกต่างเหมือนกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



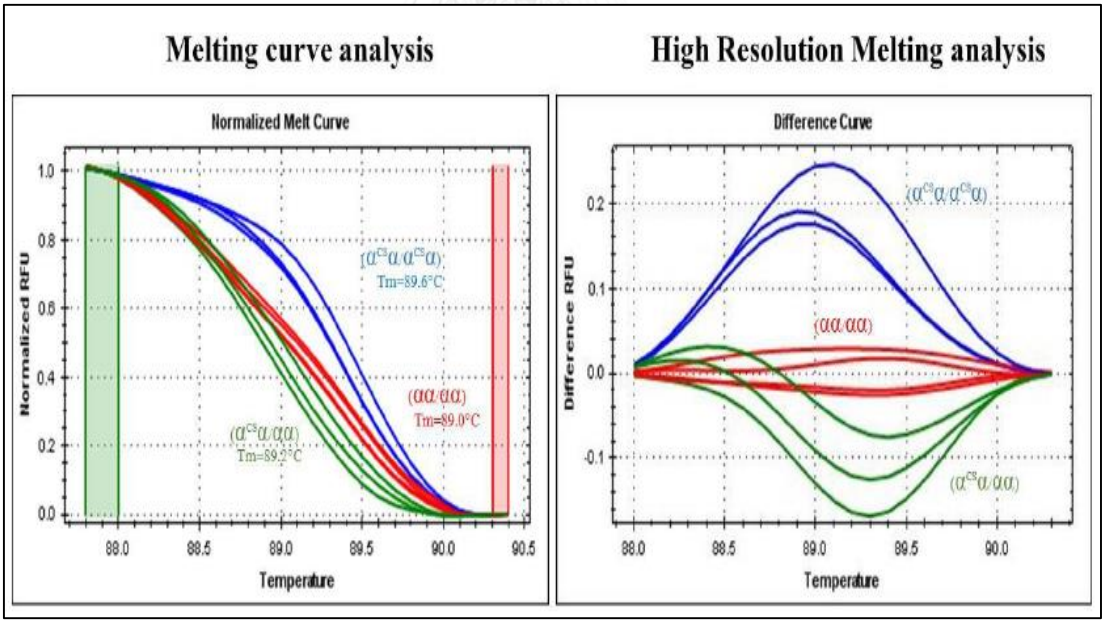
ภาพที่ 16 แสดงถึงเปรียบเทียบค่า HbA2 (E) ระหว่าง 3 กลุ่มตัวอย่าง E and SEA trait , E and Heterozygous 3.7 kb และ E trait

จากการเปรียบเทียบระหว่าง ค่า (HbA2) ที่เป็นผล ร่วมกันของ SEA trait กับ E trait เทียบกับ 3.7 trait ร่วมกับ E trait พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติซึ่ง *p* value<0001 และ Homozygous 3.7 และ 3.7 trait ก็มีความแตกต่างเหมือนกัน

4.6 อุบัติการณ์การเกิดร่วมระหว่างพาหะฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงและธาลัสซีเมียชนิดอื่น

การศึกษานี้ทำการตรวจยีนคอนสแตนท์สปริงในกลุ่มอาสาสมัครลาวที่มียีนธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหมด 120 รายโดยเทคนิค HRM analysis กลุ่มตัวอย่างนี้ได้ผ่านการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ตามผลตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินและผลตรวจระดับยีนและทราบจีโนไทป์เรียบร้อยแล้ว ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 8 ผลการตรวจยีนคอนสแตนท์สปริง

โดยเทคนิค HRM analysis พบว่า Melt peak ในผู้ที่มียีน Heterozygous Constant Spring ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) ผู้ที่มียีน Homozygous Constant Spring ($\alpha^{CS}\alpha/(\alpha^{CS}\alpha)$ และคนปกติ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) จะมีค่า Tm ต่างกันดังแสดงในภาพที่ 13 ทำให้เมื่อแสดงผลกราฟโดยใช้ค่า Difference Relative Fluorescence unit เทียบกับค่า Tm สามารถแปลผลยีนคอนสแตนท์สปริงได้อย่างชัดเจน ในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 120 ราย ตรวจพบ Heterozygous Constant Spring เกิดร่วมจำนวนทั้งหมด 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.6 ซึ่งแบ่งเป็นรายละเอียดในแต่ละกลุ่มดังนี้ พบฮีโมโกลบินเอชคอนสแตนท์สปริง (HbH-CS) จำนวน 2 ราย ซึ่งสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงโดยเทคนิค HPLC ของทั้ง 2 ราย แต่ตรวจพบในปริมาณที่ต่ำมากโดยพบประมาณร้อยละ 1 ของปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมดดังแสดงผลในตารางที่ 18 พบ Heterozygous CS ร่วมกับ Heterozygous α^{+} thalassemia 2 (3.7 kb) จำนวน 3 ราย จากทั้งหมด 17 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.67 พบ Heterozygous CS ร่วมกับพาหะฮีโมโกลบิน อี (Heterozygous Hb E) จำนวน 3 ราย จากทั้งหมด 40 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.5 ในกลุ่มนี้ตรวจพบฮีโมโกลบินเออีบาร์ทคอนสแตนท์สปริง (A E Bart's CS) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีจีโนไทป์ซับซ้อน จำนวน 1 ราย ดังแสดงผลตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอยดังในภาพที่ 18



(A) (B)

ภาพที่ 17 แสดงผลการทำฮีโมโกลบินคอนสแตนสปริงที่ใช้เทคนิค HRM analysis เพื่อตรวจหา Hb Constant Spring ซึ่งภาพ (A) และ(B)

ภาพ (A) แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันของการเรืองแสงอยู่ที่ค่า Tm ซึ่งคนที่มียีนปกติ Tm= 89°C ที่เป็นสีแดง ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) สีเขียวเป็นความผิดปกติที่เป็น ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) จะให้ค่า Tm= 89.2°C ส่วนสีฟ้าเป็นความผิดปกติที่เป็น ($\alpha^{CS}\alpha/(\alpha^{CS}\ \alpha$) จะให้ค่า Tm= 89.6°C ภาพ (B) แสดงถึงยีนปกติที่เป็น α_2 globin ยีน ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), heterozygous CS homozygous CS โดยมีเส้นโค้งสีฟ้ากับเขียวเกิดขึ้นเมื่อใช้ความร้อนเพิ่มขึ้น 0.2°C ในอัตรา 5 วินาที ที่ช่วงอุณหภูมิที่มีความร้อน75-95°C โดยฟิกที่ให้ผล ($\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$) จะแยกออกจากกันลงด้านล่าง แต่ถ้าเป็น($\alpha^{CS}\alpha/(\alpha^{CS}\alpha$) จะขึ้นไปด้านบล

