



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาต้นกำเนิดทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติ
ที่พบได้น้อยของประเทศไทย

โดย

ดร. วรณรัตน์ แซ่ซั่น คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศ.นพ.สุทัศน์ ฟูเจริญ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ผศ.ดร. จำรงค์ นพรัตน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2561

สัญญาเลขที่ TRG5480001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาต้นกำเนิดทางพันธุกรรมของอีโมโกลบินผิดปกติ

ที่พบได้น้อยของประเทศไทย

โดย

ดร. วรณรัตน์ แซ่ซุ่น คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศ.นพ.สุทัศน์ ฟูเจริญ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

ผศ.ดร. จำรงค์ นพรัตน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและทุนอุดหนุนการ
วิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการศึกษาต้นกำเนิดทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อยของประเทศ
ไทย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทีมงานจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย
สงขลานครินทร์ ประกอบด้วยเจ้าหน้าที่หน่วยโลหิตวิทยา ในการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา และ
ค่า Hemoglobin typing ของตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติ นายศตรณ กาญจนโอภาส และเจ้าหน้าที่
หน่วยธาลัสซีเมีย ในการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอฮีโมโกลบินผิดปกติ และช่วยเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการ
ทำวิจัย และขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอฮีโมโกลบินผิดปกติจาก อาจารย์นายแพทย์
ชนินทร์ ลิ้มวงศ์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล คุณมนต์
จันทร์ ศิริคง คุณชมพูนุช กาญจนากร ศูนย์ธาลัสซีเมียโรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราช
พยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี จินดาดำรงเวช คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาล
รามธิบดีมหาวิทยาลัย มหิดล คุณสิริภากร แสงกิจพร ศูนย์วิจัยทางคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูง
สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้

ดร. วรณรัตน์ แซ่ซุ่น

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5480001

ชื่อโครงการ : การศึกษาต้นกำเนิดทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อย
ของประเทศไทย

คณะผู้วิจัย : วรรณรัตน์ แซ่ซั่น (ดร.)¹, สุทัศน์ ฟูเจริญ (ศ.นพ.)², จำนงค์ นพรัตน์ (ผศ.ดร.)¹,

1 : คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์,

2 : สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล

วิทยาเขตศาลายา

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2554 – 30 มิถุนายน 2561

ฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นภาวะทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา เกิดขึ้นเนื่องจากยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเบต้าผิดปกติไปมีผลทำให้มีความผิดปกติในแง่คุณภาพของฮีโมโกลบิน ปัจจุบันมีรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทั่วโลกมากกว่า 1,300 ชนิด สำหรับในประเทศไทยพบแล้วมากกว่า 35 ชนิด เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อยของประเทศไทย กับจุดกำเนิดทางเชื้อชาติของกลุ่มประชากร ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C จำนวน 36 ราย ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak จำนวน 25 ราย ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Hope จำนวน 17 ราย ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb D-Punjab จำนวน 16 ราย และ Hb G-Makassar จำนวน 6 ราย นำมาวิเคราะห์รูปแบบแอฟโฟลไทป์ของยีนบีตาโกลบินด้วยหลักการ Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ประกอบด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่งดังนี้ ดังนี้ 5'E HincII, 5'^Gγ HindIII, 5'^Aγ HindIII, 5'ψβHincII, 3'ψβ HincII, 5'β Avall, 3'β HinfI ผลการศึกษาพบว่า ชนิดของแอฟโฟลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดในประเทศไทยมีต้นกำเนิดจากหลากหลายแหล่ง แต่ฮีโมโกลบินบางชนิด พบว่ามีต้นกำเนิดเฉพาะในประเทศไทย เช่น ฮีโมโกลบินชนิดซี ซึ่งพบรูปแบบของแอฟโฟลไทป์ที่จำเพาะเฉพาะในคนไทย (+ - - - - +) นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้สามารถรายงานรูปแบบของแอฟโฟลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด G-Makassar และชนิด Tak ที่ยังไม่เคยพบการรายงานมาก่อน แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากฮีโมโกลบินบางชนิด เช่น ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar มีจำนวนเพียง 6 ราย จึงต้องมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นจึงจะสามารถวิเคราะห์ถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรมที่ได้ผลแม่นยำมากขึ้น โดยสรุปแสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมถิ่นกำเนิด รวมถึงเชื้อชาติ และความถี่ในการแพร่กระจายของรูปแบบแอฟโฟลไทป์

คำหลัก : ฮีโมโกลบินผิดปกติ, แอฟโฟลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน, ต้นกำเนิดทางพันธุกรรม, ประเทศไทย

Abstract

Project Code : TRG5480001

Project Title : Genetic origin of rare hemoglobin variants in Thailand

Investigator : Vannarat Saechan (Ph.D)¹, Suthat Fucharoen (Prof.)², Chamnong Nopparatana (Assist. Prof.)¹

1 : Faculty of Veterinary Science, Prince of Songkla University

2 : Thalassemia Research Center and Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University

Project Period : 15 June 2011 – 30 June 2018

Hemoglobin variant is an inherited disorder that results in the abnormal structure of globin chains of the hemoglobin (Hb) molecule. Many hemoglobin variants have been characterized worldwide more than 1,300 types and more than 35 types in Thailand. The distribution of hemoglobin variants in Thailand is associated with geographic and/or ethnic backgrounds. The aim of this study was to investigate the genetic origin of rare hemoglobin variants in Thailand by characterized the *beta-globin* gene cluster haplotype pattern in Hb C 36 cases, Hb Tak 25 cases, Hb Hope 17 cases, Hb D-Punjab 16 cases, and Hb G-Makassar 6 cases. Haplotype analysis was done by Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) for *beta globin* gene cluster of the following polymorphic restriction sites: 5'ε *HincII*, 5' ^Gγ *HindIII*, 5' ^Aγ *HindIII*, 5'ψβ *HincII*, 3'ψβ *HincII*, 5'β *Avall*, 3'β *Hinfl*. This study found that the type of haplotype of hemoglobin variants in Thailand is apparently different from previously report. Some hemoglobin variant showed specific *beta-globin* gene cluster haplotype pattern that found only in Thailand such as hemoglobin C showed (+ - - - - +) pattern. The haplotypes of Hb G-Makassar and Hb Tak were reported for the first time in Thailand. This finding suggests that the history of population admixture might contribute to the present distribution pattern of the haplotype variants

Keywords: Abnormal hemoglobin; hemoglobin variants; beta globin gene haplotype, genetic origin; Thailand

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตารางแสดงชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้ในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ	12
ตารางที่ 2 ตารางแสดงตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติที่ใช้ในการศึกษา	14
ตารางที่ 3 ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติที่สามารถศึกษาแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติ ทั้ง 8 ตำแหน่ง	24
ตารางที่ 4 รูปแบบ globin gene cluster haplotype และ SNPs ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ	25
ตารางที่ 5 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C	29
ตารางที่ 6 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak	30
ตารางที่ 7 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Hope	31
ตารางที่ 8 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb D-Punjab	31
ตารางที่ 9 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb G-Makassar	32
ตารางที่ 10 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด	33

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ภาพแสดงแผนภูมิแสดงตำแหน่งไพรเมอร์และผลการย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ	16,18
ภาพที่ 2 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' ϵ gene	19
ภาพที่ 3 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' ϵ gene	20
ภาพที่ 4 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' γ gene	20
ภาพที่ 5 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' γ^A gene	21
ภาพที่ 6 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' $\psi\beta$ gene	22
ภาพที่ 7 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' $\psi\beta$ gene	22
ภาพที่ 8 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' β gene	23
ภาพที่ 9 ภาพแสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' β gene	24

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	10
2. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
3. วัตถุประสงค์	13
4. วิธีดำเนินการวิจัย	
● ตัวอย่างดีเอ็นเอ	14
● เครื่องมือ	14
● สารเคมีและน้ำยา	15
● วิธีทำ	
1) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการด้วยวิธีพีซีอาร์	16
2) การวิเคราะห์ลักษณะของ globin gene cluster haplotype	16
3) การวิเคราะห์ลักษณะของ SNPs บน globin gene cluster	16
4) รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	17
5. ผลการวิจัย	18
6. บทวิจารณ์	34
7. เอกสารอ้างอิง	37
8. ภาคผนวก	42

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ab	Abnormal
DNA	Deoxyribonucleic acid
Hb	Hemoglobin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
PCR	Polymerase chain reaction
RT	Retention time
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SNP	Single nucleotide polymorphism

บทนำ

ฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นภาวะทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา เกิดขึ้นเนื่องจากยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเบต้าผิดปกติไปมีผลทำให้มีความผิดปกติในแง่คุณภาพของฮีโมโกลบิน ปัจจุบันมีรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทั่วโลกมากกว่า 1,300 ชนิด [1] สำหรับในประเทศไทยพบแล้วมากกว่า 35 ชนิด และจากการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทยจากโครงการ “การศึกษาความผิดปกติในระดับโมเลกุลของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย (รหัสโครงการ TRG5080002)” [2] พบว่า จำนวน และชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย มีความแตกต่างกับฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย รวมทั้งแตกต่างจากประเทศเพื่อนบ้านและประเทศในแถบเอเชียด้วยกัน ดังตารางที่ 1 โดยพบว่าฮีโมโกลบินชนิดซี พบมากที่สุด ในภาคใต้ของประเทศไทยถึง 48.3% ซึ่งเป็นตัวอย่างที่พบในคนไทยที่มีภูมิลำเนาและบรรพบุรุษเป็นคนภาคใต้เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดฮีโมโกลบิน O-Indonesia จำนวน 2 ราย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อนในภาคอื่น ๆ ของประเทศไทยเลย และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA [3] และลักษณะของการติดเชื้อของไวรัสเอดส์ไต้น-บาร์ ในคนภาคใต้ของประเทศไทย [4] ก็แสดงถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความเฉพาะตัวแตกต่างจากคนภาคอื่นของประเทศไทย ซึ่งผลของความแตกต่างเหล่านี้สาเหตุอาจจะมาจากการที่คนภาคใต้ส่วนใหญ่มีเชื้อสายผสมของชนชาติไทย จีน และมุสลิม ที่ย้ายถิ่นฐานมาจากชาวมองโกลอยด์ [3, 5] ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของคนทางภาคใต้รวมถึงการพบอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติดังกล่าวข้างต้น แตกต่างจากคนภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการที่จะศึกษาถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรม (genetic origin) ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบในภาคใต้ของไทยโดยเปรียบเทียบลักษณะของ globin gene cluster haplotype และ SNPs บน globin gene cluster ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบในภาคใต้ของไทยกับฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดเดียวกันแต่พบในภาคอื่น ๆ ของไทย เช่น ภาคกลาง (ตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติจากโรงพยาบาลศิริราช, โรงพยาบาลรามารับดี มหาวิทยาลัยมหิดล และตัวอย่างจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) รวมทั้งเปรียบเทียบกับต่างประเทศ และการศึกษาของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีรายงานไว้แล้วจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น [6-8] นอกจากนี้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆ กับความรุนแรงของโรคนั้นยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบในคนภาคใต้ของไทยมีจำนวนน้อย จึงหวังว่าการศึกษานี้ซึ่งเป็นการรวบรวมตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติจากทุกภาคของประเทศไทย สามารถได้ข้อสรุปความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ดียิ่งขึ้นและจะช่วยให้ในเรื่องของการวางแผนป้องกันควบคุม และตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ก่อให้เกิดโรคฮีโมโกลบินผิดปกติร่วมกับโรคธาลัสซีเมีย ที่อาจก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคได้

การศึกษานี้จะเป็นการศึกษาแบบบูรณาการของหลายสถาบันร่วมกันเพื่อก่อให้เกิดความเข้มแข็งของงานวิจัยด้านโลหิตวิทยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาทางโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทยต่อไป

