



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

บีตาโกลบินยีนแอสโพไทป์และไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอโพลี
มอร์ฟิสมของชนกลุ่มน้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ
ประเทศไทย

*β -globin gene haplotypes and mitochondrial DNA
polymorphisms in small ethnic groups in the northeastern
parts of Thailand*

โดย

รศ. กุลนภา พู่เจริญ

พฤศจิกายน 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

บีตาโกลบินยีนแอฟโพลไทป์และไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอโพลี
มอร์ฟิสมของชนกลุ่มน้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ
ประเทศไทย

*β -globin gene haplotypes and mitochondrial DNA
polymorphisms in small ethnic groups in the northeastern
parts of Thailand*

โดย

รศ. กุลนภา ฟูเจริญ

ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
• สารบัญ	I
• สารบัญตาราง	II
• สารบัญรูป	III
• กิตติกรรมประกาศ	IV
• บทคัดย่อ	V
• Abstract	VI
• บทนำ	1
• วัตถุประสงค์	5
• วิธีการและผลการศึกษา	5
• วิจัยและสรุปผลการศึกษา	24
• เอกสารอ้างอิง	28
• Research output	33

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 Incidences and gene frequencies of HbE among 10 ethnic group in Northeast Thailand	10
Table 2 β^A -globin gene haplotypes among 10 ethnic groups in Northeast Thailand	11
Table 3 β^E -globin gene haplotypes among 10 ethnic groups in Northeast Thailand	12
Table 4 Gene frequencies of each β^E -globin gene haplotypes among 10 ethnic groups in Northeast Thailand	13
Table 5 Distance matrix(D_A) of β^E -globin gene haplotypes between 10 ethnic group in Northeast Thailand	14
Table 6 Frequency of the region V 9bp deletion polymorphism of mtDNA	17
Table 7 Estimates of interpopulational(d_{xy}), intrapopulational(d_x or d_y) and $net(d_A)$ nucleotide diversity among 10 ethnic groups in Northeast Thailand	18
Table 8 The distribution of 10 ethnic groups in each monophyletic cluster of the phylogenetic tree	21

สารบัญรูป

หน้า

Figure 1 Map of Thailand indicating the place where each ethnic group studied.	8
Figure 2 The organization of β -globin gene cluster and the positions of seven polymorphic sites used in the construction of β -globin gene haplotypes.	9
Figure 3 Neighbour-joining(NJ) tree showing the relationships of the 10 ethnic groups in Northeast Thailand based on d_A distances of β^E -globin gene haplotypes.	15
Figure 4 UPGMA tree showing the relationships of the 10 ethnic groups in Northeast Thailand based on d_A distances of β^E -globin gene haplotypes.	16
Figure 5 Phylogenetic tree showing the 269 mtDNA lineages from 10 ethnic groups in Northeast Thailand. The ten distinct clusters in the tree are indicated by brackets with cluster numbers C1-C10.	19
Figure 6 Neighbour-joining(NJ) tree showing the relationships of the 10 ethnic groups in Northeast Thailand based on d_A distances of mtDNA.	22
Figure 7 UPGMA tree showing the relationships of the 10 ethnic groups in Northeast Thailand based on d_A distances of mtDNA.	23

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนการทำวิจัยเรื่องนี้ ขอขอบคุณ รศ.สุวิทย์ ชีรสอวต ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการค้นคว้าข้อมูลและให้ข้อมูลต่างๆเกี่ยวกับประวัติศาสตร์ชนกลุ่มน้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ตลอดจนให้คำแนะนำในการติดต่อผู้ประสานงานเพื่อการเข้าไปเก็บตัวอย่างเลือดในพื้นที่บางกลุ่มชน ขอขอบคุณ ผศ.ดนุพล ไชยสินธ์ วิทยาลัยครูเลย อาจารย์ ณรงค์ อุปัญญา โรงเรียนหนองสูงวิทยาจังหวัดมุกดาหาร รศ.พรรณี ชินธรักษ์ คุณประยุทธ์ ศรีวิไล คุณอรศรี สุยะสุนานนท์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คุณเนาวรัตน์ จันทรสุวรรณ คุณสัมฤทธิ์ แดงวิบูลย์ คุณจำเนียร กิ่งแก้ว คุณสุภาพ บุญสา คุณปนัดดา ลาแสง และคุณจันทร์เพ็ญ รัชธานีและท่านอื่นๆที่ช่วยกรุณาประสานงานในการเก็บตัวอย่างเลือด

ขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย ขอขอบคุณคณาจารย์กลุ่มวิจัยธาลัสซีเมีย คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผศ.กนกวรรณ แสนไชยสุริยา ผศ.ณัฐยา แซ่อึ้ง ตลอดจนนักศึกษาปริญญาโทและตรี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยออกพื้นที่เก็บตัวอย่างเลือด และช่วยดำเนินการวิจัยบางส่วน

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยคำปรึกษา แนะนำและช่วยเหลือจาก Professor Dr.Satoshi Horai The Graduated University for Advanced Studies, Japan และ รศ.ดร.สุพรรณ พูเจริญ คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตลอดจนท่านผู้ทรงคุณวุฒิของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำด้วยดีมาโดยตลอด

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RSA 14/2540

ชื่อโครงการ บิตาโกลบินยีนแอฟโพลไทป์และไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสม
ของชนกลุ่มน้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย กุลนภา พู่เจริญ

E-mail Address Goonnapa@kku1.kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ ธันวาคม 2540 – พฤศจิกายน 2543