ตารางที่ 16 อุบัติการณ์การเกิดร่วมระหว่างพาหะคอนสแตนสปริงและธาลัสซีเมียชนิดอื่น

Genotype	Number of Sample	Incidence of HbCS (%)
Heterozygous α^0-thalassemia (SEA type)	18	2 (11.11)
Heterozygous α^+-thalassemia (3.7 kb)	17	3 (17.65)
Heterozygous α^+-thalassemia (4.2 kb)	4	0
Heterozygous β-thalassemia	10	0
Heterozygous HbE	40	3 (7.5)
Homozygous HbE	6	0
Homozygous HbE with α^0-thalassemia (SEA type)	2	0
Double Heterozygous for HbE and α^0-thalassemia (SEA type)	14	0
Double Heterozygous for HbE and α^+-thalassemia (3.7 kb)	7	0
Double Heterozygous for HbE and α^+-thalassemia (4.2 kb)	2	0
Total	**120**	**8 (6.67)**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและวิจารณ์

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางที่พบบ่อยและถือเป็นปัญหาทางสาธารณะสุขที่สำคัญในประเทศแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เนื่องจากผู้ป่วยบางคนเสียชีวิตหรือบางรายต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงมากในการเยียวยารักษา ในผู้ที่เป็นพาหะหรือมียีนแฝงสามารถถ่ายทอดยีนผิดปกติไปสู่บุตรได้ ซึ่งหากไม่ได้รับการควบคุมป้องกันจะทำให้มีประชากรป่วยด้วยโรคนี้เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก การศึกษาโรคธาลัสซีเมียในประเทศลาวยังมีข้อมูลรายงานจำนวนจำกัดเนื่องจากยังขาดความรู้เกี่ยวกับโรคนี้และการตรวจวินิจฉัยโรคยังทำได้จำกัดเนื่องจากยังไม่มีความพร้อมในด้านเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยซึ่งอาจทำให้มีประชากรเป็นโรคธาลัสซีเมียเพิ่มขึ้นได้

การศึกษานี้ได้นำเทคนิคการตรวจคัดกรองและตรวจยืนยันโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่ใช้เป็นแนวปฏิบัติสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทยไปตรวจวินิจฉัยในประชากรลาว จากการตรวจคัดกรองโดยเทคนิค OF test และ DCIP test ในตัวอย่างเลือดทั้งหมด 354 ราย พบผลบวกปลอมอยู่ 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 2 ซึ่งพบว่าในกลุ่มนี้มีค่าของ MCV< 80 fl นั้นก็หมายความว่าอาจจะมีความผิดปกติที่เกียวกับยีน ซึ่งหากใช้การตรวจคัดกรองเพียงอย่างเดียวจะทำให้วินิจฉัยผิดพลาดได้หรือทำให้ไม่ทราบว่ามียีนธาลัสซีเมียแฝงอยู่ จำเป็นจะต้องซักประวัติครอบครัวเพิ่มเติม หากพบว่ามีประวัติเครือญาติเป็นธาลัสซีเมียควรจะต้องตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจในระดับยีนโดยการตรวจระดับยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ข้อมูลจากการศึกษาก่อนหน้าหลายๆ การศึกษาเคยระบุการตรวจ OF test โดยใช้น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.36 อาจจะให้ผลลบปลอมได้ในผู้ที่เป็นพาหะธาลัสซีเมียชนิดHeterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb)($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) พาหะ Heterozygous α^{+}-thalassemia (4.2 kb)($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$) และพาหะ Heterozygous α^{o}-thalassemia (SEA type)($--^{SEA}/\alpha\alpha$) [42]

การศึกษานี้พบว่ามีจำนวน 104 ราย ให้ผลบวกด้วยการตรวจโดย OF test แต่ไม่ตรวจพบความผิดปกติในการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินและการตรวจในระดับยีน ซึ่งในอาสาสมัครในกลุ่มนี้อาจจะมีอาการซีดเนื่องจากภาวะผิดปกติหรือเป็นโรคอื่น ยกตัวอย่างเช่นมีภาวะขาดธาตุเหล็ก ส่วนในกลุ่มอาสาสมัครที่ให้ผลตรวจความสมบูรณ์ของเลือดผิดปกติได้แก่มีค่า Hemoglobin Hematocrit MCV, MCH ต่ำกว่าค่าปกติ แต่ตรวจไม่พบยีนแฝงธาลัสซีเมียซึ่งกลุ่มนี้อาจจะมีภาวะซีดเนื่องจากการป่วยด้วยโรคที่ไม่รุนแรงจึงไม่ได้เข้าไปรับการรักษาในโรงพยาบาลซึ่งควรแนะนำให้ไปพบแพทย์หากมีอาการผิดปกติเกิดขึ้นหรือตรวจสุขภาพเพิ่มเติม

ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจหาอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติจากการสุ่มตรวจกลุ่มอาสาสมัครซึ่งเป็นนักศึกษาและประชากรทั่วไป ที่อาศัยอยู่ในนครหลวงเวียงจันทร์ สปป. ลาว จากข้อมูลรายงานอุบัติการณ์ในอดีตที่ผ่านมาพบว่า 3 กลุ่มวิจัยได้ศึกษาหาอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรลาว โดย 2 งานวิจัยทำการตรวจคัดกรอง [45, 46] และ 1 งานวิจัยทำการตรวจและในปี 2008 [42] มีรายงานข้อมูลทั้งตรวจคัดกรองและตรวจยืนยันโดยทำการศึกษาในอาสาสมัครที่เป็นกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ ที่มาฝากครรภ์ ณ โรงพยาบาลสุขถาพแม่และเด็กโดยดังรายละเอียดแสดงในตารางที 19