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

จากผลการทบทวนเอกสารที่ตีพิมพ์แล้วทั้งในและต่างประเทศ พบว่าชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทั่วโลกแล้วมากกว่า 1,300 ชนิด [1] สำหรับในประเทศไทยพบแล้วมากกว่า 35 ชนิด [9] และยังพบว่าจำนวนและ ชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในแต่ละภูมิภาคของไทยนั้นแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังตารางที่ 1 เช่นเดียวกันกับจำนวนและชนิดการกลายพันธุ์ของยีนธาลัสซีเมียที่เคยมีรายงานมาก่อน [10] โดยพบว่าประชากรทางภาคใต้ของประเทศไทยพบ ฮีโมโกลบินชนิดซีมากที่สุดถึง 48.3% [2] ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านั้นพบว่า ฮีโมโกลบินชนิดซีจะพบมากในกลุ่มชาวแอฟริกาและคนผิวดำ [11] และเมื่อศึกษาถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรมโดยศึกษาลักษณะของ beta-globin gene cluster haplotype แล้วพบว่า ฮีโมโกลบินชนิดซีที่พบในคนไทยจะมีลักษณะของ beta-globin gene cluster แบบ + - - - - + แต่ ฮีโมโกลบินชนิดซีที่พบในกลุ่มชาวแอฟริกันนั้นมีลักษณะของ beta-globin gene cluster ในกลุ่ม haplotype type I (- + - - + + +), haplotype type II (- - - - + + +) และ haplotype type III (- - - - + +) [8, 12] จากการศึกษาถึงลักษณะของ globin gene cluster haplotype นี้สามารถใช้ในการบ่งบอกถึงต้นกำเนิดที่แตกต่างกันของเชื้อชาติและเผ่าพันธุ์ได้ ซึ่งก่อนหน้านี้ยังมีการศึกษาถึงลักษณะของ globin gene cluster haplotype เฉพาะกลุ่มฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเท่านั้น [6, 8] ฉะนั้นการศึกษารุ่นนี้จะทำให้ทราบถึงข้อมูลต้นกำเนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบในแต่ละภาคของประเทศไทยได้อย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ลักษณะทางอาการและความรุนแรงของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดมีความหลากหลายตั้งแต่ไม่แสดงอาการ เช่น ผู้ที่เป็นพาหะของ Hb S, Hb C และ Hb Malay หรือแสดงอาการรุนแรงมากขึ้นมีอาการซีด (anemia) เช่นผู้ที่มียีน Hb C ร่วมกับ Hb Malay [8] หรือ มีอาการรุนแรงมากถึงขั้นแสดงอาการ polycythemia ในผู้ป่วยที่เป็น homozygous Hb Tak [13] จากการศึกษา genome-wide association study (GWAS) ในผู้ป่วย β^0 -thalassemia/HbE นั้นพบว่า ตำแหน่งของ SNPs บน beta-globin gene cluster นั้นมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SNPs บนตำแหน่ง rs2071348 ของยีน HBBP1 ตำแหน่ง rs9376092 ระหว่างยีน HBS1L และยีน MYB และ SNPs บนตำแหน่ง rs766432 ของยีน BCL11A [14] แต่เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอาการกับชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติยังมีรายงานน้อยในประเทศไทย [8, 15-17] ถ้าหากมีข้อมูลความสัมพันธ์ของการศึกษาทางปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factor) ร่วมกับลักษณะอาการและชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติมากขึ้นก็จะช่วยให้ทราบถึงแนวทางในการป้องกัน รักษา และควบคุมการก่อให้เกิดโรคฮีโมโกลบินผิดปกติที่รุนแรงได้

ตารางที่ 1 ตารางแสดงชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้ในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ

hemoglobin variants	mutation	Thais					Malaysian [18-20]	Chinese [21]	Laos [22, 23]	Cambodian [22]
		Southern	Southern	Central	Northeast	Northern				
		Thai (TRG508 0002) (Case)	Thai [8, 22, 24] (Case)	Thai [25-27] (Case)	Thai [6, 8, 22, 28-31] (Case)	Thai [12, 32, 33] (Case)				
Hb C	β^6 Glu-Lys	28	26			1	1			
Hb D- Punjab	β^{121} Glu-Gln	12		3	10					
Hb Tak	β^{146} (+ AC)	7		10	6					
Hb G- Makassar	β^6 Glu-Ala	4	1							
Hb Lepore- Hollandia	$\delta^{IVS1\#42}$ _ $\beta^{IVS1\#56}$	2		2	14					
HbQ-Thailand	α^{74} Asp-His	2		6		2		5		
HbO-Indonesia	α^{116} Glu-Lys	2						1		
Hb Hope	β^{136} Gly-Asp	1		9		1			1	
Hb S	β^6 Glu-Val				2		4			
Hb D-Iran	β^{22} Glu-Gln									
Hb J Bangkok	β^{56} Gly-Asp				1			4		
Hb Rambam	β^{69} Gly-Asp			1						
Hb Korle Bu	β^{73} Asp-Asn								1	
Hb Pygos	β^{83} Gly-Asp			1	1					
Hb New York	β^{113} Val-Glu			6				3		
Hb Jiabghua	β^{120} Lys-Ile							3		
Hb Shuangfeng	α^{27} Glu-Lys							1		
Hb Lille	α^{74} Asp-Ala							4		
Hb Pakse	α^{142} Term-Tyr		1		10				2	3
Hb A2 Flatbush	δ^{22} Ala-Glu							1		
Hb Lepore- Washington- Boston	δ^{87} - β^{116}				4		1	2		

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อยในภาคใต้ของประเทศไทยเปรียบเทียบกับภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factor; SNPs) ร่วมกับลักษณะอาการและชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่าง ๆ จากตัวอย่างของฮีโมโกลบินผิดปกติของหน่วยงานที่เข้าร่วมโครงการนี้
3. เพื่อเป็นการศึกษาวิจัยร่วมกันของสถาบันการศึกษาแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยเพื่อก่อให้เกิดความเข้มแข็งของงานวิจัยด้านโลหิตวิทยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาทางโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทย

วิธีดำเนินการวิจัย

1) ตัวอย่างดีเอ็นเอ

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อยชนิดเบต้าโกลบิน จำนวน 130 ตัวอย่าง จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 52 ราย ตัวอย่างจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 57 ราย ตัวอย่างจากคณะแพทยศาสตร์ รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 32 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 44 ตัวอย่าง แบ่งชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดฮีโมโกลบิน	mutation	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (จำนวนตัวอย่าง)	คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (จำนวนตัวอย่าง)	คณะแพทยศาสตร์- รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (จำนวนตัวอย่าง)	กรมวิทยาศาสตร์- การแพทย์ (จำนวนตัวอย่าง)
Hb C	β^6 Glu-Lys	28	12	7	62
Hb D- Punjab	β^{121} Glu-Gln	12	2	7	5
Hb Tak	β^{146} (+ AC)	7	24	6	13
Hb G-Makassar	β^6 Glu-Ala	4	2	0	6
Hb Hope	β^{136} Gly-Asp	1	17	12	44
รวม		52	57	32	130

2) เครื่องมือ

1. DNA thermal cycler 480 (Perkin-Elmer, USA)
2. horizontal gel electrophoresis (Mupid, Japan)
3. UV transilluminator (UVP, Inc., USA)
4. Microcentrifuge (TOMY, USA)
5. Shaking water-bath (Julabo, Germany)
6. 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
7. เครื่องมือและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็นในงานด้านอณูพันธุศาสตร์

3) สารเคมีและน้ำยา ที่สำคัญได้แก่

1. ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Minikit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd; Taiwan)
2. Taq DNA polymerase, Recombinant (Invitrogen, Brazil)
3. Restriction enzymes สำหรับการศึกษาลักษณะของ haplotypes : (*HincII*, *HindIII*, *AvaI*, *MnII*, *HinfI*)
4. Agarose gel (GeneON, Germany)
5. ชุดน้ำยาวิเคราะห์ SNP บน globin gene cluster (Genepus, USA)
6. น้ำยาอื่น ๆ ที่จำเป็นในงานด้าน molecular biology
7. Primers สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์แสดงในตารางที่ 3

ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการด้วยวิธีพีซีอาร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	ยีน
Xmn L	5' AACTGTTGCTTTATAGGATTTT 3'	5' ^G γ
Xmn R	5' AGGAGCTTATTG ATAACTCAGAC 3'	
SF 3	5' GTTTGTGTGTGTGTGAGAGC 3'	^G γ 1/2
SF 4	5' TCTTTAGGCATGCGTCAACA 3'	
SF 5	5' TTAACGTCTTCAGCCTACAA 3'	^A γ 2/3
SF 6	5' CAATCTGCACACTTGAGGGGC 3'	
SF 7	5' GGCACATGGATCGAATTGAA 3'	5'ε
SF 8	5' ACCATGATGCCAGGCCTGAG 3'	
SF 9	5' GGGAACAGAAGTTGAGATAG 3'	5'ψβ
SF 10	5' CTCTTTTCTTGCAGGATTGC 3'	
SF 11	5' GCTCCATGAACAAACATTCC 3'	3'ψβ
SF 12	5' AAGGAGCACCCACTAGCTCA 3'	
RDB1	5' AACTCCTAAGCCAGTGCCAGA 3'	5'β
G8	5' GCTTGGACTCAATAATCC 3'	
7R	5' AGACAATAAGGCTGAGTGG-3'	3'β
3'βL	5' TTCATACATAACAATACTCA 3'	

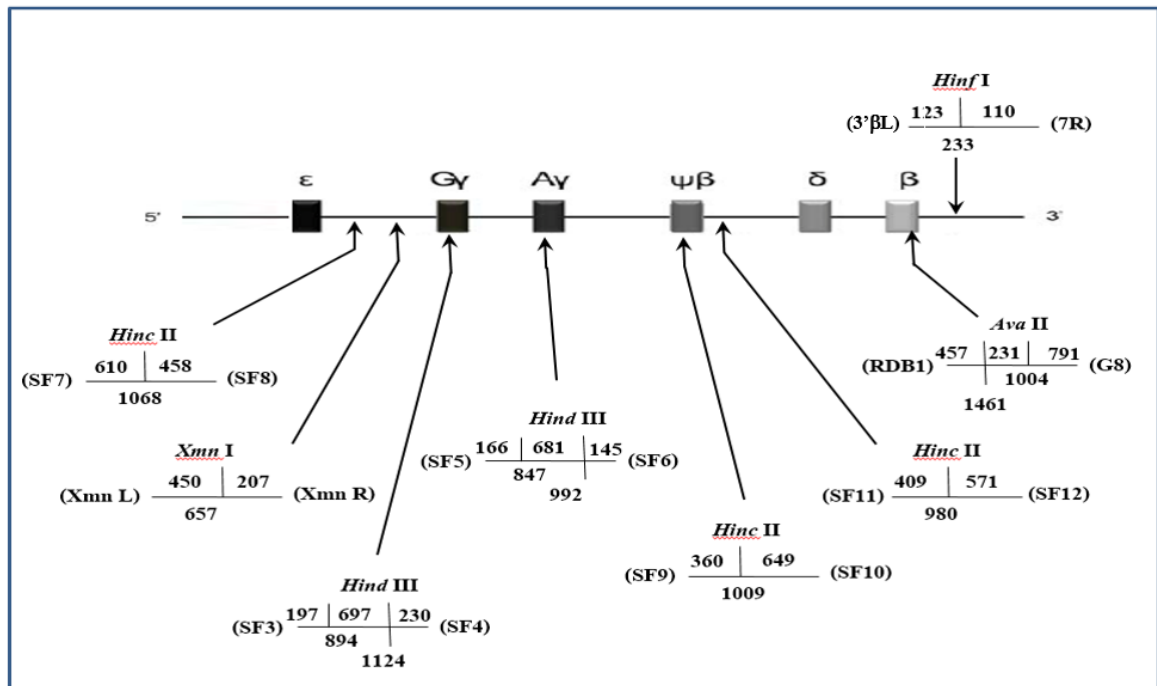
4) วิธีทำ

4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการด้วยวิธีพีซีอาร์ **polymerase chain reaction**

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดเบต้าโกลบิน มาเพิ่มปริมาณส่วนของยีนเบต้าโกลบินด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะตามวิธีการของ Fukumaki Y และ Fucharoen S [34] และ Sutton, M. และคณะ [35] ตำแหน่งไพรเมอร์แสดงตามแผนภูมิภาพที่ 1

4.2 การวิเคราะห์ลักษณะของ *globin gene cluster haplotype*

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณในส่วนของยีนโกลบินที่ต้องการแล้วมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิดต่างๆตามแผนภูมิภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงตำแหน่งไพรเมอร์และผลการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.3 การวิเคราะห์ลักษณะของ SNPs บน *globin gene cluster*

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ มาทำการศึกษาลักษณะของ SNPs บน *globin gene cluster* โดยคัดเลือกตำแหน่งที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเช่น SNPs บนตำแหน่ง rs2071348 ของยีน *HBGP1* ตำแหน่ง rs9376092 ระหว่างยีน *HBS1L* และยีน *MYB* และ SNPs บนตำแหน่ง rs766432 ของยีน *BCL11A* เป็นต้น ตามที่มีรายงานจากการศึกษาของ Nuinoon, M และคณะ [14]