เนื่องจากประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย(อีสาน)มีอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอี(HbE)ซึ่งเป็น Hb ผิดปกติชนิดหนึ่งสูงกว่าภูมิภาคอื่นๆของประเทศ ดังนั้นเพื่อเป็นการศึกษาข้อมูลทางด้านประชากรพันธุศาสตร์ของ HbE และการกระจายของยีน HbE ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาอุบัติการณ์ ความถี่ของยีน HbE และ บิตาอีโกลบินยีนแอฟโพลไทป์ในกลุ่มชนต่างๆที่มีภูมิลำเนาในภาคอีสาน โดยบางกลุ่มชนที่ทำการศึกษาคือจะเป็นชนกลุ่มน้อยที่มีชนบทกรรมนิยมประเพณีวัฒนธรรมและภาษาพูดของกลุ่มเอง ประกอบด้วย ส่วยในจังหวัดสุรินทร์ ไทยเขมรจังหวัดบุรีรัมย์ โช้ ย้อ ผู้ไทย จังหวัดมุกดาหาร ไทยพวน ไทยดำ ไทยเลย จังหวัดเลย ไทยอีสาน และไทยจีน(อีสาน) ผลการศึกษาพบอุบัติการณ์ของ HbE ในทุกกลุ่ม โดยพบสูงมากกว่าร้อยละ 50 ในกลุ่ม ส่วย ไทยเขมร โช้ ย้อ และผู้ไทย ส่วนกลุ่มที่มีอุบัติการณ์ต่ำสุด(ร้อยละ 9.5)คือ ไทยจีน(อีสาน) โดยผลของบิตาอีโกลบินยีนแอฟโพลไทป์บ่งบอกว่าน่าจะมีแหล่งกำเนิดของ HbE 2 แหล่ง ที่มาจากทางตอนเหนือถึงกลางของลุ่มน้ำโขงเช่นที่พบในกลุ่ม โช้ ย้อ ผู้ไทย และกลุ่มอื่นๆซึ่งน่าจะมีอิทธิพลต่อประชากรในภาคอีสานมากกว่าอีกแหล่งที่มาจากทางตอนใต้ของลุ่มน้ำโขงเช่นที่พบในกลุ่ม ส่วยและไทยเขมร นอกจากนี้เพื่อเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มชนทั้ง 10 กลุ่ม ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษา ไมโตคอนเดรียโพลีมอร์ฟิสม ชนิด 9bp-deletion ที่จำเพาะต่อคนเอเชียในส่วน region V ด้วยวิธีพีซีอาร์ และในส่วน D-loop โดยการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยตรงที่เพิ่มจำนวนได้จากวิธีพีซีอาร์ นำไปวิเคราะห์ข้อมูล nucleotide substitution และ diversity เพื่อสร้าง phylogenetic trees ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มย้อและไทยพวนมีความสัมพันธ์กันน้อยที่สุดโดยที่ย้อจะใกล้ชิดกับไทยดำ ขณะที่ไทยพวนใกล้ชิดกับไทยเลยและไทยจีน(อีสาน) ส่วนไทยอีสาน ผู้ไทย โช้ ไทยเขมร และส่วย มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันและอยู่ระหว่างย้อ-ไทยดำและไทยพวน-ไทยเลย-ไทยจีน แสดงให้เห็นว่าบรรพบุรุษของประชากรไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือน่าจะมาจากอย่างน้อย2แหล่ง แหล่งหนึ่งสัมพันธ์กับคนจีนเช่นกลุ่ม ไทยพวน-ไทยเลย-ไทยจีน และแหล่งหนึ่งซึ่งอาจจะเป็นกลุ่มชนดั้งเดิมของภูมิภาคนี้ที่เคยตั้งถิ่นฐานบริเวณลุ่มน้ำโขงและมีอิทธิพลต่อการกระจาย HbE ให้กับประชากรในภาคอีสานเช่น ย้อ ผู้ไทย โช้และส่วย การศึกษาต่อไปในประชากรภูมิภาคอื่นๆของประเทศไทย น่าจะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับประวัติศาสตร์ชนชาติไทยได้เป็นอย่างดี

คำรหัส : ฮีโมโกลบินอี บิตาอีโกลบินยีนแอฟโพลไทป์ ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสม

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Abstract

Code	RSA 14 / 2540
Title of Project	β -globin gene haplotypes and mitochondrial DNA polymorphisms In small ethnic groups in the northeastern parts of Thailand
Researcher	Associate Professor Goonnapa Fucharoen
e-mail address	goonnapa@kku.ac.th
Duration	December 1997 – November 2000

Since the prevalence of hemoglobin E is exceptionally high among northeastern Thai population, the population genetic data including frequencies, distribution and β globin gene haplotypes were studied in 8 minor groups of Thai people living in northeast Thailand. These groups included Soui in Surin province, Thai-Khmer in Buriram province, So, Yor and PhuThai in Mukdahan province and Thai puan, Thai dam and Thai Loei in Loei province. The general Thai Esan and Chinese Thai living in this part of the country were also studied. The hemoglobin E were detected in all groups at different frequencies. The frequencies of more than 50 % were observed in Thai-Khmer, So, Yor and Phu Thai where as the lowest frequency of 9.5 % was found in the Chinese Thai population. β -globin gene haplotypes analysis indicated that there are at least two origins of hemoglobin E in these minor groups of Thai population; one was found in So, Yor and Phuthai and another was detected in Soui and Thai-Khmer. The mitochondrial DNA polymorphisms including an asian specific 9 bp deletion in the region V and the D-loop DNA polymorphisms were also studied using the polymerase chain reaction. Nucleotide substitutions and diversity were used for construction of phylogenetic trees. From these study it was found that Yor people is appeared to be more related to Thai dam. Thai puan is close to Thai Loei and Chinese Thai. Thai Esan, PhuThai, So, Thai-Khmer and Soui are all related groups forming a cluster between the Yor-Thai dam and Thai puan-Thai Loei-Chinese Thai. These data postulates that there may be at least two origin of ancestors of the northeast Thai population. One should relate with Chinese as Thai puan, Thai Loei and Chinese Thai. Another with much influence of hemoglobin E such as Yor, , Phuthai, So and Soui may originated from the native people living here along the Mae Kong river. Further study of the Thai people living in other parts of the country should provide a more insight into a population genetic study and a history of Thai population.