การศึกษานี้พบอุบัติการณ์ของแอลฟ่าธาลัสซีเมียร้อยละ 13.4 ประกอบด้วย Heterozygous α^{o}-thalassemia (SEA type)($--^{SEA}/\alpha\alpha$) ร้อยละ 5, Heterozygous α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) ร้อยละ 4.2, Heterozygous α^{+}-thalassemia (4.2 kb) ร้อยละ 1.1, Compound heterozygous of Hb constant spring and α^{+}-thalassemia (3.7 kb) ($\alpha^{CS}\alpha/-\alpha^{3.7}$) ร้อยละ 0.8, Heterozygous of Hb constant Spring disease ร้อยละ 0.3 ส่วนความผิดปกติในสายเบต้าโกลบินพบพาหะเบต้าธาลัสซีเมียร้อยละ 8.2 พาหะฮีโมโกลบิน อี ร้อยละ 19 และ homozygous Hb E ร้อยละ 3.1 ที่ตรวจพบได้ถือว่าอุบัติการณ์ของโรคนี้ซึ่งผลอุบัติการณ์ที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าไกล้เคียงกับรายงานอุบัติการณ์ในภาคเหนือของประเทศไทยและลาวพบฮีโมโกลบินอีหลายที่สุดสำหรับในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประมาณร้อยละ 50-60, ส่วนมากนั้นจะเจอในเขตชายแดนที่ติดกัน เช่น ลาว ไทย กัมพูชา α-thalassemia ประมาณร้อยละ 30-40, β-thalassemia ที่มีความหลากหลายของยีนที่แตกต่างกันประมาณร้อยละ 1 และ 9 [47] แต่สำหรับในส่วนที่เป็นสายแอลฟ่าพบว่ามียีนแฝง α-thalassemia 1 และ α-thalassemia 2 [42] จากการศึกษาดังกล่าวมานั้นในหญิงตั้งครรภ์ในลาวเห็นว่าความผิดปกตินั้นมีความคล้ายกันกับกลุ่มที่ทำการศึกษาในหมู่ประชากรในแถบเขตภาคอีสานของไทยโดยเฉพาะฮีโมโกลบินอี [8, 48]

นอกนี้ยังพบอัตราความชุกของโรคธาลัสซีเมียและฮิโมโกลบินโนพาที ที่ได้รับการรายงานในภาคตาวันออกเฉียงเหนือของไทยและเวียงจันท์ที่ได้ทำการศึกษาจาก 1.809 ตัวอย่างซึ่งพบความผิดปกติฮิโมโกลบินอีในไทย ร้อยละ 41.7, α-thalassemia ร้อยละ 5.8, β-thalassemia ร้อยละ 0.9 และ 1 รายเป็น α^{o}-thalassemia จากชนเผ่ากลุ่มน้อย ส่วนหญิงตั้งครรภ์พบพาหะ ฮิโมโกลบิน อี ร้อยละ 30.1 พบอัตราความชุกของโรค α^{o}-thalassemia ประมาณร้อยละ 8.6 อาจมีความคล้ายกคลึงกับภาคตาวันออกเฉียงเหนือของไทย [46]

การศึกษานี้พบว่ามีอุบัติการณ์ของ α-thalassemia 1 สูงมาก ร้อยละ 5 ซึ่งควรเฝ้าระวังการถ่ายทอดยีนไปสู่บุตรเนื่องจากหากพ่อและแม่มียีนแฝง α-thalassemia 1 ทั้งคู่ จะมีโอกาศให้กำเนิด

บุตรเป็น Bart's hydrops fetalis ซึ่งเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดาและอาจจะทำให้มารดาไม่ปลอดภัยได้โดยทั่วไปหากตรวจพบว่าทารกในครรภ์เป็นธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้แก่ชนิด Bart's hydrops fet alis Homozygous β-thalassemia และ β-thalassemia/Hb E แพทย์จะมีแนวทางในการรักษาอยู่ แนวทางได้แก่การรักษาทารกในครรภ์ การเตรียมรักษาหลังคลอดและยุติการ 3 ตั้งครรภ์

จากข้อมูลที่มีการรายงานชนิดย่อยของธาลัสซีเมียทั้งจากการศึกษานี้และการศึกษาก่อนหน้านี้ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์พบว่าลักษณะจีโนไทป์ของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรลาว มีความหลากหลายและซับซ้อนกล่าวคือพบจีโนไทป์ถึง 23-ชนิด และพบการเกิดความผิดปกติ 25 ร่วมกันของยีนทั้งสาย α-globin และ β-globin เป็นจำนวนมากยกตัวอย่างเช่นพบว่าในกลุ่มพาหะฮีโมโกลบิน อี (Hb E trait) จำนวนมากร้อยละ 18-19 มียีนแฝง α-thalassemia ทั้งชนิด α-thalassemia 1 หรือ α-thalassemiaหรือพบความผิดปกติร่วมระหว่างผู้ที่มียีนแฝงคอนสแตนท์ 2 สปริงร่วมกับพาหะฮีโมโกลบินอี ร้อยละ 0.6 ซึ่งจีโนไทป์ซับซ้อนแบบนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับข้อมูลรายงานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย หากประชากรที่มียีนซับซ้อนแต่งงานกันจะทำให้มีโอกาสเป็นไปได้สูงที่จะถ่ายทอดความผิดปกติไปให้บุตรและทำให้บุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียที่รุนแรงได้มากกว่า โรคและมีจีโนไทป์ท ี่ซับซ้อนอีกได้ ดังนั้นองค์กรทางการแพทย์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องควรเฝ้าระวังและวางแผนการมีบุตรให้รัดกุมมากขึ้น การมียีนแฝงแอลฟ่าธาลัสซีเมียนั้นทำการตรวจวินิจฉัยได้ยากเนื่องจากต้องตรวจในระดับยีนหากดูจากผลตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอย่างเดียวสามารถแยกได้เฉพาะกลุ่มที่เป็นพาหะฮีโมโกลบิน อี และมียีนแฝง α-thalassemia เท่านั้นโดยกลุ่มนี้จะมีปริมาณของฮีโมโกลบิน อี น้อยกว่าร้อยละ 25

ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติในสายแอลฟ่าโกลบินที่ตรวจพบบ่อยในกลุ่มประชากรลาว [2] การศึกษานี้มุ่งเน้นการตรวจหายีนคอนสแตนท์สปริงในกลุ่มประชากรลาวที่มียีนธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติแฝงอยู่ การศึกษาก่อนหน้านี้ตรวจพบอุบัติการณ์ของยีนคอนสแตนท์สปริงได้ทั้งหมด 7 รายคิดเป็นร้อยละ 2.2 จากทังหมด 307 ราย ที่มีความผิดปกติของยีนโดยพบ Hemoglobin Constant Spring เกิดร่วมกับ Heterozygous α^+-thalassemia 2 (3.7 kb) จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.3, Hemoglobin Constant Spring ร่วมกับพาหะฮีโมโกลบิน อี (Heterozygous Hb E) จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.3 [42] ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้พบอุบัติการณ์ของ Hemoglobin Constant Spring เกิดร่วมกับ Heterozygous α^+-thalassemia 2 (3.7 kb) ก็พบมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยโดยพบ 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.0 ซึ่งข้อมูลที่ได้อาจไม่มีความแตกกต่างกันมากระหว่างทั้งเพศชายและหญิงกับกลุ่มหญิงตั้งครรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การรายงานก่อนหน้านี้พบการเกิดร่วมกันของ Hemoglobin Constant Spring และความผิดปกติของยีนที่ควบคุมการสร้างสายโกลบินชนิดอื่นๆ ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงมากขึ้น ยกตัวอย่างเช่นพบผู้ที่เป็นฮีโมโกลบินเอชคอนสแตนท์สปริง (Hemoglobin H-Constant Spring) จะมีอาการแสดงรุนแรงกว่าผู้ที่เป็นฮีโมโกลบินเอช (Hemoglobin H) การศึกษาความสมบูรณ์ของเม็ดเลือดจากข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าผู้ที่พบการเกิดร่วมของ Hemoglobin Constant Spring กับ Heterozygous α^{+}-thalassemia มีค่า Hemoglobin MCV, MCH และ MCHC ต่ำกว่าผู้ที่เป็น Heterozygous Constant Spring ซึ่งคาดการณ์ได้ว่าผู้ที่พบความผิดปกติของยีนเกิดร่วมกันในลักษณะนี้จะมีโอกาสมีอาการของโรครุนแรงได้โดยเฉพาะกรณีอยู่ในภาวะติดเชื้อรุนแรงอาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการซีดเฉียบพลันจนต้องได้รับเลือดหรือพบภาวะตับ ม้ามโตได้ การพบยีนคอนสแตนท์สปริงในผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินอีในประชากรลาวได้เคยมีรายงานมาแล้ว [42] การเกิดร่วมกันในลักษณะนี้ถือเป็นความผิดปกติของยีนทั้งสายแอลฟ่าโกลบินและสายเบต้าอย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลทางคลินิกที่สำคัญในการใช้พยากรณ์อาการของผู้ป่วยเนื่องจากพบอุบัติการณ์ต่ำจึงไม่มีข้อมูลเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ผลทางสถิติซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการหาข้อมูลเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรที่มีจำนวนมากขึ้นต่อไปในอนาคต

การตรวจฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่การตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยเครื่องอัตโนมัติ [49] และการตรวจระดับยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ [50] การศึกษาในอดีตพบว่าการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยเครื่อง HPLC ไม่สามารถตรวจพบฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงได้ในผู้ที่เป็นพาหะทั้งหมด ส่วนการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยเทคนิค Capillary electrophoresis จะมีความไวสูงกว่าซึ่งสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริงได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามการตรวจระดับยีนก็มีความสำคัญในการตรวจยืนยันในรายที่ให้ผลตรวจฮีโมโกลบินไม่ชัดเจน การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิค HRM analysis สำหรับตรวจยีนคอนสแตนท์สปริงซึ่งพบว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจพบยีนคอนสแตนท์สปริงได้ในผู้ที่ให้ผลลบโดยการตรวจด้วยเครื่อง HPLC จำนวน 354ราย ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการตรวจยืนยันโดยการอ่านลำดับนิวคลิโอไทด์เบสจากการทำ 5 เทคนิคDNA Sequencing ข้อมูลนี้แสดงว่าเทคนิค HRM analysis มีความไวและความแม่นยำสูง เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ยีนที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์เปลี่ยนแค่หนึ่งตำแหน่งได้ โดยอาศัยการตรวจจับการลดลงของปริมาณการเรืองแสงของสารเรืองแสงทุกๆ 0.2 องศาเซลเซียส จากการตรวจ DNA Sequencing ของตัวอย่างที่ตรวจพบ peak ของยีนคอนสแตนท์สปริงโดยเทคนิค HRM analysis ไม่พบผลบวกปลอมจากการกลายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ถึงแม้ว่าการทำเทคนิค HRM analysis จะต้องอาศัยเครื่อง Real time PCR ซึ่งมีราคาแพงแต่สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ได้ในห้องปฏิบัติการที่มีความ

พร้อมเนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียงประมาณ 3 ชั่วโมงเท่านั้นและไม่ต้องทำขั้นตอนหลังปฏิกิริยาพีซีอาร์

จากที่กล่าวมานั้นโดยสรุปได้ว่าข้อมูลอุบัติการณ์โรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลให้ประเทศลาวได้ตระหนักถึงความสำคัญของการควบคุมและป้องกันโรคโรคธาลัสซีเมีย ซึ่งแนวทางที่สำคัญมากคือการตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการซึ่งยังทำได้อย่างจำกัดในขณะนี้การตรวจทางห้องปฏิบัติการจะถูกนำไปตรวจหาความผิดปกติและนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการวางแผนครอบครัว ประเมินความเสี่ยง การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์แก่ผู้ที่มียีนแฝงซึ่งจะต้องใช้บุคลากรทางการแพทย์ที่มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียนี้ได้อย่างลึกซึ้งและความเป็นมืออาชีบในการตรวจหายีนที่มีความผิดปกติได้อย่างแม่นย้ำอีกต่างหาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Weatherall, D.J., Molecular basis for some disorders of haemoglobin synthesis I. Br Med J, 1974. 4(5942): p. 451-4.
2. Singsanan, S., et al., Molecular characterization and origins of Hb Constant Spring and Hb Pakse in Southeast Asian populations. Ann Hematol, 2007. 86(9): p. 665-9.
3. Saiki, R.K., et al., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988. 239(4839): p. 487-91.
4. Sirichotiyakul, S., et al., Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. Int J Gynaecol Obstet, 2004. 86(3): p. 347-50.
5. Wasi, P., et al., Thalassemia in southeast Asia: determination of different degrees of severity of anemia in thalassemia. Ann N Y Acad Sci, 1985. 445: p. 119-26.
6. Weatherall, D.J. and J.B. Clegg, Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bull World Health Organ, 2001. 79(8): p. 704-12.
7. Vallance, H. and J. Ford, Carrier testing for autosomal-recessive disorders. Crit Rev Clin Lab Sci, 2003. 40(4): p. 473-97.
8. Fucharoen, S. and P. Winichagoon, Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin, 1987. 11(1): p. 65-88.
9. Manning, L.R., et al., Energetic Differences at The Subunit Interfaces of Normal Human Hemoglobins Correlate with Their Developmental Profile(). Biochemistry, 2009. 48(32): p. 7568-74.
10. Manning, J.M., et al., INTRINSIC REGULATION OF HEMOGLOBIN EXPRESSION BY VARIABLE SUBUNIT INTERFACE STRENGTHS. FEBS J, 2012. 279(3): p. 361-9.
11. Wood, W.G., Haemoglobin synthesis during human fetal development. Br Med Bull, 1976. 32(3): p. 282-7.
12. Forget, B.G. and H.F. Bunn, Classification of the Disorders of Hemoglobin. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013. 3(2).