4.4 รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

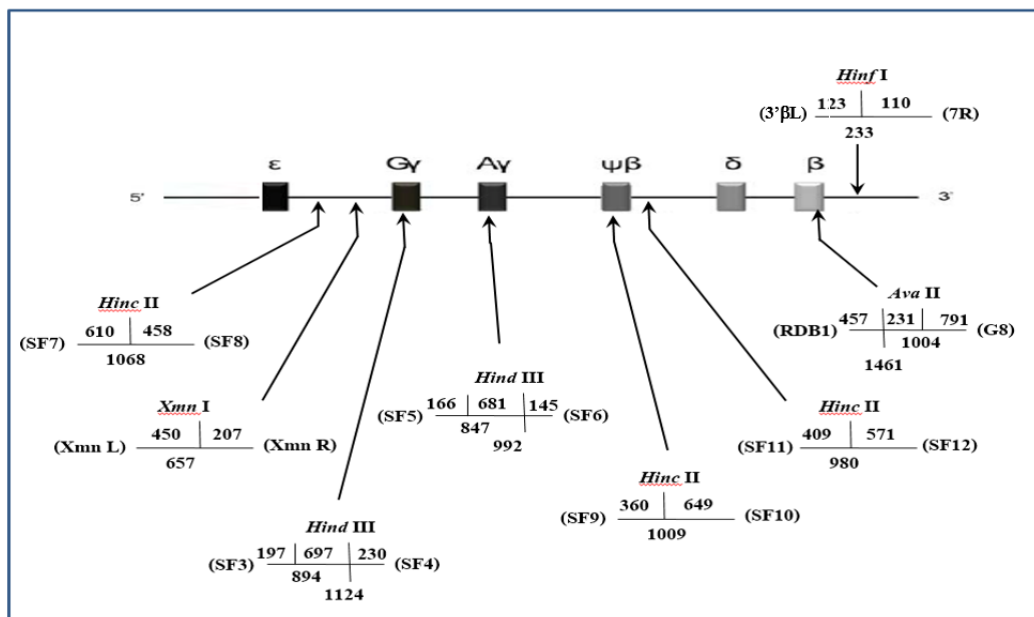
นำข้อมูลลักษณะของ *globin* gene cluster haplotype และ ลักษณะของ SNPs บน *globin* gene cluster ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Haploview [36] และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติจากการวิจัยครั้งนี้ กับฮีโมโกลบินผิดปกติชนิดเดียวกันในภูมิภาคอื่น ๆ ของไทยและที่เคยมีรายงานมาก่อนในต่างประเทศ

ผลการวิจัย

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอ และผลการวิเคราะห์ลักษณะของ *globin gene cluster haplotype* และ SNPs บน *globin gene cluster*

จากการดำเนินงานของโครงการตั้งแต่วันที่ 15 มิถุนายน 2554 - วันที่ 30 เดือนมิถุนายน 2561 สามารถรวบรวมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบได้น้อยชนิดเบต้าโกลบิน จำนวน 130 ตัวอย่าง จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 52 ราย ตัวอย่างจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 57 ราย ตัวอย่างจากคณะแพทยศาสตร์ รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 32 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากการมหาวิทยาลัยการแพทย์ จำนวน 44 ตัวอย่าง แบ่งชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติได้ตั้งตารางที่ 2 ในส่วนวิธีการดำเนินการวิจัย

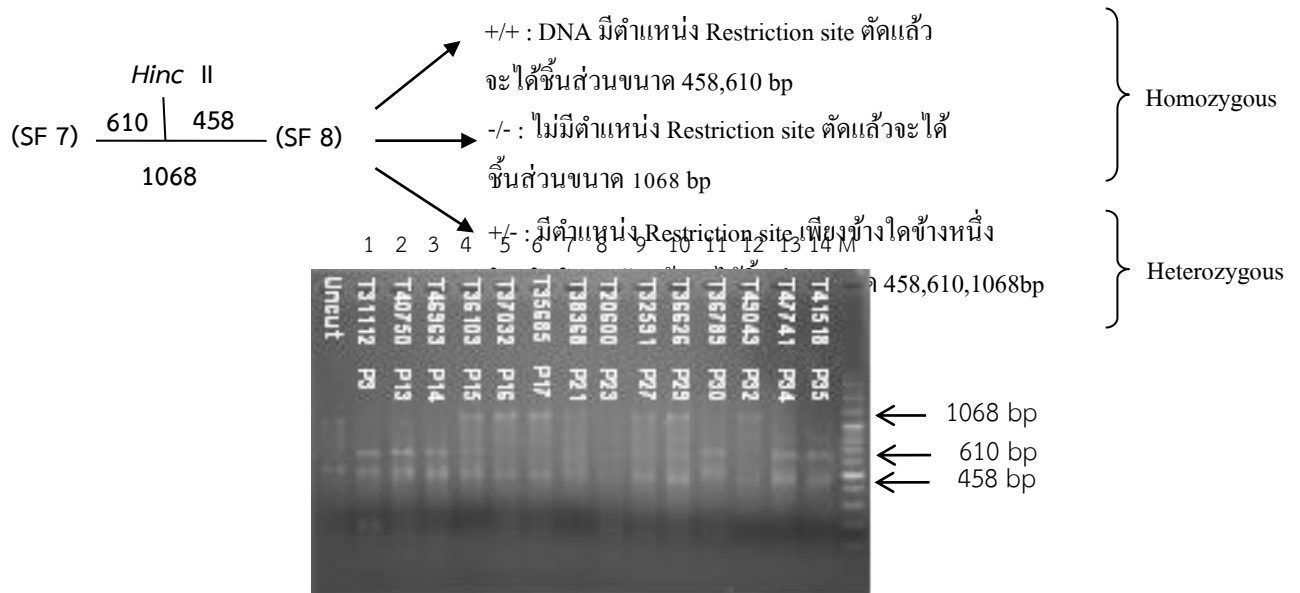
นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้ง 130 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนโกลบินที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction fragment length polymorphism: RFLP) ชนิดต่าง ๆ ตามแผนภูมิภาพที่ 1 ซึ่งผลปฏิกิริยาที่ใช้ในการนำ PCR product ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของแต่ละตำแหน่ง มีดังนี้



ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงตำแหน่งไพรเมอร์และผลการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' ε gene

ผลการใช้ Enzyme *Hinc* II ตัด PCR product ตำแหน่ง 5' ε gene ที่ใช้ primers SF7-SF8 ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 2 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้



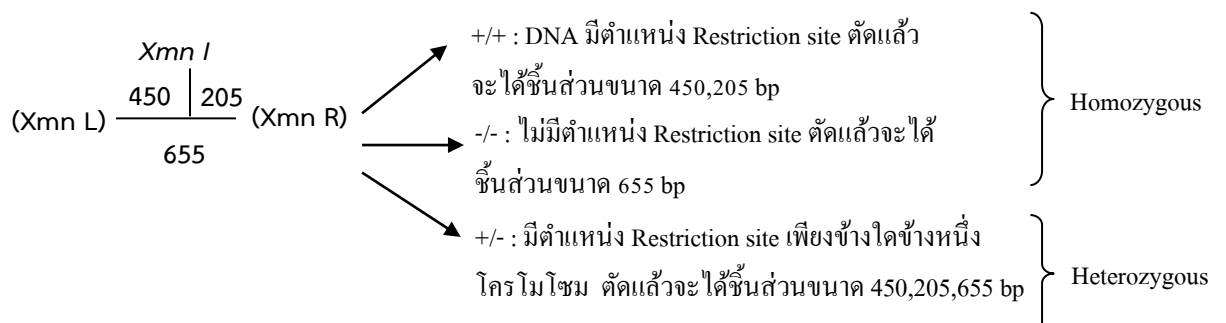
ภาพที่ 2 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' ε gene;

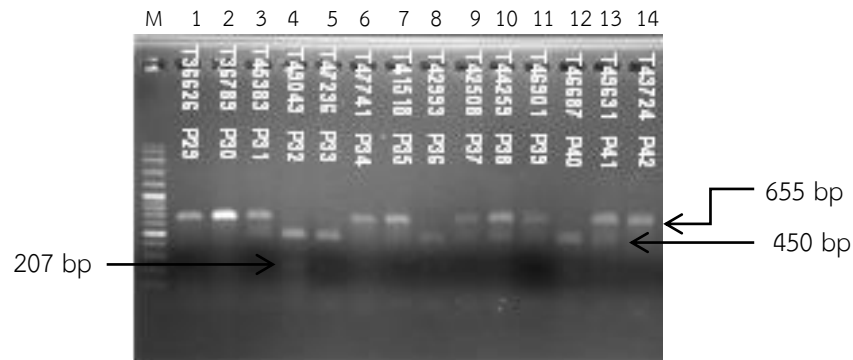
ตัวอย่างที่ 1,2,3,11,13 และ 14 อ่านผล RFLP เป็น +/+,

ตัวอย่างที่ 4,7,9 และ 10 อ่านผล RFLP เป็น +/-, ตัวอย่างที่ 5,6 และ 12 อ่านผล RFLP เป็น -/-

RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' ε gene

ผลการใช้ Enzyme *Xmn* I ตัด PCR product ตำแหน่ง 3' ε gene ที่ใช้ primers XmnL-XmnR ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้

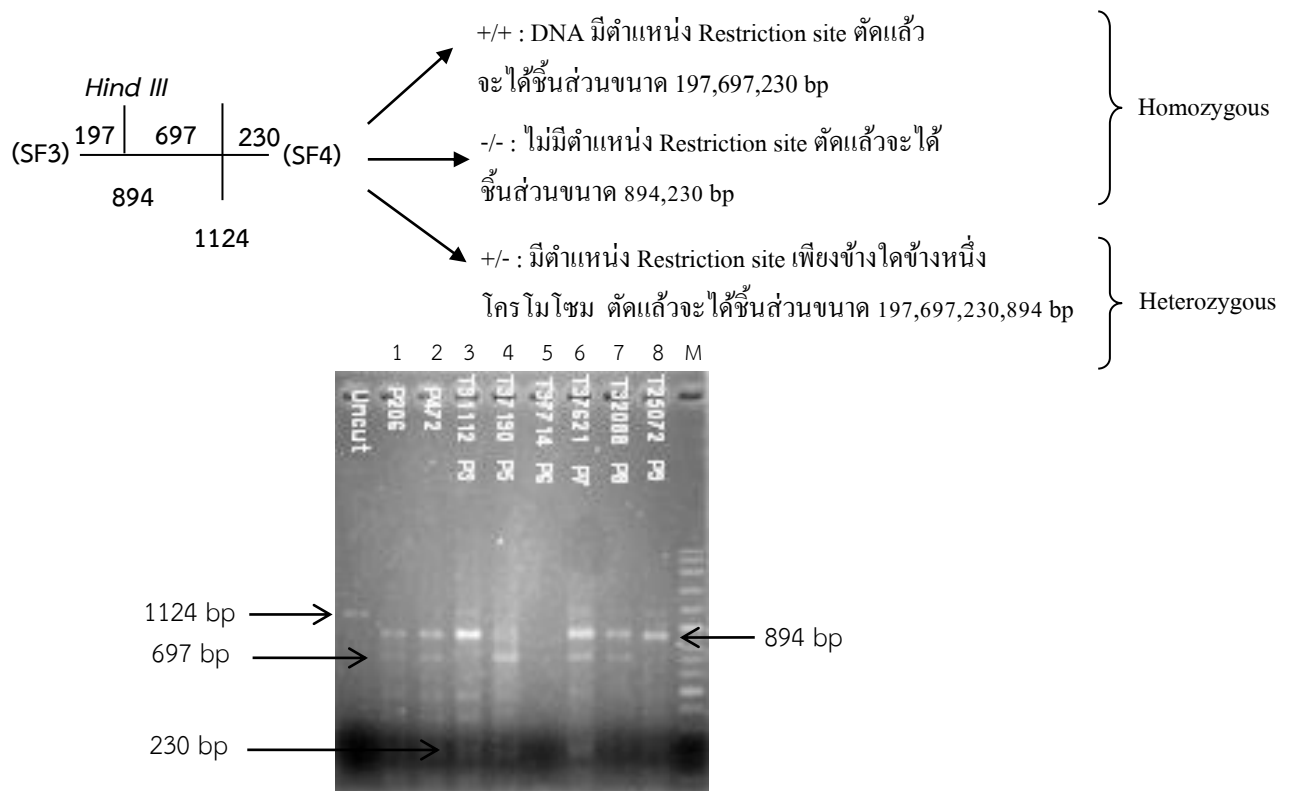




ภาพที่ 3 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' ϵ gene;
ตัวอย่างที่ 1,2,6,7 และ 14 อ่านผล RFLP เป็น -/-,
ตัวอย่างที่ 3,9,10,11 และ 13 อ่านผล RFLP เป็น +/-,
ตัวอย่างที่ 4,5,8 และ 12 อ่านผล RFLP เป็น +/+

RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' γ gene

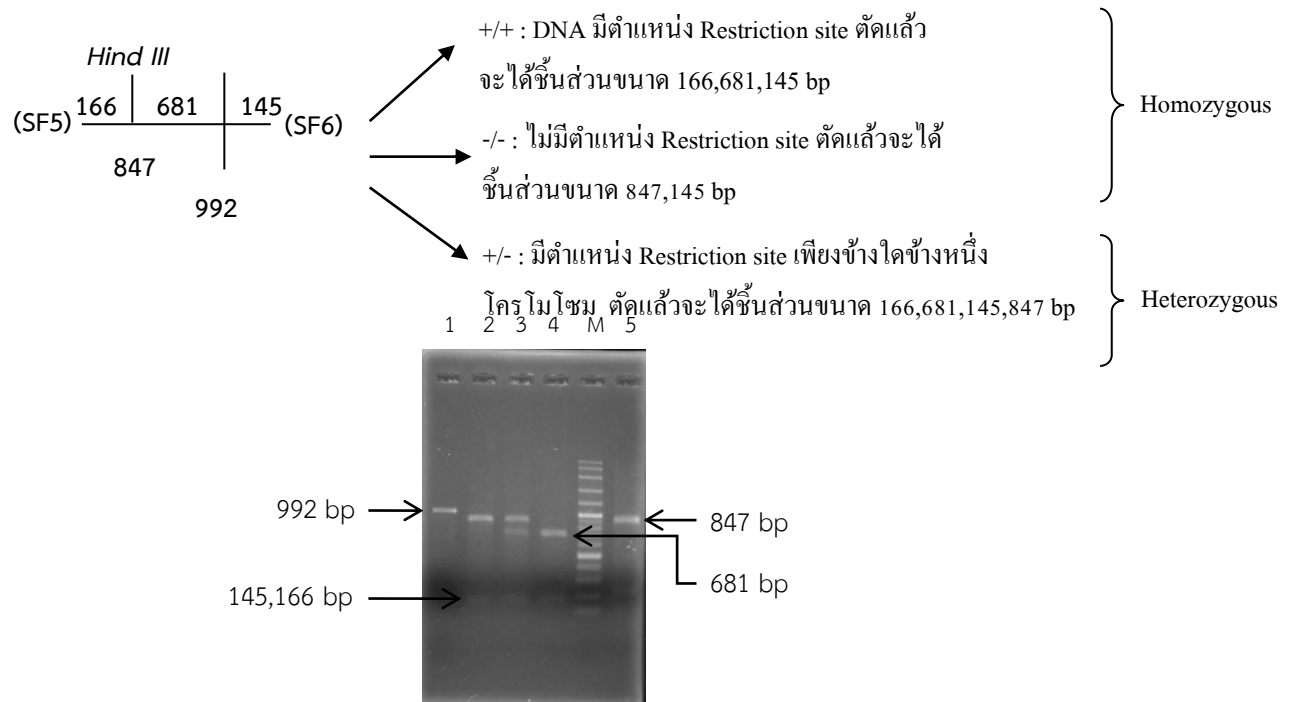
ผลการใช้ Enzyme *Hind* III ตัด PCR product ตำแหน่ง 5' γ gene ที่ใช้ primers SF3 – SF4 ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้



ภาพที่ 4 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' γ gene;
ตัวอย่างที่ 3 และ 8 อ่านผล RFLP เป็น -/-, ตัวอย่างที่ 1,2,6 และ 7 อ่านผล RFLP เป็น +/-,
ตัวอย่างที่ 4 อ่านผล RFLP เป็น +/+

RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' γ gene

ผลการใช้ Enzyme *Hind* III ตัด PCR product ตำแหน่ง 5' γ gene ที่ใช้ primers SF5 – SF6 ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 5 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้

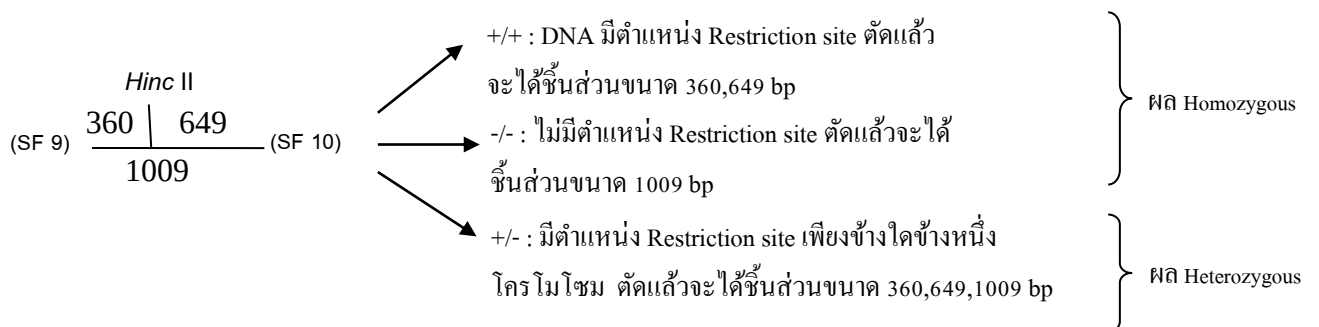


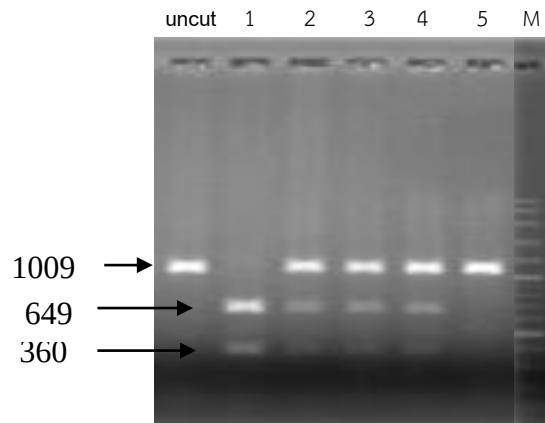
ภาพที่ 5 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' γ gene;

ตัวอย่างที่ 1 เป็นตัวอย่าง uncut, ตัวอย่างที่ 2 และ 5 อ่านผล RFLP เป็น -/-, ตัวอย่างที่ 3 อ่านผล RFLP เป็น +/-, ตัวอย่างที่ 4 อ่านผล RFLP เป็น +/+

RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' $\psi\beta$ gene

ผลการใช้ Enzyme *Hinc* II ตัด PCR product ตำแหน่ง 5' $\psi\beta$ gene ที่ใช้ primers SF9 – SF10 ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้





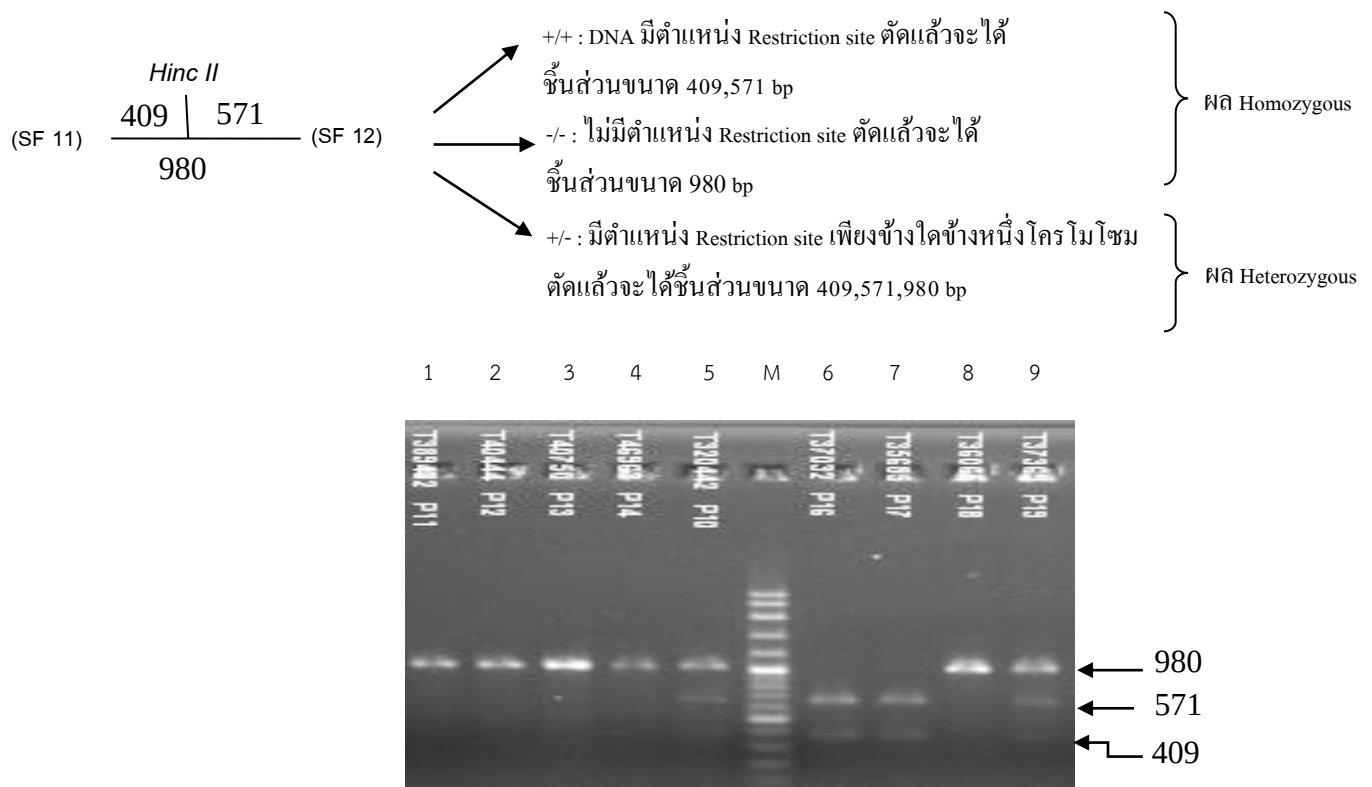
ภาพที่ 6 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' $\psi\beta$ gene;

ตัวอย่างที่ 1 อ่านผล RFLP เป็น +/+, ตัวอย่างที่ 2,3 และ 4 อ่านผล RFLP เป็น +/-

ตัวอย่างที่ 5 อ่านผล RFLP เป็น -/-

RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' $\psi\beta$ gene

ผลการใช้ Enzyme *HincII* ตัด PCR product ตำแหน่ง 3' $\psi\beta$ gene ที่ใช้ primers SF11 – SF12 ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 7 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้



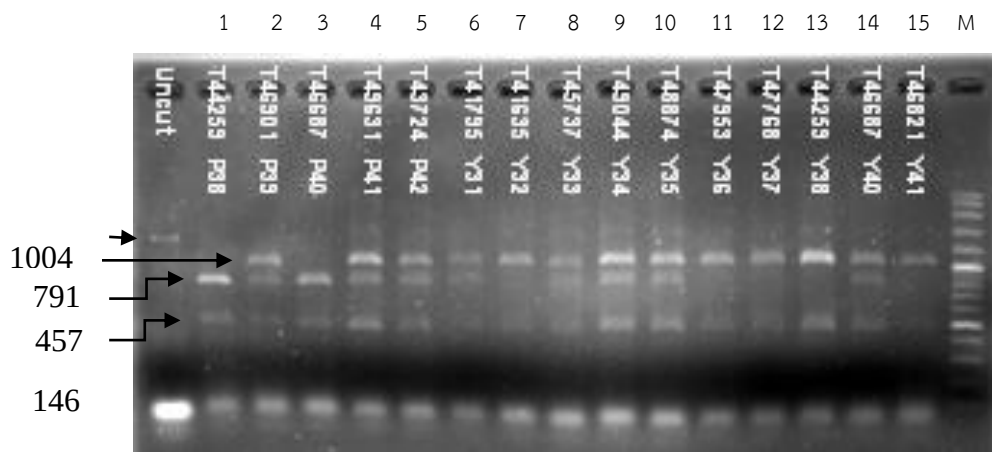
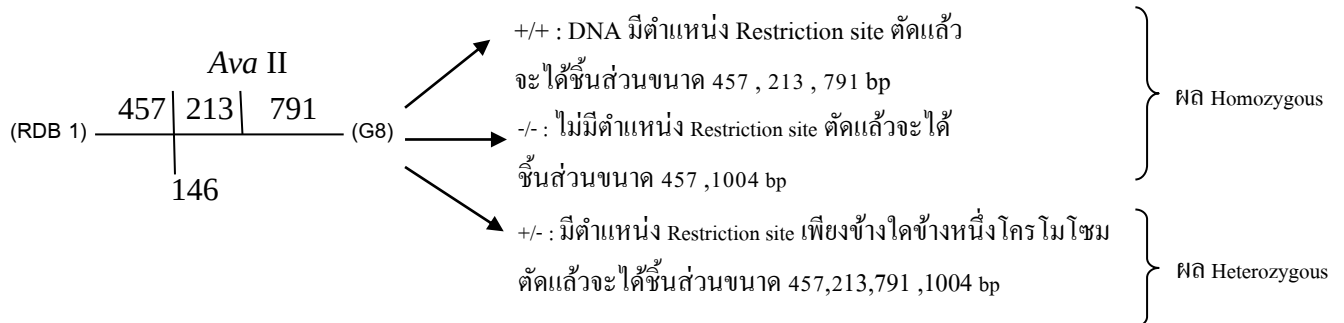
ภาพที่ 7 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' $\psi\beta$ gene;