Key words : Hemoglobin E, β globin gene haplotype, mtDNA polymorphism, Northeast Thailand

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ตั้งอยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีประชากรประกอบด้วยกลุ่มชนชาติต่าง ๆ อย่างหลากหลาย เช่นเดียวกับประเทศอื่น ๆ ในแถบภูมิภาคนี้ สิ่งที่น่าสนใจที่สุดสำหรับประชาชนในภูมิภาคนี้ คือ มีความชุกของการตรวจพบฮีโมโกลบินผิดปกติและธาลัสซีเมีย ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของยีนบีตาโกลบินสูงมากจนเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ (1) และได้รับความสนใจในการศึกษามาโดยตลอด จึงมีข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ออกมามากมาย นักมนุษยพันธุศาสตร์ได้พยายามอาศัยข้อมูลทางพันธุศาสตร์เหล่านี้อธิบายถึงวิวัฒนาการและปัญหาเรื่องถิ่นกำเนิดคนไทย ซึ่งเชื่อกันมาโดยตลอดว่าบรรพบุรุษของชนชาติไทยในปัจจุบัน ได้อพยพมาจากบริเวณตอนใต้ของประเทศจีน แต่ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาในเรื่องฮีโมโกลบินอี ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดหนึ่งที่พบบ่อยในประเทศไทย ให้ข้อมูลที่ค่อนข้างขัดแย้งกัน กล่าวคือแม้จะสามารถตรวจพบความถี่ของฮีโมโกลบินในประเทศไทยสูงมาก กลับตรวจพบได้น้อยมากในกลุ่มคนทางตอนใต้ของประเทศจีนในปัจจุบัน จนทำให้นายแพทย์ประเวศ วะสี (2) ได้ตั้งข้อสงสัยเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายของฮีโมโกลบินกับสมมุติฐานเรื่อง ถิ่นกำเนิดคนไทยไว้ว่า การไม่พบฮีโมโกลบินอีในคนจีนทางใต้แต่กลับพบมากในคนไทย อาจแสดงว่าบรรพบุรุษของคนไทยไม่เคยอยู่ในประเทศจีนมาก่อน แต่เป็นกลุ่มคนพื้นเมืองของเอเชียอาคเนย์อยู่เดิมเช่นเดียวกับผลที่ได้จากการศึกษาความถี่ของการตรวจพบลักษณะทางพันธุกรรมอื่น ๆ เช่น ระบบหมู่เลือดเอเอนไซม์ต่าง ๆ และโปรตีนในซีรัม (3) ซึ่งเป็นความเห็นที่สอดคล้องกับข้อสันนิษฐานที่ได้จากการศึกษาทางด้านศิลปวัฒนธรรมของ ศรีศักร วัลลิโภดม (4) ซึ่งเชื่อว่าบรรพบุรุษของคนไทยไม่ได้มาจากทางตอนใต้ของประเทศจีน แต่เป็นกลุ่มคนที่สืบเชื้อสายมาจากบรรพชนหลายเผ่าพันธุ์หลายสัญชาติ และเป็นความหลากหลายที่สืบเนื่องที่เห็นได้ชัดทางประวัติศาสตร์ แต่ข้อสันนิษฐานเหล่านี้ก็ยังไม่เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง ในระยะหลังซึ่งได้มีความก้าวหน้าในการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับอนุภาคมากขึ้น เรื่องของฮีโมโกลบินอีและธาลัสซีเมียได้รับการศึกษาไปในอีกแนวทางหนึ่งในระดับลึกมากกว่าที่จะเป็นเพียงข้อมูลความถี่ของการตรวจพบเท่านั้น คือ สามารถเข้าไปศึกษาถึง background ของโครโมโซมที่มีความผิดปกติชนิดนี้ตั้งอยู่ การศึกษาตรงนี้เรียกว่าการศึกษาแอฟโฟลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน (β -globin gene haplotype) (5) ซึ่งได้จากการศึกษาโพลิมอร์ฟิสมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ของยีนชนิดต่าง ๆ บนกลุ่มยีนบีตาโกลบิน (β -globin gene cluster) บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ของคน (6) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งหลัง ๆ นี้จึงบอกถึงต้นกำเนิดของความผิดปกติของยีนบีตาโกลบินได้ดีกว่าข้อมูลความถี่ที่ตรวจพบจากการศึกษาในระดับโปรตีนแต่เพียงอย่างเดียว ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ยีนฮีโมโกลบินอีที่ตรวจพบในคนไทยนั้นอยู่บนโครโมโซมชนิดเดียวกับที่ตรวจพบในกลุ่มคนอื่นในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (7) อย่างไรก็ตามผลการศึกษายีนธาลัสซีเมียกลับให้ผลที่ขัดแย้งกัน กล่าวคือส่วนใหญ่ของยีนบีตาธาลัสซีเมียที่ตรวจพบในคนไทย (8-10) เป็นชนิดที่ตรวจพบได้