13. Rafiei Tabatabaei, S., et al., The prevalence of minor thalassemia among siblings of major thalassemia patients: A study from Iran. Annals of Biological Research, 2012. 3(12): p. 5429-33.
14. ปราณี ฟู่เจริญ (วินิจจะกูล)และสุทัศน์ ฟู่เจริญ, ธาลัสซีเมีย การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR, Thalassemia Research Center. 2541, โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล .p. 15-36.
15. ปราณี ฟู่เจริญ (วินิจจะกูล) และสุทัศน์ ฟู่เจริญ, Molecular biology of Thalassemia and Abnormal Hemoglobins. Thalassemia Research Center ธาลัสซีเมียการตรววิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิด PCR. ตีพิมพ์ครั้งที่. 1. 2541: โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาลัยมหิดล .15-36.
16. Fucharoen, S. and P. Winichagoon, Hemoglobinopathies in Southeast Asia: Molecular Biology and Clinical Medicine. Hemoglobin, 1997. 21(4): p. 299-319.
17. Weatherall, D., Thalassemia as a global health problem: recent progress toward its control in the developing countries. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. 1202(1): p. 17-23.
18. Steensma, D.P., R.J. Gibbons, and D.R. Higgs, Acquired alpha-thalassemia in association with myelodysplastic syndrome and other hematologic malignancies. Blood, 2005. 105(2): p. 443-52.
19. Old, J.M., Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. Blood Reviews, 2003. 17(1): p. 43-53.
20. Surapon, T., thalassemia syndrome Chronic Diseases Research Unit, Department of Medical Technology,Naresuan University, Phitsanulok Thailand, 2011: p. 1-49.
21. Fischel-Ghodsian, N., et al., Characterization of two deletions that remove the entire human zeta-alpha globin gene complex (- -THAI and - -FIL). Br J Haematol, 1988. 70(2): p. 233-8.
22. วนิดา อิฐลัตน์ (อัศวะมหาศักดา), โลหิตวิทยาทันยุค Modern Hematology ความผิดปกติทางพันธุกรรมของฮีโมโกบินด้านปริมาณ Thalassemias. 2545: เรือนแก้วการพิมพ์ .p. 227-253.
23. ปราณี ฟู่เจริญ, อณูชีวะวิทะยาและชนิดของอัลฟ่าธาลัสซีเมีย Molecular Biology and types of alpha-Thalassemias, ความรู้เรื่องโรคธาลัสซีเมีย การตรวจวินิตฉัยธาลัสซีเมีย

ทางห้องประฏิบัติการ .2541, ศูลวิจัยธาลัสซีเมียสถาบันวิทยาศาสโมเลกูลวิทยาลัยมหิดล .p. 12-20.

24. ประพนธ์ วิไลรัตน์ และยุวดี วัฒนโภคาสิน, Molecular Biology of Globin Genes. Thalassemia Research Center ธาลัสซีเมียการตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิค PCR, ed. ปราณี ฟู่เจริญ (วินิจจะกูล)และสุทัศน์ ฟู่เจริญ .2541: โครงการวิจัยธาลัสซีเมียสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหิดล .1-36.
25. วนิดา อิฐลัตน์ (อัศวะมหาศักดา), โลหิตวิทยาทันยุค Modern Hematology. โดรงสร้างและการทำงานของเม็ดเลือดแดง Structure and function of blood cells. ตีพิมพ์ครั้งที่. 1. 2545, เรือนแก้วการพิมพ์ .79-112.
26. Fucharoen, G., et al., A simplified screening strategy for thalassaemia and haemoglobin E in rural communities in south-east Asia. Bulletin of the World Health Organization, 2004. 82(5): p. 364-372.
27. James Hoyer MD, 79 Hemoglobinopathies: The How, Why and What 2011, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL PATHOLOGY 33 W. Monroe, Ste. 1600 Chicago, IL 60603.
28. วนิดา อิฐรัตน์ (อัศวะมหาศักดา), ความผิดปกติทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินด้านปริมาณธาลัสซีเมีย :Thalassemias. โลหิตวิทยทันยุค Modern Hematology. ตีพิมพ์ครั้งที่. 1. 2545: เรือนแก้วการพิมพ์.
29. วิปร วิประกษิต, การรักษาโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย, สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย ภาควิชากุมมารเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาส ศิริลาชพยาบาล .2012.
30. สุทัศน์ ฟู่เจริญ, การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอกับการวินิจฉัยธาลัสชีเมียในงานประจำวัน., บรรยาย การประชุมวิชาการธาลัสชีเมียแห่งชาคิ ประจำปี .2543. p. 49-53.
31. Andrews, N.C., Disorders of Iron Metabolism. New England Journal of Medicine, 1999. 341(26): p. 1986-1995.
32. วิประกษิต, แนวทางเวชปฏิบัติในการรักษาภาวะเหล็กเกินด้วยยาดีเฟอริโพรน, สาขาโลหิตวิทยาและอองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล .2552. p. 36.
33. Taher, A., C. Hershko, and M.D. Cappellini, Iron overload in thalassaemia intermedia: reassessment of iron chelation strategies. Br J Haematol, 2009. 147(5): p. 634-40.