ตัวอย่างที่ 6 และ 7 อ่านผล RFLP เป็น +/+, ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 8 อ่านผล RFLP เป็น -/-,

ตัวอย่างที่ 5 และ 9 อ่านผล RFLP เป็น +/-

RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' β gene

ผลการใช้ Enzyme *Ava*II ตัด PCR product ตำแหน่ง 5' β gene ที่ใช้ primers RDB 1 – G8 ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้



ภาพที่ 8 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 5' β gene;

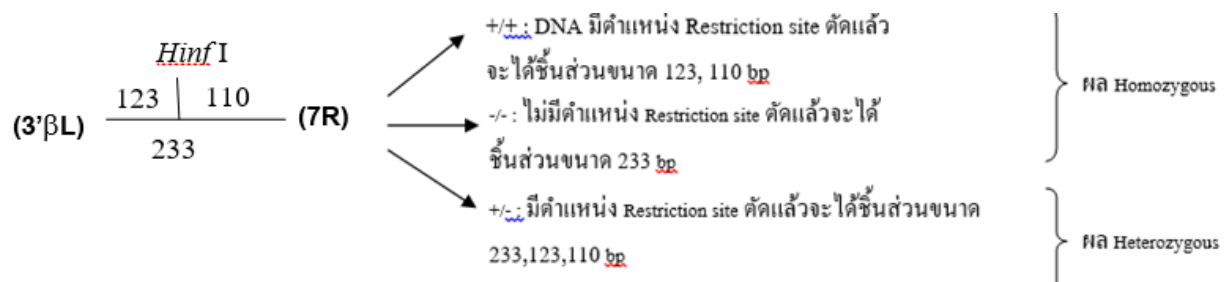
ตัวอย่างที่ 1 และ 3 อ่านผล RFLP เป็น +/+,

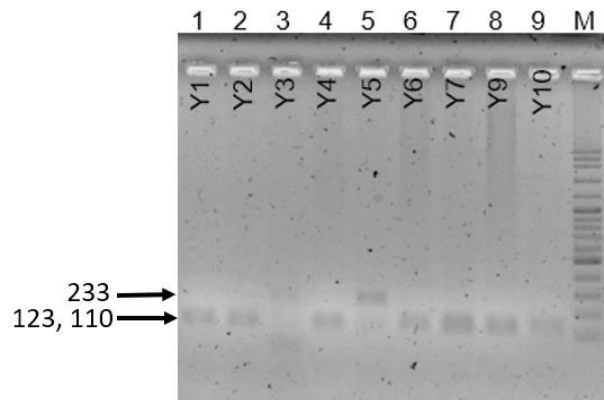
ตัวอย่างที่ 2,4,5,6,8,9,10 และ 14 อ่านผล RFLP เป็น +/-,

ตัวอย่างที่ 7,11,12 และ 15 อ่านผล RFLP เป็น -/-

RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' β gene

ผลการใช้ Enzyme *Hinf*I ตัด PCR product ตำแหน่ง 3' β gene ที่ใช้ primers 3' β L – 7R ในการเพิ่มปริมาณ DNA ได้ผลแสดงดังภาพที่ 9 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยขนาดของชิ้นส่วน PCR product ดังนี้





ภาพที่ 9 แสดง RFLP reaction ในตำแหน่ง 3' β gene;

ตัวอย่างที่ 1,2,4 และ 6-9 อ่านผล RFLP เป็น +/+,

ตัวอย่างที่ 3 อ่านผล RFLP เป็น -/-, ตัวอย่างที่ 5 อ่านผล RFLP เป็น +/-

เนื่องจากตัวอย่างดีเอ็นเอบางตัวอย่างมีปริมาณน้อยไม่สามารถนำมาศึกษาแอสฟโฟลไทป์บนยีนสายเบต้าโกลบินโดยใช้หลักการ Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ได้ครบทั้ง 8 ตำแหน่ง จึงทำให้สามารถศึกษาแอสฟโฟลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติได้เพียง 104 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติ 5 ชนิด คือ Hb C จำนวน 36 ราย Hb Tak จำนวน 25 ราย Hb Hope จำนวน 17 ราย Hb D-Punjab จำนวน 16 ราย และ Hb G-Makassar จำนวน 6 ราย แสดงตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติที่สามารถศึกษาแอสฟโฟลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติทั้ง 8 ตำแหน่ง

ชนิดฮีโมโกลบิน	mutation	จำนวนตัวอย่าง
Hb C	β^6 Glu-Lys	36
Hb Tak	β^{146} (+ AC)	25
Hb Hope	β^{136} Gly-Asp	17
Hb D- Punjab	β^{121} Glu-Gln	16
Hb G-Makassar	β^6 Glu-Ala	6
รวม		104

ผลการศึกษาลักษณะของ SNPs บน *globin* gene cluster ตำแหน่ง rs9376092 ระหว่างยีน *HBS1L* และยีน *MYB* และ SNPs บนตำแหน่ง rs766432 ของยีน *BCL11A* โดยวิธี TaqMan® SNP Genotyping Assay (Geneplus, USA) ด้วยเครื่อง 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) และผล *globin* gene cluster haplotype แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รูปแบบ *globin* gene cluster haplotype และ SNPs ของฮีนโกลบินผิดปกติชนิดต่างๆ

Hemoglobin variant	Haplotype Loci								rs9376092 HBS1L- MYB	rs766432 <i>BCL11A</i>
	5' ϵ	5' $G\gamma$	5' $A\gamma$	5' $\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β	3' β	3' ϵ		
	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Ava</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Xmn</i> I		
Hb C/N	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb C/N	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb C/N	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	CC	ca
Hb C/N	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb C/N	-/-	+/+	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/+	CC	-
Hb C/N	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	-/-	CC	aa
Hb C/N	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	CC	aa
Hb C/N	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb C/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	-
Hb C/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	+/-	ca	-
Hb C/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	ca	cc
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	ca	-
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	-
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	CC	-
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	ca	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	CC	aa
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	CC	-
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	ca	aa
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	ca	ca

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Hemoglobin variant	Haplotype Loci								rs9376092 HBS1L- MYB	rs766432 BCL11A
	5' ϵ	5' G γ	5' A γ	5' $\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β	3' β	3' ϵ		
	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Ava</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Xmn</i> I		
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb C/N	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb C/N	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	CC	aa
Hb C/N	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb C/N	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	CC	ca
Hb D/N	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb D/N	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	CC	ca
Hb D/N	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	-/-	ca	ca
Hb D/N	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	-/-	ca	ca
Hb D/N	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	CC	ca
Hb D/N	-/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	-/-	CC	ca
Hb D/N	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	ca	aa
Hb D/N	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-	+/-	-/-	ca	ca
Hb D/N	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	-/-	CC	aa
Hb D/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	ca	ca
Hb D/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	ca	ca
Hb D/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	-/-	ca	ca
Hb D/N	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	-/-	ca	ca
Hb D/N	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	ca	ca
Hb D/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb D/N	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	CC	ca
Hb G/N	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	CC	ca
Hb G/N	-/-	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	ND	ca
Hb G/N	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	CC	ca
Hb G/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	-/-	ca	aa
Hb G/N	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	CC	ca
Hb G/N	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	ca	aa

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Hemoglobin variant	Haplotype Loci								rs9376092 HBS1L- MYB	rs766432 BCL11A
	5' ϵ	5' $G\gamma$	5' $A\gamma$	5' $\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β	3' β	3' ϵ		
	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Ava</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Xmn</i> I		
Hb Hope/N	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	+/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	+/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	ca	aa
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	ca	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	CC	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	aa	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	ca	ca
Hb Hope/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	ca	ca
Hb Hope/N	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	CC	aa
Hb Hope/N	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	ca	ca
Hb Tak/N	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	-/-	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	-/-	+/+	+/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/-	CC	ca
Hb Tak/N	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	ca	aa
Hb Tak/N	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Hemoglobin variant	Haplotype Loci								rs9376092 HBS1L- MYB	rs766432 BCL11A
	5' ϵ	5' G γ	5' A γ	5' $\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β	3' β	3' ϵ		
	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Ava</i> II	<i>Hinf</i> I	<i>Xmn</i> I		
Hb Tak/N	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	ca	ca
Hb Tak/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	ca	ca
Hb Tak/N	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	ca	ca
Hb Tak/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca
Hb Tak/N	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	CC	aa
Hb Tak/N	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	CC	ca

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ globin gene cluster haplotype ด้วยโปรแกรม Haploview

จากการนำข้อมูลลักษณะของ globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กันด้วยโปรแกรม Haploview ได้ผลดังนี้

- ตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C

จากจำนวนตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C ทั้งหมด 36 ตัวอย่าง สามารถแยกชนิด Beta-globin gene cluster haplotype ได้จำนวน 17 รูปแบบดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C

Haplotype Loci							รูปแบบ haplotype	ความถี่ที่พบ (%)
5' E <i>Hinc</i> II	5' G γ <i>Hind</i> III	5' A γ <i>Hind</i> III	5' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	5' β <i>Ava</i> II	3' β <i>Hinf</i> I		
+	-	-	-	-	-	+	1	35.4
+	-	-	-	-	+	-	2	11.7
+	-	-	-	-	+	+	3	11.1
+	-	-	-	-	-	-	4	6.4
-	-	-	-	-	-	+	5	5.6
-	+	+	-	+	-	+	6	5.5
+	+	-	-	-	-	+	7	4.8
-	-	-	-	+	+	+	8	4.8
-	+	-	+	+	-	+	9	2.8
-	+	-	-	+	-	+	10	2.0
+	-	+	-	-	-	+	11	1.4
-	-	-	-	+	-	+	12	1.4
-	+	+	-	-	+	+	13	1.4
+	-	-	-	+	+	+	14	1.4
+	-	+	-	-	-	-	15	1.4
-	-	-	-	+	-	-	16	1.4
+	+	-	-	-	+	-	17	1.4

- ตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak

จากจำนวนตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak ทั้งหมด 25 ตัวอย่าง สามารถแยกชนิด Beta-globin gene cluster haplotype ได้จำนวน 19 รูปแบบดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak

Haplotype Loci							รูปแบบ haplotype	ความถี่ที่พบ (%)
5' ϵ <i>Hinc</i> II	5' G_γ <i>Hind</i> III	5' A_γ <i>Hind</i> III	5' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	5' β <i>Ava</i> II	3' β <i>Hinf</i> I		
+	-	-	-	-	-	+	1	29.8
-	+	+	-	+	-	+	2	26.9
-	-	+	-	+	-	+	3	8.9
+	-	-	-	-	+	+	4	5.3
+	+	-	-	-	-	+	5	4.4
-	+	-	-	+	-	-	6	3.0
-	+	+	-	+	-	-	7	3.0
+	+	-	-	-	+	+	8	2.5
-	-	-	-	-	-	+	9	2.0
-	+	-	+	+	-	+	10	2.0
-	-	+	-	-	+	+	11	2.0
-	-	-	-	+	+	+	12	2.0
-	-	-	+	+	+	+	13	2.0
+	-	-	-	-	-	-	14	1.0
+	+	-	-	-	-	-	15	1.0
+	-	+	-	-	-	-	16	1.0
+	+	+	-	-	-	-	17	1.0
-	+	-	+	+	+	-	18	1.0
-	+	+	+	+	+	-	19	1.0

- ตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Hope

จากจำนวนตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Hope ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง สามารถแยกชนิด Beta-globin gene cluster haplotype ได้จำนวน 9 รูปแบบดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Hope

Haplotype Loci							รูปแบบ haplotype	ความถี่ที่พบ (%)
5' E <i>Hinc</i> II	5' G γ <i>Hind</i> III	5' A γ <i>Hind</i> III	5' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	5' β <i>Ava</i> II	3' β <i>Hinf</i> I		
+	-	-	-	-	+	+	1	37.6
+	-	-	-	-	+	-	2	32.4
+	-	-	-	-	-	+	3	8.8
+	+	-	-	-	+	+	4	6.5
-	-	-	-	+	-	+	5	3.6
-	+	+	-	+	+	+	6	2.9
-	+	-	+	+	-	+	7	2.9
+	-	-	-	-	-	-	8	2.9
-	+	-	-	+	-	+	9	2.3

- ตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb D-Punjab

จากจำนวนตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb D-Punjab ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง สามารถแยกชนิด Beta-globin gene cluster haplotype ได้จำนวน 10 รูปแบบดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb D-Punjab

Haplotype Loci							รูปแบบ haplotype	ความถี่ที่พบ (%)
5' E <i>Hinc</i> II	5' G γ <i>Hind</i> III	5' A γ <i>Hind</i> III	5' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	5' β <i>Ava</i> II	3' β <i>Hinf</i> I		
-	+	+	-	+	+	+	1	21.0
-	-	+	-	+	+	+	2	18.8
+	-	-	-	-	-	+	3	11.6
+	+	+	-	+	+	+	4	10.2
+	-	-	-	-	+	+	5	9.4
-	+	+	-	+	+	-	6	9.4
-	+	+	+	+	+	+	7	6.3
-	+	-	+	+	-	+	8	6.2
-	-	-	-	-	-	+	9	4.0
-	+	-	+	+	+	-	10	3.1

- ตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb G-Makassar

จากจำนวนตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb G-Makassar ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง สามารถแยกชนิด Beta-globin gene cluster haplotype ได้จำนวน 11 รูปแบบดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 รูปแบบ Beta-globin gene cluster haplotype ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb G-Makassar

Haplotype Loci							รูปแบบ haplotype	ความถี่ที่พบ (%)
5' E <i>Hinc</i> II	5' G γ <i>Hind</i> III	5' A γ <i>Hind</i> III	5' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	3' $\psi\beta$ <i>Hinc</i> II	5' β <i>Ava</i> II	3' β <i>Hinf</i> I		
+	-	+	-	-	+	-	1	16.7
-	-	-	+	+	+	+	2	12.5
-	+	-	+	+	+	+	3	12.5
+	-	-	-	-	+	+	4	8.3
+	-	-	-	-	+	-	5	8.3
+	-	-	+	+	+	+	6	8.3
+	+		+	+	+	+	7	8.3
-	-	-	-	-	-	+	8	8.3
-	+	-	-	-	-	+	9	8.3
+	-	+	-	+	-	+	10	4.2
+	+	+	-	+	-	+	11	4.2

3. การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา

ผลค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด

ชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติ	จำนวน (ราย)	Rbc ($\times 10^6/\text{mm}^3$) mean $\pm$ SD	Hb (g/dL) mean $\pm$ SD	Hct (%) mean $\pm$ SD	MCV (fL) mean $\pm$ SD	MCH (pg) mean $\pm$ SD	MCHC (g/dL) mean $\pm$ SD	RDW-CV (%) mean $\pm$ SD
Hb C/N	36	4.8 $\pm$ 0.7	12.3 $\pm$ 1.9	35.1 $\pm$ 5.4	72.9 $\pm$ 9.9	25.8 $\pm$ 3.0	34.1 $\pm$ 4.1	15.6 $\pm$ 2.1
Hb Tak/N	25	5.5 $\pm$ 0.8	17.1 $\pm$ 7.5	44.2 $\pm$ 4.9	81.5 $\pm$ 6.3	29.2 $\pm$ 2.6	35.8 $\pm$ 1.4	14.1 $\pm$ 1.0
Hb Hope/N	17	4.5 $\pm$ 0.7	11.4 $\pm$ 1.7	34.1 $\pm$ 4.3	78.7 $\pm$ 7.5	26.3 $\pm$ 3.7	33.3 $\pm$ 2.1	15.4 $\pm$ 6.5
Hb D- Panjab/N	16	5.0 $\pm$ 0.8	13.2 $\pm$ 2.0	40.3 $\pm$ 6.4	82.0 $\pm$ 4.7	26.9 $\pm$ 1.2	33.2 $\pm$ 1.8	14.2 $\pm$ 1.0
HbG-Makassar/N	6	4.6 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 1.8	34.8 $\pm$ 4.8	77.9 $\pm$ 8.3	27.3 $\pm$ 3.5	34.2 $\pm$ 1.2	14.3 $\pm$ 1.9

บทวิจารณ์

การศึกษาถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่มีความสำคัญ ทำให้สามารถศึกษาถึงลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และระบุถึงความหลากหลายของมนุษยชาติได้อีกทางหนึ่ง โดยการศึกษาผ่านทางลักษณะของแอสไพโลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ใช้กลุ่มยีนบนสายเบต้าโกลบินมาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบแอสไพโลไทป์ ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 7 ตำแหน่งดังนี้ 5'E HincII, 5' ^Gγ HindIII, 5' ^Aγ HindIII, 5'ψβHincII, 3'ψβ HincII, 5'β Avall, 3'β HinfI เป็นเครื่องมือที่ถูกลำมาใช้ในการระบุความหลากหลายของกลุ่มประชากรที่มีฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยในประเทศไทย โดยศึกษาในกลุ่มฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหมด 6 ชนิดคือ Hemoglobin C, Hemoglobin Tak, Hemoglobin Hope, Hemoglobin D-Punjab และ Hemoglobin G-Makassar

ฮีโมโกลบินชนิดซี (Hemoglobin C, HbC) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 ของสายเบต้าโกลบิน จากกรดกลูตามิก เป็น กรดไลซีน ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu-Lys}}$) เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β -thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 5.12 - 5.20 [2] ฮีโมโกลบินชนิดซีเคยมีรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2536 ในผู้ที่จากจังหวัดนครศรีธรรมราช [12, 37] และส่วนใหญ่จะพบจำนวนมากในภาคใต้ของประเทศไทย มากกว่า 26 ราย [2, 9] ต่อมาจามีรายงานการค้นพบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 15 ราย [38] ภาคกลางจำนวน 8 ราย ภาคเหนือจำนวน 1 ราย [39] อาการของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดซีจะไม่มีอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ และบางคนอาจจะมีอาการไม่รุนแรงจนถึงรุนแรงถ้าหากมียีนร่วมกับยีนเบต้า-ธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง [40] จากการศึกษาลักษณะของแอสไพโลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน พบว่ามีถึง 17 รูปแบบ รูปแบบที่พบมากที่สุดคือ (+ - - - - +) คิดเป็นร้อยละ 35.4 ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ฮีโมโกลบินชนิดซีจะพบมากในกลุ่มชาวแอฟริกาและคนผิวดำ [11] และเมื่อศึกษาถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรมโดยศึกษาลักษณะของ beta-globin gene cluster haplotype แล้วพบว่าฮีโมโกลบินชนิดซีที่พบในคนไทยจะมีลักษณะของ beta-globin gene cluster แบบ + - - - - + [38] แต่ฮีโมโกลบินชนิดซีที่พบในกลุ่มชาวแอฟริกันนั้นมีลักษณะของ beta-globin gene cluster ในกลุ่ม haplotype type I (- + - - + +), haplotype type II (- - - + + +) และ haplotype type III (- - - - + +) [8, 12] ซึ่งไม่พบรูปแบบดังกล่าวจากการศึกษาครั้งนี้เลย จากการศึกษาถึงลักษณะของ globin gene cluster haplotype นี้สามารถใช้ในการบ่งบอกถึงต้นกำเนิดที่แตกต่างกันของเชื้อชาติและเผ่าพันธุ์ได้

ฮีโมโกลบินชนิดตาก (Hemoglobin Tak, Hb Tak) เกิดจากการที่มีนิวคลีโอไทด์ ACแทรกเข้ามาที่ตำแหน่ง terminator codon ของยีนเบต้า-โกลบิน ทำให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนยาวออกไปอีก 11 ตัว เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β -thal short ฮีโมโกลบินชนิดซีจะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.06 - 4.28 [2] ฮีโมโกลบินชนิดตากพบได้กลุ่มประชากรเชื้อ

สายไทย, มาเลเซีย, และไต้หวัน [25, 41-44] ในคนไทยสามารถพบได้เกือบทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคตะวันออกที่ยังไม่มีรายงานการพบ Hb Tak [39] อาการของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดตางมี ตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงมีอาการ polycythemia สำหรับผู้ที่มีฮีโมโกลบินชนิดตางช่วงที่เป็นเด็กทารก เนื่องจากภาวะที่มีออกซิเจนสูงในกระแสเลือด [45] จากการศึกษาลักษณะของแอฟโพลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน พบว่ามีถึง 19 รูปแบบ รูปแบบที่พบมากที่สุดคือ (+ - - - - +) คิดเป็นร้อยละ 29.8 และพบรูปแบบที่รองลงมาคือ (- + + - - +) คิดเป็นร้อยละ 26.9 ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีรายงานรูปแบบแอฟโพลไทป์ของเบต้าโกลบินยีนของฮีโมโกลบินชนิดตางในภาคใต้ และภาคอื่น ๆ ของประเทศไทยเลย การศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นการรายงานครั้งแรกที่มีความสำคัญในการเผยแพร่ผลงานให้ผู้อื่นได้นำไปเปรียบเทียบต้นกำเนิดของฮีโมโกลบินชนิดนี้ต่อไป

ฮีโมโกลบินชนิด Hope (Hemoglobin Hope, Hb Hope) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 136 ของสายเบต้าโกลบินจากกรดไกลซีน เป็น กรดแอสพาทิก ($\alpha_2\beta_2^{136\text{Gly-Asp}}$) เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β -thal short ฮีโมโกลบินชนิดนี้จะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 3.68 [2] พบรายงานครั้งแรกในกลุ่มครอบครัว black African-American [46] ต่อมาก็มีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรชาวไทย, สเปน, อเมริกา, แอฟริกา, ญี่ปุ่น, [25, 32, 46-50] ในประเทศไทยสามารถพบฮีโมโกลบินชนิด Hope ได้ทุกภาคของประเทศไทย โดยจะพบมากที่สุดที่ภาคเหนือ รองลงมาคือ ภาคกลาง [39] แต่ทางภาคใต้พบในปริมาณที่น้อยกว่ามากจากการศึกษาครั้งนี้พบเพียงแค่ 1 ราย ผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิดนี้ไม่พบอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ ส่วนการศึกษาลักษณะของแอฟโพลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน พบว่ามี 9 รูปแบบ รูปแบบที่พบมากที่สุดคือ (+ - - - - +) คิดเป็นร้อยละ 37.6 และพบรูปแบบที่รองลงมาคือ (+ - - - - +) คิดเป็นร้อยละ 32.4 ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบแอฟโพลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน ที่พบในกลุ่มชาว Tunisian จัดอยู่ในกลุ่ม Mediterranean haplotype I (+ - - - - +) [51] แสดงให้เห็นว่า กลุ่มประชากรชาวไทยมีต้นกำเนิดทางพันธุศาสตร์ที่ถ่ายทอดมาจากกลุ่มเมดิเตอร์เรเนียน

ฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab (Hemoglobin D-Panjab, Hb D-Panjab หรือ Hb D-Los Angeles) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 121 ของสายเบต้าโกลบิน จากกรดกลูตามิก เป็น กรดกลูตามีน ($\alpha_2\beta_2^{121\text{Glu-Gln}}$) เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β -thal short ฮีโมโกลบินชนิดนี้จะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.01-4.16 [2] ฮีโมโกลบินชนิดนี้สามารถพบได้ในกลุ่มประชากรเชื้อสายไทย, อินเดีย และชาวยิว-บัลกาเรียน [7, 25, 52-54] ในประเทศไทยสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab ได้ในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ จำนวนแตกต่างกันไป [2, 25, 39] อาการของผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab จะไม่มีอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ

จากการศึกษาลักษณะของแอสโฟลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน พบทั้งหมด 10 รูปแบบ รูปแบบที่พบบมากที่สุดคือ (- + + - + +) คิดเป็นร้อยละ 21.0 ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบได้บ่อยเช่นเดียวกับประชากรชาวตุรกี [55] ภาคเหนือของประเทศไทย [56] และเคยมีรายงานมาก่อนแล้วในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย [7] ส่วนรูปแบบที่พบบรองลงมาคือ (- - - + + +) คิดเป็นร้อยละ 18.8 เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศ [57, 58] ซึ่งรูปแบบของแอสโฟลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน ของฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab บ่งบอกได้ว่า ต้นกำเนิดทางพันธุศาสตร์ของฮีโมโกลบินชนิดนี้มาจากหลากหลายพื้นที่ (multi centric origin)

ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar (Hemoglobin G-Makassar, Hb G-Makassar) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 ของสายเบต้าโกลบินจากการดกลูตามิค เป็น กรดอะลานีน ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu-Ala}}$) มีรายงานครั้งแรกในชาวอินโดนีเซีย [59] และต่อมาได้มีการรายงานในประเทศไทยจำนวน 6 ราย ซึ่งเป็นคนที่มีภูมิลาเนาจากทางภาคใต้ 1 คน [24, 60] เมื่อแยกชนิดของฮีโมโกลบินด้วยการใช้ความดัน HPLC และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม β -thal short ฮีโมโกลบินชนิดนี้จะถูกแยกออกมาที่ retention time ที่ 4.48-4.55 [2] ผู้ที่เป็นพาหะฮีโมโกลบินชนิด D-Panjab จะไม่พบอาการที่เป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ ยกเว้นเมื่อตรวจค่าทางโลหิตวิทยาจะพบว่าค่า MCV จะต่ำกว่าปกติเล็กน้อยคืออยู่ในช่วง 77.9 ± 8.3 fL จากการศึกษาลักษณะของแอสโฟลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน พบทั้งหมด 11 รูปแบบ รูปแบบที่พบบมากที่สุดคือ (+ - + - - + -) คิดเป็นร้อยละ 16.7 และพบรูปแบบอื่น ๆ อีก 10 รูปแบบในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกันนัก ทำให้ไม่สามารถระบุต้นกำเนิดทางพันธุกรรมที่แน่นอนได้ เนื่องจากจำนวนของตัวอย่างที่พบว่าเป็นฮีโมโกลบินชนิดนี้เพียง 6 รายเท่านั้น