บ่อยในประเทศจีน และส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซมแอฟโพลไทป์ชนิดเดียวกันด้วย (12) จึงน่าจะมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน และหากเชื่อว่าบรรพบุรุษของคนไทยในปัจจุบันไม่ได้อพยพมาจากทางตอนใต้ของประเทศจีน คนไทยได้รับยีนบีตาธาลัสซีเมียเหล่านี้มาจากไหน ความขัดแย้งของข้อมูลเหล่านี้คงต้องการคำอธิบายที่เหมาะสมและวิธีที่จะได้มาซึ่งข้อสรุปที่น่าเชื่อถือน่าจะอยู่ที่การศึกษา genetic marker อื่น ๆ มาเปรียบเทียบ เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโพลีมอร์ฟิสมของกลุ่มยีนบีตาโกลบิน เป็นการศึกษานิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) จึงอาจมีปัญหาพื้นฐานอย่างหนึ่งเกี่ยวกับเรื่องรีคอมบิเนชัน (recombination) ที่เมื่อเกิดขึ้นแล้ว จะทำให้แอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินผิดไปจากเดิม การแปลผลจึงเปลี่ยนไป ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเอา genetic marker อีกตัวหนึ่งมาใช้ในการศึกษา คือโพลีมอร์ฟิสมบนไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA polymorphism) ซึ่งใช้ในการศึกษาต้นกำเนิดของกลุ่มชนชาติต่าง ๆ ได้ดี (13) เนื่องจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านทางแม่เท่านั้น (maternal inherited) จึงไม่เกิดรีคอมบิเนชัน อีกทั้งยังสะสมโพลีมอร์ฟิสมไว้มากกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และมีขนาดเล็ก การศึกษาไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอร่วมด้วย จึงน่าจะ ให้ข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของกลุ่มชนชาติต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจาก การศึกษาเรื่องนี้ในกลุ่มชนที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคต่าง ๆ จำนวน 5 กลุ่ม 5 ภูมิภาคของประเทศไทย ที่มีความแตกต่างกันทั้งทางด้านชีวิตความเป็นอยู่ ขนบธรรมเนียมประเพณีวัฒนธรรมและภาษาพูดที่ผู้วิจัยได้รับทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นที่ 1 นั้น พบข้อมูลที่น่าสนใจโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของบีตาโกลบินยีนแอฟโพลไทป์นั้นทำให้ทราบว่าอีโมโกลบินอีที่พบความถี่สูงในประชากรไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและบริเวณรอยต่อระหว่างไทย ลาว เขมรนั้น มีแหล่งกำเนิดอย่างน้อย 2 แหล่งที่ต่างกันโดยหนึ่งในจำนวนนั้นเป็นแหล่งที่แพร่กระจายยีนอีโมโกลบินอีไปสู่ประชากรในภูมิภาคอื่นๆของประเทศไทย ประกอบกับจากการที่ผู้วิจัยได้มีโอกาสพบปะแลกเปลี่ยนความคิดเห็นกับนักประวัติศาสตร์ร่วมกับการอ่านผลงานวิจัยและบทความต่างๆเกี่ยวกับประวัติศาสตร์อีสาน ทำให้ทราบว่ายังมีกลุ่มชนอีกเป็นจำนวนมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและบริเวณใกล้เคียงที่ยังรักษาขนบธรรมเนียม ประเพณี วัฒนธรรมและภาษาพูดของกลุ่มไว้ได้เป็นอย่างดี (14,15)เช่น ส่วย จังหวัดสุรินทร์ ไทยเขมรจังหวัดบุรีรัมย์ โซจังหวัดมุกดาหาร ย้อในจังหวัดมุกดาหาร ไทยพวนในจังหวัดเลย ไทยดำจังหวัดเลย ไทยเลยจังหวัดเลย เป็นต้น ซึ่งนักประวัติศาสตร์หลายท่านเชื่อว่าคนไทยในอีสานนี้แหละคือคนไทยดั้งเดิม ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเข้าไปศึกษาในกลุ่มชนที่อาศัยอยู่ในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือเหล่านี้ ซึ่งน่า จะมีการกระจายของอีโมโกลบินอีสูง มาทำการศึกษาบีตาโกลบินยีนแอฟโพลไทป์ โดยคาดว่าผล ที่ได้น่าจะให้ความรู้ความเข้าใจในเรื่องการกระจายของยีนอีโมโกลบินอีในภูมิภาคนี้ได้กระจ่างขึ้น ร่วมกับการศึกษาไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสมน่าจะเสริมให้ทราบข้อมูลเรื่องความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาได้เป็นอย่างดี และเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะช่วยอธิบายถึงวิวัฒนาการและประเด็นปัญหาถิ่นกำเนิดของคนไทยให้มีความกระจ่างขึ้นในอนาคตด้วย นอกจากนี้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับอีโมโกลบินจะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการศึกษาอีโมโกลบินผิดปกติและธาลัสซีเมียอันจะนำไป

สู่การควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดรุนแรงในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนืออย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาความถี่ของฮีโมโกลบินผิดปกติโดยเฉพาะฮีโมโกลบินอีและบีตาธาลัสซีเมียในประเทศไทยนั้น ข้อมูลในระยะแรก ๆ ได้จากการศึกษาของศาสตราจารย์ พญ.คุณสุภา ฤ นกร และคณะ (16) เป็นส่วนใหญ่ ข้อมูลแสดงให้เห็นชัดเจนว่าฮีโมโกลบินอีที่ตรวจพบในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยนั้น มีอัตราการตรวจพบแตกต่างกัน ตั้งแต่ประมาณร้อยละ 13 ในภาคกลางไปจนถึงร้อยละ 50-60 ในกลุ่มคนไทยเชื้อสายเขมรที่อาศัยอยู่ในเขตจังหวัดสุรินทร์ อัตราการตรวจพบลดลงในภาคเหนือและภาคใต้ และตรวจไม่พบในกลุ่มชาวเขาเผ่าต่าง ๆ เช่น เผ่ามั่ว เย้า และมูเซอ รวมทั้งคนยองในภาคเหนือ (17) ในกลุ่มคนเชื้อสายจีนที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยเอง ตรวจ พบความถี่ของฮีโมโกลบินอีน้อยกว่า 1 ใน 1,000 (18) ตรวจพบได้ประมาณร้อยละ 28 ในทางเหนือของลาว และร้อยละ 40-50 ทางตอนใต้ (19) ส่วนในประเทศกัมพูชาโดยทั่วไปพบได้สูงประมาณร้อยละ 32.4 ข้อมูลข้างต้นทำให้ได้ข้อสรุปคร่าว ๆ ว่าสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินอีได้สูงมากกว่าร้อยละ 50 บริเวณรอยต่อระหว่างไทย ลาว และเขมร ซึ่งถูกเรียกว่าบริเวณสามเหลี่ยมฮีโมโกลบินอี (hemoglobin E triangle) (20) ส่วนในเวียดนาม พบได้ประมาณร้อยละ 2-5 เท่านั้น เช่นเดียวกับความถี่ที่ตรวจพบได้ในประชากรทั่วไปของมาเลเซียและอินโดนีเซีย ซึ่งพบได้น้อยกว่าร้อยละ 5 (21) ส่วนทางตอนเหนือของทวีปเอเชีย เช่น ในประเทศญี่ปุ่น เกาหลีและจีนนั้นพบได้ น้อยมาก ข้อสันนิษฐานจึงมีอยู่ว่าฮีโมโกลบินอีเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีอยู่ก่อนแล้วในแถบภูมิภาคที่เป็นไทย ลาวและเขมรในปัจจุบันและไม่ได้นำเข้ามาจากตอนใต้ของประเทศจีน