34. Kruatrachue, M., et al., An association between thalassaemia and autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). Scand J Haematol, 1980. 25(3): p. 259-63.
35. Singer, S.T., et al., Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. Blood, 2000. 96(10): p. 3369-73.
36. ปราณี สุจริตจันทร์, Thalassemia and Hemoglobinopathy. ในเวชปฏิบัติ โลหิตวิทยา บรรณาธิการ. อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์ .ตีพิมพ์ครั้งที่. 1. 2551, สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 1330: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นางศรินทิพย์ นิมิตรมงคล ผู้พิมพ์ ผู้โฆษณา.
37. Hassan, S., et al., Detection of beta-globin Gene Mutations Among beta-thalassaemia Carriers and Patients in Malaysia: Application of Multiplex Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction. Malays J Med Sci, 2013. 20(1): p. 13-20.
38. วิจารณ์ พาณิช, แนวทางแก้ปัญหาโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยแพทยสภาสาร ., 2532. 18 p. 67-74.
39. วิชัย เหล่าสมบัติ, ธาลัสซีเมียโอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์ : กรุงเทพมหานคร ., 2541: p. 1-6.
40. วิจารณ์ พาณิช, แนวทางแก้ปัญหาโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยแพทยสภาสาร ., 2532(18): p. 597-629.
41. บวม งามศิริอุดม, การดำเนินงานส่งเสริมป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดรุนแรงในโครงการหลักประกันสุขภาพถ้วนหน้า, เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 8. สิงหาคม 2545, ณ โรงแรมโฆษะ จังหวัดขอนแก่น .p. 8-9.
42. Savongsy, O., et al., Thalassemia and hemoglobinopathies in pregnant Lao women: carrier screening, prevalence and molecular basis. Ann Hematol, 2008. 87(8): p. 647-54.
43. คู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติศูนย์วิจัย : นนทบุรี . ทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.ตีพิมพ์ครั้งที่. 3. 2553, ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถ นนทบุรี.เมือง จ.ติวานนท์ อ.11000: บริษัท หมัดเด็ด จำกัด 1213/84 ซอยลาดพร้าว 94 ถนนลาดพร้าว แขวงวังทองหลาง เขตวังทองหลาง กรุงเทพฯ 10310.

44. คณะกรรมการจัดทำคู่มือการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน, คู่มือการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน พิมพ์ครั้งที่ .3, 2554. นนทบุลี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

45. Sengchanh, S., et al., High frequency of alpha-thalassemia in the So ethnic group of South Laos. Acta Haematol, 2005. 114(3): p. 164-6.

46. Tritipsombut, J., et al., Micromapping of thalassemia and hemoglobinopathies in diferent regions of northeast Thailand and Vientiane, Laos People's Democratic Republic. Hemoglobin, 2012. 36(1): p. 47-56.

47. Fucharoen, S. and P. Winichagoon, Thalassemia in SouthEast Asia: problems and strategy for prevention and control. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1992. 23(4): p. 647-55.

48. Fucharoen, S. and P. Winichagoon, Haemoglobinopathies in Southeast Asia. indian J 2011. Med Res(134): p. 498-506.

49. Pornprasert, S. and M. Punyamung, Detection of compound heterozygous of hb constant spring and hb q-Thailand by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. Indian J Hematol Blood Transfus, 2015. 31(2): p. 229-32.

50. Wee, Y.C., et al., Molecular characterisation of Haemoglobin Constant Spring and Haemoglobin Quong Sze with a Combine-Amplification Refractory Mutation System. Malays J Med Sci, 2009. 16(3): p. 21-8.

ภาคผนวก

Lao People's Democratic Republic
Peace Independence Democracy Unity Prosperity
===== 000 =====

Ministry of Health
National Institute of Public Health
National Ethics Committee
For Health Research (NECHR)

No. 072 NIOPH/NECHR

Approval Notice

Mr. Sayphonh Phanmany
Email: say_fonh@hotmail.com
Tel: 088-6188-160

RE: **"Thalasemia and G6PD deficiency among Outpatients in Mahosot Hospital, Vientiane Capital, Lao People's Democratic Republic"**

Mr. Sayphonh Phanmany,

Members of the Ethics Committee of the Lao People's Democratic Republic (PDR) have reviewed and approved your research.

Please note the following information about your approved research protocol:

Approval period: January to April 2014
Approved study samples: 500
Sponsor: Chulalongkorn University, Thailand
Implementing Panel/Project Investigator: Mr. Sayphonh Phanmany

Please note that the Ethics Committee reserves the right to ask for further questions, seek additional or monitor the conduct of your research and consent process.

Vientiane Capital, 13 DEC 2013
Director General
National Institute of Public Health

Assoc Prof Dr Kongsap AKKHAVONG

ສາທາລະນະລັດ ປະຊາທິປະໄຕ ປະຊາຊົນລາວ

ສັນຕິພາບ ເອກະລາດ ປະຊາທິປະໄຕ ເອກະພາບ ວັດທະນາຖາວອນ

****

ມະຫາວິທະຍາໄລ ວິທະຍາສາດ ສຸຂະພາບ
ຄະນະເຕັກນິກການແພດ

ເລກທີ 0831 /ຄຕພ
ນະຄອນຫຼວງວຽງຈັນ, ວັນທີ 09 DEC 2013

ໃບສະເໜີ

ຮຽນ : ທ່ານຄະນະອຳນວຍການສະຖາບັນສາທາລະນະສຸກສາດ

(ໂດຍຜ່ານການພິຈາລາຕັ້ງແຕ່ລະຂັ້ນ)

ເລື່ອງ : ຂໍຈະເຮັຍະທຳ

ອ້າຍະເຈົ້າໃນນາມ ຄະນະບໍລິ ຄະນະເຕັກນິກການແພດ ມະຫາວິທະຍາໄລ ວິທະຍາສາດ ສຸຂະພາບ ມີຈຸດປະສົງຂໍຈະເຮັຍະທຳໃຫ້ແກ່ທ້າວສາຍຝົນ ພົນມະນີ ຄັ້ງກັ: ພາກວິຊາວິເຄາະການແພດ ຄະນະເຕັກນິກການແພດ ມະຫາວິທະຍາໄລ ວິທະຍາສາດ ສຸຂະພາບ.