จากการศึกษาต้นกำเนิดทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบน้อยของประเทศไทย ด้วยการศึกษาลักษณะของแอสโฟลไทป์ของเบต้าโกลบินยีน พบว่าชนิดของแอสโฟลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดในประเทศไทยมีต้นกำเนิดจากหลากหลายแหล่ง แต่ฮีโมโกลบินบางชนิดพบว่ามีต้นกำเนิดเฉพาะในประเทศไทย เช่น ฮีโมโกลบินชนิดซี ซึ่งพบรูปแบบของแอสโฟลไทป์ที่จำเพาะเฉพาะในคนไทย นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้สามารถรายงานรูปแบบของแอสโฟลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด G-Makassar และชนิด Tak ที่ยังไม่เคยพบการรายงานมาก่อน แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากฮีโมโกลบินบางชนิด เช่น ฮีโมโกลบินชนิด G-Makassar มีจำนวนเพียง 6 ราย จึงต้องมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น จึงจะสามารถวิเคราะห์ถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรมที่ได้ผลแม่นยำมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Giardine, B., et al., *Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations*. Nucleic Acids Res, 2014. 42(Database issue): p. D1063-9.
2. Saechan, V., et al., *Molecular basis and hematological features of hemoglobin variants in Southern Thailand*. Int J Hematol, 2010. 92(3): p. 445-50.
3. Scheltinga, S.A., et al., *Characterization of a novel HLA-A2 variant, A*02012, in the Southern Thai-Muslim population*. Tissue Antigens, 1999. 53(5): p. 507-9.
4. Saechan, V., et al., *Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups*. J Gen Virol, 2010. 91(Pt 8): p. 2054-61.
5. Phongphaibun, S., *Ties of Brotherhood: Cultural Roots of Southern Thailand and Northern Malaysia*. 2004, [online] http://kyotoreview.cseas.kyoto-u.ac.jp/issue/issue4/article_352.html. Accessed 1 May 2010.
6. Chaibunruang, A., et al., *Interactions of hemoglobin Lepore (deltabeta hybrid hemoglobin) with various hemoglobinopathies: A molecular and hematological characteristics and differential diagnosis*. Blood Cells Mol Dis, 2010. 44(3): p. 140-5.
7. Fucharoen, S., et al., *Molecular characterization of Hb D-Punjab [beta121(GH4)Glu-->Gln] in Thailand*. Hemoglobin, 2002. 26(3): p. 261-9.
8. Fucharoen, S., et al., *Compound heterozygote states for Hb C/Hb Malay and Hb C/Hb E in pregnancy: a molecular and hematological analysis*. Blood Cells Mol Dis, 2005. 35(2): p. 196-200.
9. Supan Fucharoen, G.F., *Hemoglobin variants in Thailand: Data from a referral center at Khon Kaen University in 2015*. Journal of Medical Technology and Physical Therapy 2015. 27(3): p. 225-239.
10. Nopparatana, C., et al., *The spectrum of beta-thalassemia mutations in southern Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1995. 26 **Suppl 1**: p. 229-34.
11. Hunt, J.A. and V.M. Ingram, *Abnormal human haemoglobins. IV. The chemical difference between normal human haemoglobin and haemoglobin C*. Biochim Biophys Acta, 1960. 42: p. 409-21.
12. Siriboon, W., et al., *Discovery of a New Hemoglobin C Mutation in Thailand* Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications. 1995: Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok. 159-163.
13. Tanphaichitr, V.S., et al., *Homozygous hemoglobin Tak causes symptomatic secondary polycythemia in a Thai boy*. J Pediatr Hematol Oncol, 2003. 25(3): p. 261-5.

14. Nuinoon, M., et al., *A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta0-thalassemia/hemoglobin E*. Hum Genet, 2010. 127(3): p. 303-14.
15. Fucharoen, S., V. Thonglairuam, and P. Winichagoon, *Hematologic changes in alpha-thalassemia*. Am J Clin Pathol, 1988. 90(2): p. 193-6.
16. Sae-Ung, N., et al., *alpha-Thalassemia and Related Disorders in Northeast Thailand: A Molecular and Hematological Characterization*. Acta Haematol, 2006. 117(2): p. 78-82.
17. Fucharoen, S., et al., *Complex interaction of Hb Hekinan [alpha27(B8) Glu-Asp] and Hb E [beta26(B8) Glu-Lys] with a deletional alpha-thalassemia 1 in a Thai family*. Eur J Haematol, 2003. 70(5): p. 304-9.
18. Saidi, H.T. and G. Duraisamy, *Haemoglobin S in Malays and Indians: association of Hb CoSp and Hb S in a Malay family*. Trop Geogr Med, 1978. 30(1): p. 103-8.
19. Rosline, H., et al., *Identification of hemoglobin AC heterozygote status in a Malay family: a decision between hemoglobin electrophoresis and high performance liquid chromatography*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2007. 38(3): p. 543-5.
20. Pasangna, J., E. George, and M. Nagaratnam, *Haemoglobin Lepore in a Malay family: a case report*. Malays J Pathol, 2005. 27(1): p. 33-7.
21. Lu, Y. and J. Liu, *Abnormal hemoglobins found in Hunan*. Chin Med J (Engl), 2003. 116(4): p. 483-6.
22. 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.
23. 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.
24. Viprakasit, V., et al., *Hb G-Makassar [beta6(A3)Glu-->Ala; codon 6 (GAG-->GCG)]: molecular characterization, clinical, and hematological effects*. Hemoglobin, 2002. 26(3): p. 245-53.
25. Uaprasert, N., et al., *Clinical and hematological characteristics of uncommon beta-globin variants in Thailand*. Int J Hematol, 2009. 89(5): p. 568-71.
26. Jindadamrongwech, S., et al., *Hb Tak and Hb Q-Thailand in Thai patients are S-window hemoglobin variants revealed by high performance liquid chromatography*. Hemoglobin, 2010. 34(2): p. 161-4.
27. Chan, V., et al., *A new cross-over region for hemogloboin-Lepore-Hollandia*. Haematologica, 2004. 89(5): p. 610-1.
28. Teawtrakul, N., et al., *Compound heterozygous Hb Tak/Hb E causes secondary erythrocytosis in a Thai family*. Hemoglobin, 2010. 34(2): p. 165-8.

29. Fucharoen, S., et al., *Molecular and haematological characterization of compound Hb E/Hb Pyrgos and Hb E/Hb J-Bangkok in Thai patients*. Clin Lab Haematol, 2005. 27(3): p. 184-9.
30. Changtrakul Y., et al., *Identification of HbS in Thai patients*. Songkla Med J, 2002. 20: p. 201-9.
31. Sanchaisuriya, K., et al., *Multiplex allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab and Hb Tak*. Clin Chim Acta, 2004. 343(1-2): p. 129-34.
32. Sura, T., et al., *Haemoglobin Hope in a northern Thai family: first identification of homozygous haemoglobin Hope associated with haemoglobin H disease*. Eur J Haematol, 2007. 79(3): p. 251-4.
33. Charoenkwan, P., et al., *Cord blood screening for alpha-thalassemia and hemoglobin variants by isoelectric focusing in northern Thai neonates: correlation with genotypes and hematologic parameters*. Blood Cells Mol Dis, 2010. 45(1): p. 53-7.
34. Fukumaki Y and F. S., *New aspects of the genetics of molecular evolution*. Generation and spread of globin gene mutations in populations: beta-thalassemia in Asian countries, ed. Kimura M and T. N. 1991, Berlin,: Springer-Verlag.
35. Sutton, M., E.E. Bouhassira, and R.L. Nagel, *Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes*. Am J Hematol, 1989. 32(1): p. 66-9.
36. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. Bioinformatics, 2005. 21(2): p. 263-5.
37. Siriboon, W., et al., *Identification of Hb C [beta 6(A3)Glu-->Lys] in a Thai male*. Hemoglobin, 1993. 17(5): p. 419-25.
38. Sanchaisuriya, K., et al., *Molecular characterization of hemoglobin C in Thailand*. Am J Hematol, 2001. 67(3): p. 189-93.
39. Fucharoen, S. and G. Fucharoen, *Hemoglobin variants in Thailand: Data from a referral center at Khon Kaen University in 2015*. Journal of Medical Technology and Physical Therapy, 2015. 27(3): p. 225-239.
40. Old, J.M., *Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders*. Blood Rev, 2003. 17(1): p. 43-53.
41. Lie-Injo, L.E., et al., *Red cell metabolism and severe neonatal jaundice in West Malaysia*. Acta Haematol, 1977. 58(3): p. 152-60.
42. Lie-Injo, L.E., et al., *Hemoglobin Tak in a newborn Malay*. Hemoglobin, 1977. 1(8): p. 747-57.

43. Fucharoen, S., et al., *Molecular and hematological characterization of Hb Tak and Hb Pyrgos in Thailand*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1997. 28 Suppl 3: p. 110-4.
44. Shih, M.C., et al., *Hb Tak: a beta chain elongation at the end of the beta chain, in a Taiwanese*. Hemoglobin, 2005. 29(1): p. 65-7.
45. Charoenkwan, P., et al., *Hematological and molecular characterization of beta-thalassemia/Hb Tak compound heterozygote*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2003. 34(2): p. 415-9.
46. Minnich, V., et al., *Hemoglobin Hope: a Beta Chain Variant*. Blood, 1965. 25: p. 830-8.
47. Harano, T., et al., *Hb Hope [beta 136 (H 14) Gly leads to Asp] in a Japanese family*. Hemoglobin, 1983. 7(3): p. 263-5.
48. Labie, D., et al., *[Hemoglobinopathies in West-African immigrant workers in France (author's transl)]*. Sem Hop, 1978. 54(43-44): p. 1343-6.
49. Beneitez, D., et al., *Heterozygous Hb Hope [beta136(H14)Gly --> Asp] in association with heterozygous beta0-thalassemia with apparent homozygous expression, in a Spanish patient*. Hemoglobin, 2006. 30(1): p. 45-9.
50. Chunpanich, S., et al., *Molecular and hematological characterization of hemoglobin Hope/hemoglobin E and hemoglobin Hope/alpha-thalassemia 2 in Thai patients*. Lab Hematol, 2004. 10(4): p. 215-20.
51. Bibi, A., et al., *Fortuitous description of hemoglobin Hope in a high-level Tunisian athlete: molecular diagnosis and origin*. Ann Biol Clin (Paris), 2012. 70(3): p. 295-8.
52. Wasi, P., et al., *Haemoglobin D-beta Los Angeles (D Punjab, alpha-2-beta-2 121 Glu NH2) in a Thai family*. Acta Haematol, 1968. 39(3): p. 151-8.
53. Ropero, P., et al., *[The association of beta zero-thalassemia and Hb D Punjab in a family of Indian origin. The second case reported in Spain]*. Med Clin (Barc), 1997. 108(10): p. 385-8.
54. Ramot, B., et al., *Hemoglobin D Punjab in a Bulgarian Jewish family*. Isr J Med Sci, 1969. 5(5): p. 1066-70.
55. Torres Lde, S., et al., *Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis*. Rev Bras Hematol Hemoter, 2015. 37(2): p. 120-6.
56. Mahdavi, M.R., et al., *beta-Globin gene cluster haplotypes of Hb D-Los Angeles in Mazandaran Province, Iran*. Genes Genet Syst, 2015. 90(1): p. 55-7.
57. Atalay, E.O., et al., *Genetic origin of Hb D-Los Angeles [beta121(GH4)Glu-->Gln, GAA-->CAA] according to the beta-globin gene cluster haplotypes*. Hemoglobin, 2007. 31(3): p. 387-91.

58. Bahadir, A., et al., *Hb D-Los Angeles [beta121(GH4)Glu>Gln] and Hb Beograd [beta121(GH4)Glu>Val]: Implications for their laboratory diagnosis and genetic origins*. Turk J Haematol, 2009. 26(1): p. 17-20.
59. Blackwell, R.Q., et al., *Hemoglobin G Makassar: beta-6 Glu leads to Ala*. Biochim Biophys Acta, 1970. 214(3): p. 396-401.
60. Sangkitporn, S., et al., *Hb G Makassar (beta 6:Glu-Ala) in a Thai family*. J Med Assoc Thai, 2002. 85(5): p. 577-82.