ต่อมามีการศึกษาดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสมขึ้นในกลุ่มยีนบีตาโกลบินโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีการที่เรียกว่า restriction fragment length polymorphism (RFLP) (22) ทำให้สามารถแบ่งโครโมโซมที่มีบีตาโกลบินยีนออกเป็นชนิดต่าง ๆ เรียกว่าแฮพโลไทป์(haplotype) และเฟรมเวอร์ค (framework) ข้อมูลเกี่ยวกับแฮพโลไทป์และเฟรมเวอร์คของโครโมโซมที่มีความผิดปกติของยีน บีตาโกลบิน ได้ช่วยให้ความกระจ่างในเรื่องต้นกำเนิดของยีนตลอดจน ethnic origin ของกลุ่มชนต่าง ๆ ที่การศึกษาได้เป็นอย่างดี (23,24) สำหรับในประเทศไทยนั้น เมื่อมีการศึกษายีนบีตาธาลัสซีเมียในประเทศไทยมากขึ้น ก็พบว่าบีตาธาลัสซีเมียในคนไทยเกิดจากความผิดปกติของยีนบีตาโกลบินได้มากมายหลายชนิด (8-11) แม้จะมีบางชนิดที่ไม่เคยมีรายงานในกลุ่มชนอื่นมาก่อนก็เป็นชนิดที่ตรวจพบได้ไม่บ่อย ที่เหลือเกือบทั้งหมดเป็นชนิดที่ตรวจพบได้ในคนจีน (25,26) การศึกษาถึงบีตาโกลบินยีนแฮพโลไทป์และเฟรมเวอร์ค ล้วนบ่งชี้ว่ายีนบีตาธาลัสซีเมียที่ตรวจพบในคนไทยนั้นน่าจะได้รับมาจากคนจีนแทบทั้งสิ้น (11,12) แต่สำหรับฮีโมโกลบินอีนั้น Antonarakis และคณะ (27) ได้พบว่า ฮีโมโกลบินอีที่ตรวจพบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้น อยู่บนโครโมโซมชนิดเฟรมเวอร์ค 2 และ 3 และตั้งข้อสันนิษฐานว่าอย่าง

น้อยคงจะมีต้นกำเนิดของอีโมโกลบินอีอยู่ 2 ต้นกำเนิดที่เป็นอิสระต่อกัน ต่อมาอีโมโกลบินอีแอฟโฟโลไทป์ได้รับการศึกษามากขึ้นในคนไทย กัมพูชาและเวียดนาม (7,28,29) พบว่า ในกลุ่มคนเขมรอีโมโกลบินอีส่วนใหญ่จะอยู่บนโครโมโซมเฟรมเวอร์ค 3 ส่วนในคนไทยนั้นส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซมเฟรมเวอร์ค 2 ซึ่งเป็นคนละชนิดกันสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผู้วิจัย(30) พบในกลุ่มคนของจังหวัดจันทบุรีติดประเทศเขมรและคนไทย จังหวัดมุกดาหารติดประเทศลาวตามลำดับส่วนชนกลุ่มน้อยภูมิภาคอื่นๆที่ผู้วิจัยทำการศึกษาคือ ไทยภูเขาจังหวัดเชียงใหม่ ลาวโซ่งจังหวัดสุพรรณบุรี และชาวกูยจังหวัดตรัง พบความถี่ของยีนอีโมโกลบินอีต่ำกว่าประชากรไทยทั่วไปโดยอีโมโกลบินอีที่พบอยู่บนโครโมโซมเฟรมเวอร์ค 2 เช่นเดียวกับผู้ไทยและคนลาวในเขตหลวงพระบาง(31) ผลที่ได้จึงน่าจะสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ว่าคนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นคนไทยดั้งเดิมที่อยู่ในพื้นที่นี้มานานแล้วและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับคนลาว ก่อนที่จะมีการอพยพคนไทยบางส่วนมาจากทางตอนใต้ของประเทศจีน ข้อมูลที่ขัดแย้งกันระหว่าง ผลการศึกษาอีโมโกลบินอีและบีตาธาลัสซีเมียจึงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้คำอธิบายที่เหมาะสมต่อไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเข้าไปศึกษาในชนกลุ่มน้อยภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีความถี่ของยีนอีโมโกลบินอีสูงน่าจะให้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้น

สำหรับในเรื่องของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ นั้น หลังจากที่ได้มีรายงานการศึกษาโครงสร้างและลำดับเบสของไมโตคอนเดรียจีโนมแล้ว(32) มีการนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาเกี่ยวกับ ethnic origin ของกลุ่มชนต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เนื่องจากไม่มีปัญหาเรื่อง recombination เข้ามาเกี่ยวข้อง(13) เช่น ญี่ปุ่น (33) อัฟริกา (34) อเมริกา (35) และกลุ่มคนในหมู่เกาะโพลินีเซียน (36) เป็นต้น แต่การศึกษาในประเทศไทยยังมีรายงานออกมาน้อยมาก อาจเป็นเพราะในระยะแรก ๆ การศึกษาทำได้ค่อนข้างลำบาก เนื่องจากความยุ่งยากของวิธีการในการเตรียมไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ต่อมา มีการประยุกต์เทคนิคโพลีเมอร์เชนรีแอคชันหรือพีซีอาร์ (37) เข้ามาช่วยในการศึกษา ทำให้การศึกษาทำได้ง่ายและสะดวกขึ้น เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเม็ดเลือดขาวและใช้สำหรับศึกษาโพลีเมอร์พีสมของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ นั้น สามารถนำมาใช้ในการศึกษาไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอได้เลย (38) การศึกษานี้ อาจทำได้โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (39) การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ (40) และการตรวจหาลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโดยตรง (41) การนำเอาเทคนิคเหล่านี้มาใช้ศึกษาในคนไทยเพื่อหาความสัมพันธ์เทียบกับโพลีเมอร์พีสมของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ น่าจะให้ข้อมูลที่นำไปสู่ข้อสรุปที่สำคัญเกี่ยวกับประวัติศาสตร์ชนชาติไทยได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาชนิดของอีโมโกลบิน บีตาโกลบิน ยีน แสฟโพลไทป์และไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟิสมในชนกลุ่มน้อยที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
2. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ในเชิงประชากรพันธุศาสตร์เพื่อดูความสัมพันธ์ในระหว่างกลุ่มชนที่ทำการศึกษา และกลุ่มชนอื่นๆที่มีข้อมูลอยู่แล้ว