ປະຈຸບັນ:ຜູ້ກ່ຽວແມ່ນໄປສຶກສາຕໍ່ ລະດັບປະເຣີນຍາໂທ ຫຼັກສູດວິທະຍາສາດມະຫາບັນດິດ ພາກວິຊາ ຈຸລະຊີວະສາດຄລີນິກ ຄະນະສະຫະເວສຂະສາດ ມະຫາວິທະຍາໄລ ຈຸລາລົງກອນ ປະເທດໄທ

ມີຄວາມປະສົງຂໍຈະເຮັຍະທຳໃຫ້ຜູ້ກ່ຽວເພື່ອໄປເຮັດບົດວິທະຍານິພົນ (Thesis) "ໃບຫົວຂໍ້ ການສັ່ງຊື້ ເມັຍແລະພາວະການຂາດເອນໄຊ G6PD ທີ່ມີຄ່າປົກະຕິຂອງຄົນເຈັບນອກທີ່ເຂົ້າມາຫາລວດໃນ ພະແນກ ວິເຄາະ,ໂຮງໝໍມະໄຫສິດ" ເພື່ອນຳໄປຍັ້ງຢືນໃນການຂຽນບົດວິທະຍານິພົນ.

ດັ່ງນັ້ນ, ຈຶ່ງສະເໜີມາຍັງທ່ານເພື່ອພິຈາລະນາແກ້ໄຂຕາມທາງຄວນດ້ວຍ.

ຮຽນມາດ້ວຍຄວາມເຄົາລົບແລະນັບຖື.

ຄະນະບໍລິ ຄະນະເຕັກນິກການແພດ

ດຣ.ວິມົນ ສຸກອະເພ.

ສາທາລະນະລັດ ປະຊາທິປະໄຕ ປະຊາຊົນລາວ

ສັນຕິພາບ ເອກະລາດ ປະຊາທິປະໄຕ ເອກະພາບ ວັດທະນະຖາວອນ

****

ຄຳຊີ້ແຈງ

ຂ້າພະເຈົ້າ ທ້າວ ສາຍຝົນ ພັນມະນີ ປະຈຸບັນກຳລັງສຶກສາໃນ**ລະດັບປະຣິນຍາໂທ ໃນ ສາຂາວິທະຍາສາດໂລຫິດວິທະຍາຄຣິນິກ ຄະນະສາທະເວຊສາດຕຣ໌ ຈຸລາລົງກອນມະຫາວິທະຍາໄລ** ຂະນະນີ້ກຳລັງສຶກສາວິໄຈເລື່ອງ: **ທາລັສ໌ຊີເມັຍແລະພາວະການຂາດເອນໄຊ G6PD ທີ່ຜິດປົກະຕິ ຂອງຄົນໄຂ້ນອກທີ່ເຂົ້າກວດໃນໂຮງໝໍມະໂຫສົດ ນະຄອນຫລວງວຽງຈັນ ສາທາລະນະລັດ ປະຊາທິປະໄຕ ປະຊາຊົນລາວ.**

ການວິໄຈຄັ້ງນີ້ເປັນການສຶກສາເພື່ອຫາປັດໄຈຄວາມຊຸກຊຸມຂອງພະຍາດທາລັສ໌ຊີເມັຍແລະພາວະຂາດເອນໄຊ G6PD ເນື່ອງຈາກພະຍາດນີ້ເປັນພະຍາດທີ່ມີການຖ່າຍທອດທາງພັນຖຸກັມ, ອີກປັນຫາຫນຶ່ງກໍ່ຄື: ພະຍາດນີ້ກຳລັງເປັນປັນຫາຂອງສັງຄົມທີ່ຈະຕ້ອງເອົາໃຈໃສ່ໃນການຮັກສາແລະປ້ອງກັນເພື່ອບໍ່ໃຫ້ພະຍາດນີ້ມີການຂະຫຍາຍເພີ່ມຫລາຍຂຶ້ນກວ່າເກົ່າ, ເຊິ່ງໃນແຕ່ລະປີມີຄົນໄຂ້ເພີ່ມຈຳນວນຫລາຍຂຶ້ນເລື້ອຍໆຖ້າຫາກບໍ່ມີວິທີປ້ອງກັນໂດຍສະເພາະໃນກລຸ່ມບັນດາປະເທດທີ່ກຳລັງມີການພັດທະນາຫນຶ່ງໃນນັ້ນກໍ່ມີປະເທດລາວທີ່ຮ່ວມຢູ່ດ້ວຍ.

ຂໍ້ມູນທີ່ໄດ້ໃນຄັ້ງນີ້ຈະເປັນແຫລ່ງຂໍ້ມູນທີ່ດີເລີດເພາະຈະເປັນປະໂຫຍດໃຫ້ແກ່ແພດຫມໍ ພ້ອມຈະເປັນຖານຂໍ້ມູນໃຫ້ຫນ່ວຍງານທີ່ກ່ຽວຂ້ອງເພື່ອຫາວິທີທາງໃນການປ້ອງກັນແລະຄວບຄຸມ ຊຶ່ງຕົວທ່ານເອງກໍ່ເປັນຄົນຫນຶ່ງທີ່ມີຄວາມສຳຄັນໃນການປະກອບສ່ວນໃຫ້ຂໍ້ມູນຄັ້ງນີ້.

ເມື່ອທ່ານໄດ້ຕັດສິນໃຈເຂົ້າຮ່ວມການວິໄຈ ແລະລົງຊື່ເປັນຫລັກຖານໃນແບບສອບຖາມແລ້ວແມ່ນອນວ່າຂໍ້ມູນຂອງທ່ານນັ້ນຈະຖືກເກັບກຳເປັນຄວາມລັບຢ່າງດີເພື່ອສິດທິຂອງຕົວທ່ານ ແລະຈັນຍາບັນຂອງຜູ້ວິໄຈ, ແຕ່ຜູ້ທຳການວິໄຈຈະຂໍສະເໜີເປັນພຽງຕົວເລກເທົ່ານັ້ນຊຶ່ງຈະບໍ່ທຳໃຫ້ເກີດຄວາມເສຍຫາຍແກ່ຕົວທ່ານ, ຂໍ້ມູນທີ່ໄດ້ກໍ່ຈະຖືກເກັບໄວ້ເປັນຄວາມລັບພຽງຄົນດຽວຄືຂ້າພະເຈົ້າເອງ(**ສາຍຝົນ ພັນມະນີ**)ເປັນຜູ້ຮັບຜິດຊອບ, ຖ້າທ່ານມີຂໍ້ສົງໄສ ຫລືຕ້ອງການຜົນການວິໄຈສາມາດຕິດຕໍ່ ແລະສອບຖາມໄດ້ທຸກເມື່ອຕາມທີ່ທ່ານຕ້ອງການໄດ້ທຸກເວລາຕາມ (ໃນວັນ ແລະເວລາລັດຖະການ)

ເບີໂທມືຖືລາວ: 02022201200 ຫລືຫ້ອງການ .....