ภาคผนวก**Outputs**

1. **Saechan V**, Nopparatana C, Fucharoen S. *Beta globin* gene haplotype analysis of rare hemoglobin variants in Southern Thailand. Thai Journal of Genetics. 2013; S1:127-9 (Proceedings)

Thai Journal of Genetics

The Journal of Genetics Society of Thailand

<http://202.44.8.54/index.php/gst/>

July 2013 Vol. 51 (Special Issue 1)



National Genetics Conference 2013

NGC2013

Genetics towards ASEAN
Bangkok, July 17-19, 2013



การประชุมวิชาการ พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18 “พันธุศาสตร์ก้าวหน้าสู่อาเซียน”

17 - 19 กรกฎาคม 2556
ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กรุงเทพมหานคร



ISSN : 0857-8664

ลักษณะแอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยในภาคใต้ประเทศไทย

Beta Globin Gene Haplotype Analysis of Rare Hemoglobin Variants in Southern Thailand

วรรณรัตน์ แซ่ซุ่น*, จ่านงค์ นพรัตน์ และ สุทัศน์ ฟูเจริญ

Vannarat Saechan, Chamnong Nopparatana and Suthat Fucharoen

โครงการจัดตั้งคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

Faculty of Veterinary Science (Establishment Project), Prince of Songkla University, Songkhla 90110

*Corresponding author: svannarat2002@yahoo.com

บทคัดย่อ

ฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นภาวะทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา เกิดจากยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเบต้าผิดปกติ ทำให้มีความผิดปกติในแง่คุณภาพของฮีโมโกลบิน จำนวนและชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทยมีความแตกต่างกับฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคอื่นๆ รวมทั้งแตกต่างจากประเทศเพื่อนบ้านและประเทศในแถบเอเชียด้วยกัน เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยในภาคใต้ของประเทศไทย กับจุดกำเนิดทางเชื้อชาติของกลุ่มประชากร ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C จำนวน 21 ราย Hb D-Punjab จำนวน 14 ราย Hb Tak จำนวน 4 ราย และ Hb G-Makassar จำนวน 4 ราย นำมาวิเคราะห์รูปแบบแอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินด้วยหลักการ Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ประกอบด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่งดังนี้ *HincII* 5'ε, *XmnI* 5'^Gγ, *HindIII* ^Gγ, *HindIII* ^Aγ, *HincII* 5'ψβ, *HincII* 3'ψβ และ *AvaI* 5'β ผลการศึกษาพบว่าชนิดของแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดในกลุ่มประชากรในภาคใต้ของไทย มีความแตกต่างจากรูปแบบของแอฟโพลไทป์ที่เคยมีรายงานมาก่อน และได้รายงานรูปแบบของแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb G-Makassar และ ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak ครั้งแรกในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งรูปแบบของแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิด แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรในภาคใต้ของไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ถิ่นกำเนิด รวมถึงเชื้อชาติ และความถี่ในการแพร่กระจายของรูปแบบแอฟโพลไทป์

ABSTRACT

Hemoglobin variant is an inherited disorder that results in the abnormal structure of globin chains of the hemoglobin (Hb) molecule. Many hemoglobin variants have been characterized worldwide and the distribution of hemoglobin variants in southern Thailand is associated with geographic and/or ethnic backgrounds. The aim of this study was to investigate the genetic origin of rare hemoglobin variants in Thailand by characterized the *beta-globin* gene cluster haplotype pattern in Hb C 21 cases, Hb D-Punjab 14 cases, Hb Tak 4 cases and Hb G-Makassar 4 cases. Haplotype analysis was done by Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) for *beta globin* gene cluster of the following polymorphic restriction sites: *HincII* 5'ε, *XmnI* 5'^Gγ, *HindIII* ^Gγ, *HindIII* ^Aγ, *HincII* 5'ψβ, *HincII* 3'ψβ and *AvaI* 5'β. This study found that the type of haplotype of hemoglobin variants in southern Thailand is apparently different from previously report. The haplotypes of Hb G-Makassar and Hb Tak were reported for the first time in southern Thailand. This finding suggests that the history of population admixture might contribute to the present distribution pattern of the haplotype variants.

คำสำคัญ: ฮีโมโกลบินผิดปกติ, แอฟโพลไทป์ยีนบีตาโกลบิน, พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

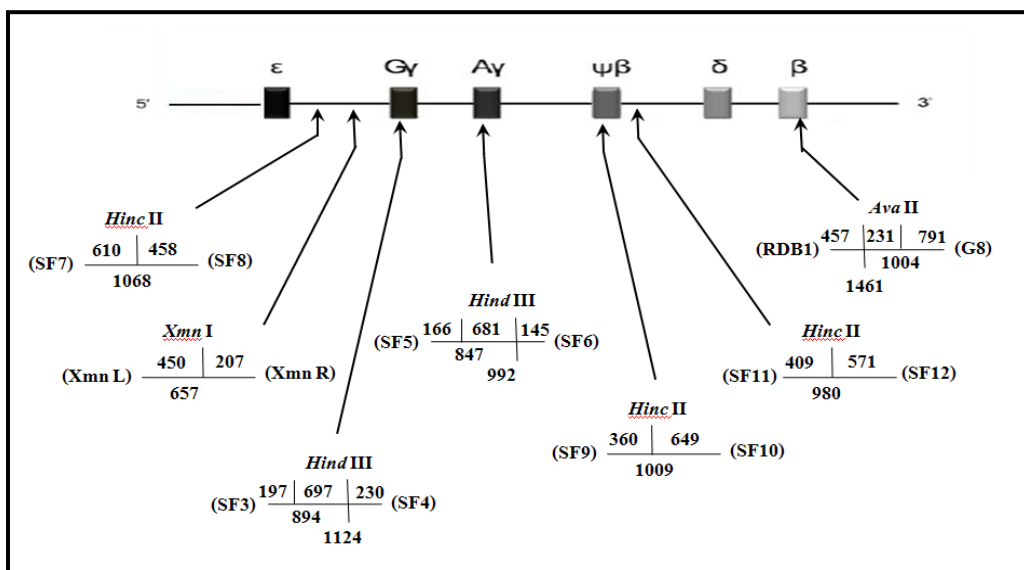
Keywords: hemoglobin variants, *beta globin* gene haplotype, PCR-RFLP

บทนำ

ฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นภาวะทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา เกิดจากยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สายโกลบินเบต้าผิดปกติมีผลทำให้มีความผิดปกติในแง่คุณภาพของฮีโมโกลบิน ปัจจุบันมีรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบทั่วโลกมากกว่า 1,018 ชนิด (Hardison, 2002) สำหรับในประเทศไทยพบแล้วมากกว่า 20 ชนิด และจากการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของชนิดฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย (Saechan, 2010a) พบว่า จำนวนและชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคใต้ของประเทศไทยมีความแตกต่างกับฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบในภาคอื่นๆ รวมทั้งแตกต่างจากประเทศเพื่อนบ้านและประเทศในแถบเอเชียด้วยกัน โดยพบว่าฮีโมโกลบินชนิดซี พบมากที่สุดในภาคใต้ของประเทศไทยสูงถึงร้อยละ 48.3 ของฮีโมโกลบินผิดปกติทั้งหมด ซึ่งเป็นตัวอย่างจากคนไทยที่มีภูมิถิ่นฐานและบรรพบุรุษเป็นคนภาคใต้ทั้งสิ้น และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA (Scheltinga, 1999) และลักษณะของการติดเชื้อของไวรัสเอดส์ไทรโน-บาร์ ในคนภาคใต้ของประเทศไทย (Saechan, 2010b) ก็แสดงถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความเฉพาะตัวแตกต่างจากคนภาคอื่นของประเทศไทย ซึ่งผลของความแตกต่างเหล่านี้สาเหตุอาจมาจากคนภาคใต้ส่วนใหญ่มีเชื้อสายผสมของชนชาติไทย จีน และมุสลิม ที่ย้ายถิ่นฐานมาจากชาวมองโกลอยด์ (Scheltinga, 1999 และ Phongphaibun, 2004) ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของคนภาคใต้รวมถึงการพบอุบัติการณ์ของฮีโมโกลบินผิดปกติดังกล่าวข้างต้นแตกต่างจากคนภาคอื่นๆ ของประเทศ การศึกษาดังนี้เป็นการศึกษาถึงต้นกำเนิดทางพันธุกรรม (genetic origin) ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบได้ในภาคใต้ของไทยโดยเปรียบเทียบลักษณะแอฟโฟลไทป์ของยีนบีตาโกลบินของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อยในภาคใต้ของประเทศไทย ที่ได้จากคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประกอบด้วยฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C จำนวน 21 ราย Hb D-Punjab จำนวน 14 ราย Hb Tak จำนวน 4 ราย และ Hb G-Makassar จำนวน 4 ราย
2. นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ยีนโกลบินที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิดต่างๆ ประกอบด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะ 7 ตำแหน่ง ดังนี้ *HincII* 5'ε, *XmnI* 5'^Gγ, *HindIII* ^Gγ, *HindIII* ^Aγ, *HincII* 5'ψβ, *HincII* 3'ψβ และ *AvaII* 5'β ดังแสดงในแผนภูมิรูปที่ 1 และวิเคราะห์ลักษณะของแอฟโฟลไทป์ของยีนบีตาโกลบินที่ได้



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของแอฟโฟลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์รูปแบบลักษณะแอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบินจากตัวอย่างฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb C จำนวน 21 ราย พบลักษณะแอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน ประกอบด้วย (+ - - - - ±), (+ - - - - -), (- - - - - -) คิดเป็นร้อยละ 38.0, 19.0, 9.4 ตามลำดับ และพบลักษณะต่อไปนี้อีกชนิดละร้อยละ 4.8 คือ (- + + - ± + -), (- ± ± ± ± ±), (± - - - - ± -), (± ± ± ± ± ±), (± ± ± ± ± ±), (+ ± - - - -) และ (+ - - - - ± ±) ส่วนฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb D-Punjab จำนวน 14 ราย พบลักษณะของแอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน ประกอบด้วย (- - ± + - + +), (± - ± ± - ± ±) คิดเป็นร้อยละ 21.6 และ 14.5 ตามลำดับ และพบลักษณะต่อไปนี้อีกชนิดละร้อยละ 7.1 คือ (- - ± ± - ± ±), (- ± ± ± ± ± + ±), (- - ± ± ± + +), (± - - ± - ± +), (± - ± ± - ± +), (± ± ± ± ± ± ±), (± ± + ± ± ± ±), (+ - - - - ±) และ (+ ± + + - + +) สำหรับฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak จำนวน 4 ราย พบลักษณะของแอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน ประกอบด้วย (- ± ± ± ± ±), (- ± ± + ± ±), (+ - - - -), และ (+ - - + - -) คิดเป็นชนิดละร้อยละ 25 และ ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb G-Makassar จำนวน 4 ราย พบลักษณะของแอฟโพลไทป์ของยีนบีตาโกลบิน ประกอบด้วย (- + ± - + +), (+ - - - - +), (+ - - + - +) และ (+ ± ± ± ± ±) คิดเป็นชนิดละร้อยละ 25

จากผลการศึกษาพบว่าชนิดของแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดในกลุ่มประชากรในภาคใต้ของประเทศไทยมีความแตกต่างจากรูปแบบของแอฟโพลไทป์ที่เคยมีรายงานมาก่อน และได้รายงานรูปแบบของแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb G-Makassar และ ฮีโมโกลบินผิดปกติชนิด Hb Tak ครั้งแรกในภาคใต้ของประเทศไทย

สรุปผลการทดลอง

ชนิดของแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดในกลุ่มประชากรในภาคใต้ของประเทศไทยมีรูปแบบของแอฟโพลไทป์ของฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดหลากหลาย แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรในภาคใต้ของประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ถิ่นกำเนิด รวมถึงเชื้อชาติ และความถี่ในการแพร่กระจายของรูปแบบแอฟโพลไทป์

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- Hardison RC, Chui DH, Giardine B, Riemer C, Patrinos GP, Anagnou N, et al. HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the *globin* gene server. Hum Mutat. 2002;19(3):225-33.
- Saechan V, Nopparatana C, Fucharoen S. Molecular basis and hematological features of hemoglobin variants in Southern Thailand. Int J Hematol. 2010a;92(3):445-50.
- Scheltinga SA, van der Zwan AW, Mongkolsuk T, Sujirachato K, Chiewsilp P, Tilanus MG. Characterization of a novel HLA-A2 variant, A*02012, in the Southern Thai-Muslim population. Tissue Antigens. 1999;53(5):507-9.
- Saechan V, Settheetham-Ishida W, Kimura R, Tiwawech D, Mitarnun W, Ishida T. Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. J Gen Virol. 2010b;91(Pt 8):2054-61.
- Phongphaibun S. Ties of Brotherhood: Cultural Roots of Southern Thailand and Northern Malaysia [database on the Internet]. [online] http://kyotoreview.cseas.kyoto-u.ac.jp/issue/issue4/article_352.html. 2004, Accessed 1 May 2012. [cited 25 May 2012].