วิธีการศึกษาและผลการศึกษา

1. ตัวอย่างเลือด

ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดกลุ่มชนต่างๆที่อาศัยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือคนละ 1 มิลลิลิตรโดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งผ่านผู้ประสานงานในพื้นที่ของแต่ละกลุ่มเพื่อการสัมภาษณ์ความสัมพันธ์กันในครอบครัวและเพื่อการคัดเลือกตัวอย่างในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยได้ตัวอย่างเลือดที่ไม่มีความสัมพันธ์กันในครอบครัวมาทำการศึกษาทั้งสิ้น 10 กลุ่ม(รูปที่ 1) ดังนี้

- 1.1 ส่วย (กูย) ตำบลกระโพ อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ จำนวน 78 ตัวอย่าง
- 1.2 ไทยเขมร ตำบลหนองใหญ่ อำเภอสัตึก จังหวัดบุรีรัมย์ จำนวน 77 ตัวอย่าง
- 1.3 โซ่ ตำบลดงหลวง อำเภอดงหลวง จังหวัดมุกดาหาร จำนวน 47 ตัวอย่าง
- 1.4 ย้อ ตำบลดงเย็น อำเภอเมือง จังหวัดมุกดาหาร จำนวน 86 ตัวอย่าง
- 1.5 ผู้ไทย ตำบลหนองสูง อำเภอกำชะอี จังหวัดมุกดาหาร จำนวน 31 ตัวอย่าง
- 1.6 ไทยพวน ตำบลปากตม อำเภอเซียงคาน จังหวัดเลยจำนวน 68 ตัวอย่าง
- 1.7 ไทยเลย ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดเลย จำนวน 39 ตัวอย่าง
- 1.8 ไทยดำ ตำบลเขาแก้ว อำเภอเซียงคาน จังหวัดเลย จำนวน 52 ตัวอย่าง
- 1.9 ไทยอีสาน นักศึกษามหาวิทยาลัยขอนแก่นที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 235 ตัวอย่าง
- 1.10 ไทยจีน นักศึกษามหาวิทยาลัยขอนแก่นที่มีภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือบิดาและมารดามีเชื้อชาติจีน จำนวน 42 ตัวอย่าง

2. การตรวจวิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบิน

ตัวอย่างเลือดที่ได้จะนำไปแยกเอาส่วนที่เป็นเม็ดเลือดแดงเตรียมเป็นน้ำละลายฮีโมโกลบิน (hemolysate) ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดฮีโมโกลบินด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่น เซลลูโลสอะซีเตท (cellulose acetate electrophoresis)(42) เพื่อหาอุบัติการณ์(incidence) และความถี่ของยีน(gene frequency)ฮีโมโกลบินอี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่า กลุ่มชนที่มีอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินอีสูงกว่าร้อยละ 50 และมีความถี่ของยีนฮีโมโกลบินอี มากกว่า 0.3 คือกลุ่ม ส่วย ไทยเขมร โซ ย้อ และ ผู้ไทย ส่วนกลุ่มที่พบอุบัติการณ์และความถี่ของฮีโมโกลบินอีต่ำที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือกลุ่มคนไทยจีนที่มีภูมิสำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

3. การศึกษาบีตาโกลบินยีนแอฟโพลไทป์

เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากตัวอย่างเลือดจะนำไปเตรียมเป็น ดีเอ็นเอ(43) เพื่อนำไปทำการศึกษายีนบีตาโกลบินยีนแอฟโพลไทป์ในกลุ่มยีนบีตาโกลบินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีอยู่ 7 ตำแหน่งคือ Hinc II บริเวณ 5' ϵ -globin gene Hind III ใน γ -globin gene Hind III ใน γ -globin gene Hinc II ใน $\psi\beta$ -globin gene Hinc II ใน 3' $\psi\beta$ -globin gene Ava II ใน β -globin gene และ Bam HI ในบริเวณ 3' β -globin gene (รูปที่ 2) นำไปศึกษาแถบของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) (12,30)โดย 5 ตำแหน่งแรกเรียกว่า 5'haplotypes ส่วน 2 ตำแหน่งสุดท้ายเรียกว่า 3' haplotypes หรือ β -globin gene framework ซึ่งพบอยู่ 3 framework คือ framework 1 (Ava + , BamHI +) framework 2 (Ava + , BamHI -) และ framework 3 (Ava - , BamHI +) ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมที่สัมพันธ์กับ β^A -globin gene haplotypes รูปแบบต่างๆของแต่ละกลุ่มชนซึ่งพบว่าส่วนมากในทุกกลุ่มชนจะสัมพันธ์กับ 5'haplotypes แบบ + - - - - บน chromosome framework ทั้ง 1, 2 และ 3 ส่วนตารางที่ 3 แสดงจำนวนโครโมโซมที่สัมพันธ์กับ β^E -globin gene haplotypes รูปแบบต่างๆของแต่ละกลุ่มชนซึ่งพบว่าส่วนมากในทุกกลุ่มชนจะสัมพันธ์กับ 5'haplotypes แบบ - + - + + บน chromosome framework 2 ยกเว้นในกลุ่มส่วยและไทยเขมรที่พบว่าประมาณร้อยละ 30 ของจำนวนโครโมโซมที่ทำการศึกษามีความสัมพันธ์กับ chromosome framework 3 จากตารางที่ 3 สามารถคำนวณ gene frequency ของ haplotypes แต่ละแบบที่สัมพันธ์กับ HbE ในแต่ละกลุ่มชนได้ดังแสดงในตารางที่ 4 เพื่อนำไปหาค่า genetic distance (D_A) (44,45) ระหว่างกลุ่มชน (ตารางที่ 5) แล้วสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) (46) (รูปที่ 3) และ วิธี unweight pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) (47) (รูปที่ 4) ด้วยโปรแกรม NJBAFD ของ Takazaki N (48)