ມືຖືໄທ: 0886188160, ຫລື ສອບຖາມທາງ

Email: say_fonh@hotmail.com

ແບບຟອມຍິນຍອມອາສາສະໜັກ

ຂ້າພະເຈົ້າ (ທ້າວ ນາງ) .....ນາມສະກຸນ .....ອາຍຸ .....ປີ
ຢູ່ບ້ານ .....ເມືອງ.....
ແຂວງ.....

ໄດ້ຮັບຄຳອະທິບາຍຈາກ **ທ້າວ ສາຍຝົນ ພັນມະນີ** ປະຈຸບັນກັ□ລັງສຶກສາໃນລະດັບປະຣິນຍາໂທ ໃນສາຂາວິທະຍາສາດໂລຫິດວິທະຍາຄຣີນິກ ຄະນະສາທະເວຊສາດຕ໌ ຈຸລາລົງກອນມະຫາວິທະຍາໄລ
ຂະນະນີ້ກຳລັງສຶກສາວິໄຈເລື້ອງ **ທາລັສ໌ຊີເມັຍແລະພາວະການຂາດເອນໄຊ G6PD ທີ່ຜິດປົກະຕິຂອງຄົນໄຂ້ນອກທີ່ເຂົ້າກວດໃນໂຮງໝໍມະໂຫສົດ ນະຄອນຫລວງວຽງຈັນ ສາທາລະນະລັດ ປະຊາທິປະໄຕ ປະຊາຊົນລາວ.**

ຂໍ້ຄວາມທີ່ອະທິບາຍເຖິງວັດຖຸປະສົງຂອງການວິໄຈ ເພື່ອໃຫ້ເປັນຜົນປະໂຫຍດອັນຊອບທ□າ ແກ່ປະຊາຊົນລາວ ແລະເພື່ອເປັນການປະກອບສ່ວນໃຫ້ໆການວິໄຈຄັ້ງນີ້ໃຫ້ສຳເລັດຜົນ, ຊຶ່ງມີການເກັບຂໍ້ມູນໂດຍໃຊ້ແບບສອບຖາມ ແລະເຈາະເກັບເລືອດໃນຈຳນວນ 3 ml ເພື່ອໃຊ້ໃນການກວດວິເຄາະຫາພະຍາດທາລັສ໌ຊີເມັຍແລະພາວະການຂາດເອນໄຊ G6PD ທີ່ຜິດປົກະຕິ ຈະໃຊ້ໄລຍະເວລາປະມານ 5 ນາທີ ເພື່ອເກັບຂໍ້ມູນ, ເກັບຕົວຢ່າງທີ່ໄດ້ຈະນຳໄປໃຊ້ໃນການສຶກສາຫາປັດໄຈຄວາມຊຸກຂອງພະຍາດທາລັສ໌ຊີເມັຍ ພາວະການຂາດເອນໄຊ G6PD ແລະກວດຫາພາວະຂາດທາດເຫລັກດັ່ງນັ້ນ ຂ້າພະເຈົ້າຈະເຂົ້າຮ່ວມດ້ວຍຄວາມສະໜັກໃຈ ແລະຂ້າພະເຈົ້າກໍ່ສາມາດຖອນຕົວຈາກການສຶກສານີ້ໄດ້ເມື່ອຂ້າພະເຈົ້າບໍ່ປະຖະໜາແລະເກີດມີເຫດການທີ່ບໍ່ເອື້ອອຳນວຍຄວາມສະດວກໃຫ້ແກ່ຕົວຂ້າພະເຈົ້າເອງ.

ຂ້າພະເຈົ້າ ອ່ານແລະເຂົ້າໃຈຕາມຄຳອະທິບາຍຂ້າງເທິງ ແລ້ວຈຶ່ງໄດ້ລົງນາມຍິນຍອມເຂົ້າຮ່ວມ ໂຄງການວິໄຈຄັ້ງນີ້ດ້ວຍສະໜັກໃຈ

ວັນທີ.....ເດືອນ.....
ປີ.....

ລົງລາຍເຊັນ.....
(.....)

ລາຍເຊັນພະຍານ.....
(.....)

ແບບຟອມສອບຖາມ:

ວັນທີ.....ເດືອນ.....ປີ 2013

ຊື່ແລະນາມສະກຸນ..... ☐ ຍິງ..... ☐ ຊາຍ

ວັນເດືອນປີເກີດ...../...../.....ອາຍຸ.....ປີ

ບ້ານເກີດ.....ເມືອງ.....ແຂວງ.....

ປະຈຸບັນຢູ່ບ້ານ.....ຫນ່ວຍ.....ເມືອງ.....ແຂວງ

.....

ອາຊີບ..... ☐ ພະນັກງານລັດ..... ☐ ເອກະສົນ..... ☐ ນັກສຶກສາ..... ☐ ອາຊີບອື່ນໆ.

ທ່ານເຄີຍມີພະຍາດປະຈຳໂຕບໍ່

.....

- ບ້ານເກີດພໍ່.....ເມືອງ.....ແຂວງ
  .....

ເຊື້ອຊາດມາຈາກ.....ສັນຊາດ.....

- ບ້ານເກີດແມ່.....ເມືອງ.....ແຂວງ
  .....

ເຊື້ອຊາດມາຈາກ.....ສັນຊາດ.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย สายฝน พันธ์มณี เกิดเมื่อวันที่ 9 กันยายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด สะหวันนะเขต สำเร็จการศึกษาละดับปริญญาบัณฑิต (เทดนิดการแพทย์) จากมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ นครหลวงเวียงจันท์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เมื่อปีการศึกษา 2550 จากนั้นได้เข้าทำงานเป็นเจ้าหน้าที่ในมหาวิทยาลัยวิทยาศาสตร์ สุขภาพ นครหลวงเวียงจันท์ ต่อมาในปี พ.ศ. 2554 ได้รับทุนการศึกษาให้เข้าศึกษาในหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โลหิตวิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นทุนประเทศเพื่อนบ้าน และ ในปี พ.ศ 2557 ได้รับทุนวิจัยจากทุน 90 ปี กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University