4. การศึกษาโพลีมอร์ฟิสมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอชนิดเบสหายไป 9 เบส ที่จำเพาะต่อคนเอเชีย(Asian specific 9bp deletion)

ตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3 ได้แบ่งมาทำการศึกษา 9bp-deletion ใน region V ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (36) แล้วนำไปศึกษาแถบของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ โดยการทำนูซีฟว์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (NuSieve gel electrophoresis) ถ้าไม่มีการหายไปของแถบเบส 9 เบส จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 100 เบส ถ้ามีการหายไปของเบส 9 เบส จะพบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 91 เบส โดยทำการศึกษาในทุกตัวอย่างได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งเป็นตารางเปรียบเทียบผลปฏิบัติการของ 9bp deletion ในกลุ่มชนต่าง ๆ ที่เคยมีรายงานแล้ว

5. การศึกษาโพลีมอร์ฟิสมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ในส่วน D-loop Major noncoding region

ตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 2 จำนวน 269 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย ส่วย 25 ตัวอย่าง ไทยเขมร 25 ตัวอย่าง โซ 25 ตัวอย่าง ย้อ 25 ตัวอย่าง ผู้ไทย 25 ตัวอย่าง ไทยพวน 25 ตัวอย่าง ไทยเลย 25 ตัวอย่าง ไทยดำ 25 ตัวอย่าง ไทยอีสาน 44 ตัวอย่าง และไทยจีน(อีสาน) 25 ตัวอย่าง ได้นำมาศึกษาโพลีมอร์ฟิสมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ในส่วน D-loop major noncoding region โดยการทำ direct DNA sequencing จาก PCR product (49) ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer PERKIN ELMER แล้ววิเคราะห์ข้อมูลเพื่อดูชนิดและความถี่ของมิวเตชันเทียบกับ reference sequence ของ Anderson S. (32) เพื่อหาค่า nucleotide substitution per site ของแต่ละรายด้วยหลักการของ Kimura's two parameter model of nucleotide substitution (50) นำไปสร้าง phylogenetic tree ของประชากรทั้ง 269 ตัวอย่างด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) (46) (รูปที่ 5) จากนั้นทำการวิเคราะห์ nucleotide diversity ภายในกลุ่มชน และระหว่างกลุ่มชนทั้ง 10 กลุ่ม(ตารางที่7) เพื่อสร้าง phylogenetic tree ระหว่างประชากรที่ทำการศึกษาทั้ง 10 กลุ่ม ด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) (46) (รูปที่ 6) และ phylogenetic dendrogram (รูปที่ 7) ด้วยวิธี unweight pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) (47)

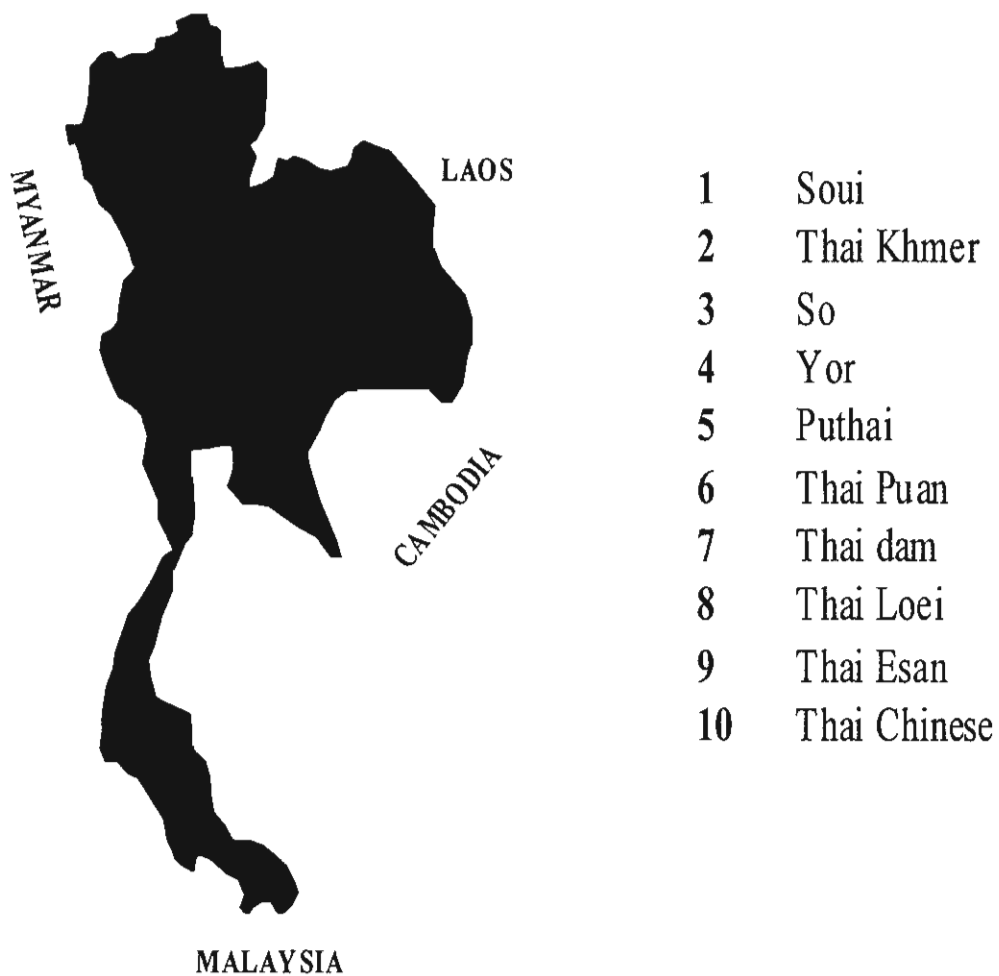


Figure1 Map of Thailand indicating the place where each ethnic groups studied was inhabit.

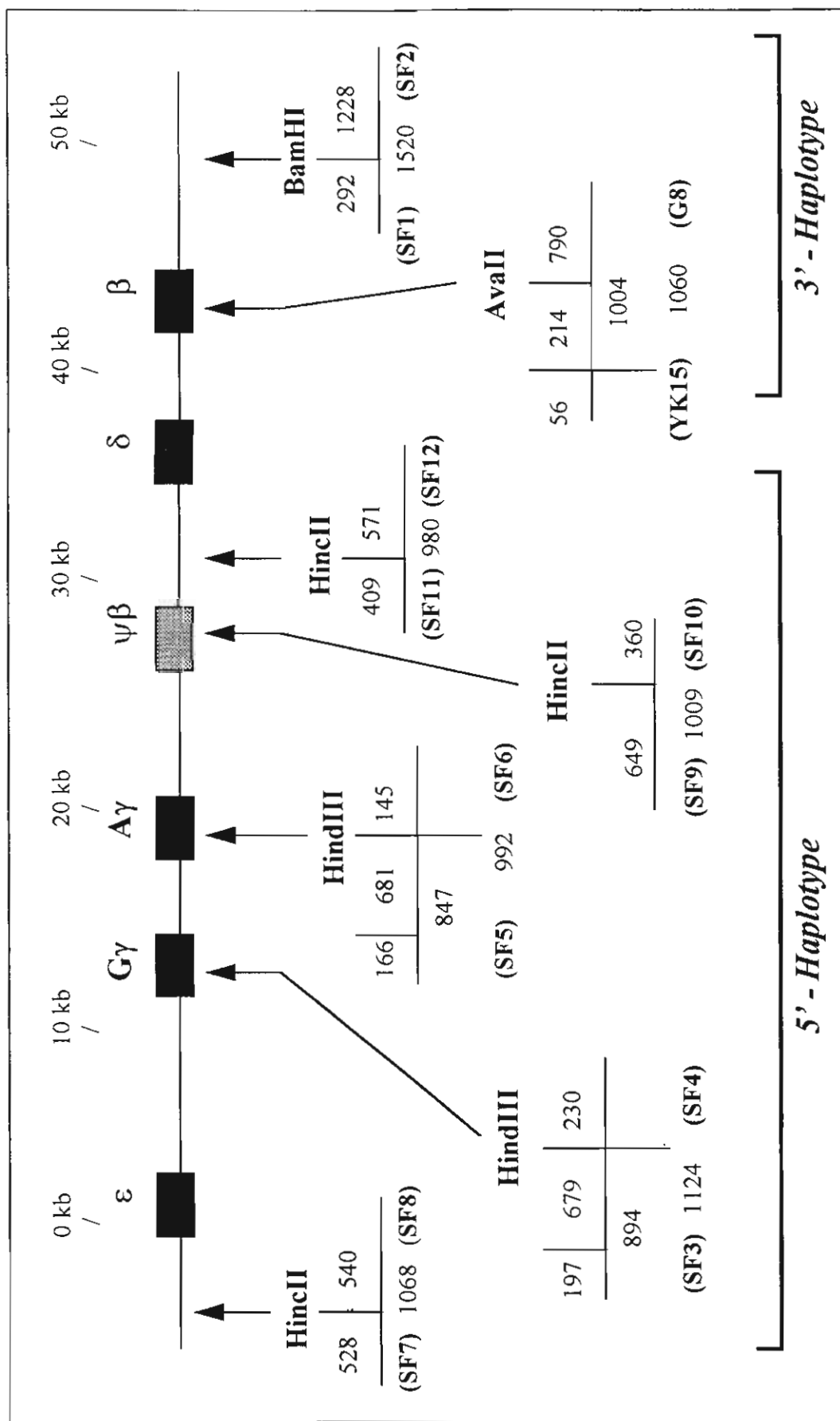


Figure 2 The organization of β -globin gene cluster and the positions of seven polymorphic sites used in the construction of β -globin gene haplotypes. The region amplified by the PCR are indicated. Number along the lines are the length in base pair of either undigested or digested fragments. The name of each primer used is shown in parentheses.

Table 1 Incidences and gene frequencies of HbE among 10 ethnic groups in Northeast Thailand

Ethnic groups	No	Incidences	Gene frequencies
Souei	78	65.9	0.37
Thai Khmer	77	53.2	0.33
So	47	59.6	0.35
Yor	50	57.0	0.31
Phuthai	31	51.6	0.31
Thai Phuan	68	42.6	0.23
Thai Loei	39	35.9	0.18
Thai Dam	52	21.4	0.12
Thai Esan	235	27.9	0.15
Thai Chinese	42	9.5	0.05

Table 2 β^A -globin gene haplotypes among 10 ethnic groups in Northeast Thailand

β^A -globin gene haplotypes	Frameworks	Souei	Thai Khmer	So	Yor	Phuthai	Thai Phuan	Thai Loei	Thai Dam	Thai Esan	Thai Chinese
(+-----++)	1	2	4	12	7	5	7	8	8	8	18
(-+-+++++)	1	0	0	1	0	1	0	0	4	3	0
(+-----+-)	2	20	19	27	19	28	11	17	15	8	19
(-+-++++-)	2	2	2	5	8	1	2	1	3	8	1
(+-----+)	3	9	17	11	24	5	17	30	33	0	20
(-+-++++-)	3	4	1	1	4	1	3	5	3	0	1
Total No of chromosome		37	43	57	62	41	40	61	66	27	59

Table 3 β^E -globin gene haplotypes among 10 ethnic groups in Northeast Thailand

β^E -globin gene haplotypes	Frameworks	Souei	Thai Khmer	So	Yor	Phuthai	Thai Phuan	Thai Loei	Thai Dam	Thai Esan	Thai Chinese
(+ - - - - + +)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
(- + - - + + + +)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(+ - - - - + -)	2	5	5	8	9	5	4	2	5	38	2
(- + - - + + + -)	2	11	21	23	39	13	9	10	5	130	1
(+ - - - - + +)	3	3	2	0	0	1	1	2	0	4	1
(- + - - + + + +)	3	12	9	0	0	0	0	0	0	0	0
Total No of chromosome		31	37	31	48	19	14	15	10	173	4